

ANÀLISI GENÈTIC DE LES BARRERES OCEANOGRÀFIQUES A L'ATLÀNTIC I EL MEDITERRANI AMB LIOCARCINUS DEPURATOR AL LLARG DEL TEMPS



Autor: Tania Roda Carrera

Departament de Genètica

Universitat de Barcelona

Tutora interna: Marta Pascual

Tutor extern: Pere Abelló (ICM)

01/07/2014

Grau de Bioquímica

AGRAÏMENTS

A la meva tutora, la Dra. Marta Pascual, sense els seus consells, motivació, ajuda i idees aquest treball no seria el que és.

Al Dr. Pere Abelló, que em va introduir en el món d'aquest crustaci.

També als companys de laboratori que m'han ensenyat i aconsellat sempre que ho he necessitat sense queixar-se.

A la família, parella i amics, que m'han aguantat tot aquest trajecte.

Gràcies a tots!

SUMMARY

Oceanographic discontinuities are very important for the study of genetic connectivity between populations. Different processes may affect the dispersion of marine organisms, which is necessary to understand their genetic distribution. In this research we use mitochondrial gen COI in order to determine the distribution patterns for *Liocarcinus depurator* and thereby study the effect of three fronts from the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea (Gibraltar Strait, Almeria-Oran Front and Ibiza Chanel) across time. A total of 147 individuals were sampled from five different localities: Cadis, Malaga, Alacant, Valencia and Delta the same year (2013) to have good information of genetic variability and current patterns. Afterwards, we did a temporal study comparing our results with previous analyses of the same specie and localities but in different years (2005-2007 and 2009-2010). Isolation by distance was found with the individuals obtained in 2013, seeing two different groups: the Atlantic (with individuals from Cadis and Malaga) and the Mediterranean (mostly individuals from Alacant, Valencia and Delta). The temporal study reveals us variability in Cadis and Alacant over time. Ours results indicate that genetic flux is strongly attached to current patterns across oceanographic discontinuities, mainly unidirectionals, although they vary because of different factors which we still do not know, we can just guess from the genetic data. To sum up, our research tell us that populations are not stable along time and show the importance of time and space investigation with marine organisms.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	2
2. MATERIAL I MÈTODES	6
2.1. Material	6
2.2. Extracció i seqüenciació de les mostres	7
2.3. Anàlisi de dades	8
3. RESULTATS	10
3.1. Anàlisi poblacional de mostres del 2013	10
3.2. Comparativa dins d'una mateixa població al llarg dels anys	12
3.3. Comparativa entre poblacions al llarg del temps	13
3.4. Efecte dels fronts	14
4. DISCUSSIÓ	17
5. CONCLUSIONS	19
6. BIBLIOGRAFIA	20
7. ANNEX	24

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

La connectivitat i la estructura genètica de les poblacions són molt importants en l'estudi de la ecologia i la evolució de les espècies. Existeix un considerable nombre d'estudis que han definit els processos que influeixen sobre la genètica de poblacions i filogeografia en les últimes dècades (Avice, 2000). Processos com les discontinuïtats oceanogràfiques, permanents o semipermanents, estan entre els principals factors que defineixen l'estructura genètica de les espècies (Galarza *et al.*, 2009; Palero *et al.*, 2011; Schunter *et al.*, 2011a). De la mateixa manera, la distribució dels nivells de diversitat genètica ha estat relacionada amb successos passats (com les glaciacions del Pleistocè) que condicionen l'evolució i la distribució actual de les espècies (García-Merchán *et al.*, 2012). La majoria de les discontinuïtats genètiques observades en les poblacions marines estan associades amb la fase dispersiva de les espècies, que sol ser la fase larvària (Planes, 2002). Els adults de moltes espècies bentòniques mostren hàbits bastant sedentaris que, *a priori*, no tenen una influència important en la estructuració genètica.

Tradicionalment es pensava que les poblacions d'espècies marines tenien una gran homogeneïtat genètica degut a l'aparent absència de fortes barreres en la distribució dels organismes. No obstant, en les últimes dècades, s'ha observat que la dinàmica espacial i temporal del flux genètic és més complex del que s'assumia. Això és a causa de que els corrents marins, girs i fronts oceànics poden reduir o augmentar la barreja i difusió de larves i adults d'una manera significativa, afectant clarament a l'estructura de les poblacions (Schunter *et al.*, 2011a). D'aquesta manera, dues zones adjacents poden estar aïllades genèticament si estan localitzades a diferents costats d'un front oceànic (Galarza *et al.*, 2009), i dues zones distants poden estar connectades si existeix un corrent que els uneix (Mitarai *et al.*, 2009). Conèixer la dinàmica oceanogràfica pot, per tant, millorar la interpretació de l'estructura poblacional de qualsevol espècie, podent quantificar de forma més precisa la connectivitat entre les poblacions marines (Galindo *et al.*, 2006; Galarza *et al.*, 2009). Aquesta relació entre connectivitat y discontinuïtats oceanogràfiques i corrents pot estar molt influïda per les característiques biològiques i el comportament de les espècies. Aquestes característiques poden afectar a la seva disposició en la columna d'aigua, especialment durant el període larvari (Kelly, & Palumbi, 2010; White *et al.*, 2010).

El Mar Mediterrani és una conca marina semi-tancada, envoltada per grans masses continentals i connectades amb l'Oceà Atlàntic a través de l'Estret de Gibraltar. Els

patrons de circulació en el Mar Mediterrani són ben coneguts i les estructures ciclòniques/anticiclòniques han estat descrites per diversos autors (veure Millot, 1999, 2005; Fernández *et al.*, 2005). El Mar Mediterrani occidental està caracteritzat per una geomorfologia particular i una oceanografia associada condicionada per l'entrada de les aigües de l'Atlàntic a través de l'Estret de Gibraltar. Aquest règim de circulació origina tres discontinuïtats oceanogràfiques situades a la Península Ibèrica: l'Estret de Gibraltar, el Front Almeria-Oran i el Canal d'Eivissa. El flux de les aigües de l'Atlàntic a través de l'Estret de Gibraltar és el procés oceanogràfic més important entre l'Oceà Atlàntic i el Mar Mediterrani (Salat, 1996; Millot, 2005). Aquesta àrea està també influenciada per la topografia, ja que l'Estret té una profunditat de 284 m i una amplitud de 30 Km, arribant a una amplitud mínima de únicament 14 km a una profunditat de 880 m (Bryden, & Kinder, 1991). El Front Almeria-Oran (AOF) es troba situat aproximadament a 400 km a l'est de l'Estret de Gibraltar i connecta el principal influx d'aigua freda i de baixa salinitat provinent de l'Atlàntic amb el Mar Mediterrani. En funció de les condicions del hivern, el AOF pot decreïxer en la seva força o desaparèixer (Tintoré *et al.*, 1988). Pel que fa al IC, la desviació del Corrent del Nord cap a les Illes Balears ocorre a la primavera i l'inici de l'estiu i és causada per la formació d'un gir anticiclònic en el Canal d'Eivissa (IC) que dificulta el flux cap al sud, generant un efecte disruptiu en la circulació en la zona (Pinot *et al.*, 2002). Aquest gir, no obstant, no es forma després de hiverns relativament suaus amb temperatures per sobre dels tretze graus (López-Jurado *et al.*, 2008); en l'absència del qual la LPCC (Corrent Liguro-Provençal-Català) pot fluir cap al sud a través del canal.

Els crustacis decàpodes, per la seva diversitat i àmplia distribució, constitueixen un grup interessant d'estudi, sobretot en el Mediterrani i l'Atlàntic nord-oriental, on existeixen moltes discontinuïtats oceanogràfiques que poden afectar el flux gènic entre localitats (García-Merchán *et al.*, 2012). Els estudis d'aquests crustacis en la zona de l'Atlàntic nord-oriental i el Mar Mediterrani han augmentat en els últims anys tant amb marcadors mitocondrials com nuclears (Palero *et al.*, 2008; Palero *et al.*, 2011), indicant, en general, una baixa diferenciació genètica entre les localitats amb algunes excepcions (García-Merchán *et al.*, 2012). Uns estudis que es van fer d'aquests fronts amb set espècies de crustacis decàpodes van mostrar que el 2007 el AOF no actuava de barrera, tot i que es pensava que era la principal discontinuïtat oceanogràfica (Patarnello *et al.*, 2007), però que el GS i el IC sí que reduïen la connectivitat entre les poblacions, sobretot a *Liocarcinus depurator* (García-Merchán *et al.*, 2012). El 2009, en canvi, a *L. depurator* es va trobar que les tres barreres estaven tancades, impedit o reduint el flux gènic, arribant a la conclusió de que l'Estret de Gibraltar tenia un

efecte permanent mentre que l'efecte del Front-Almeria-Oran estava influenciat per una variabilitat interanual en la intensitat del front (García-Merchán, 2012).

En els últims anys s'ha vist un increment en l'estudi de l'estructura genètica temporal en invertebrats marins amb grans habilitats dispersives. A Calderón *et al.* (2012) fan un estudi temporal amb *P. lividus* als anys 2006 i 2008 en localitats properes a les del nostre estudi i troben variabilitat en el temps. Els factors, tals com les condicions ambientals i els corrents, poden canviar entre esdeveniments reproductors alterant considerablement les composicions genètiques de diferents generacions en una zona (Planes, & Lenfant, 2002). Com a conseqüència, l'intercanvi genètic entre poblacions pot ser variable a escala espacio-temporal, variant de un lloc o una generació a l'altre (Hellberg *et al.*, 2002).

Liocarcinus depurator (la falsa nècora) es distribueix al llarg de les costes de l'Atlàntic oriental des de Mauritània i les illes Canàries fins a les costes de Noruega, així com en tot el Mediterrani (Abelló, 2008). Tot i que el seu hàbitat preferencial són els fons de fang de la plataforma continental, el seu rang de distribució batimètrica va des de la zona sublitoral en algunes zones deltàiques fins, ocasionalment, profunditats de més de 1000m. Les seves majors densitats, no obstant, es localitzen a profunditats de menys de 100-200m. Aquesta espècie no té requeriments ecològics molt estrictes, el que fa que tingui un gran poder de colonització. No obstant, el seu punt feble en aigües mediterrànies sembla ser la seva reproducció, que al ser preferentment hivernal està sent afectada bastant negativament pel escalfament de les aigües en relació al canvi global, ja que, tot i que amb fluctuacions, la temperatura i la salinitat tendeixen a pujar al Mediterrani en els últims anys, des del 1900 fins el 2008 (Vargas-Yáñez *et al.*, 2010). S'han detectat disminucions significatives en la seva distribució i densitat poblacional en les últimes dècades, compensades per èxits en el reclutament durant els hiverns freds (Abelló, 2008).

L'ADN mitocondrial ha sigut el principal marcador utilitzat per avaluar esdeveniments passats i per descriure un panorama general del flux genètic entre les poblacions (Avice, 2000; Reece *et al.*, 2010). En el nostre cas hem fet servir el mtDNA tant per poder comparar amb els resultats d'altres anys (García-Merchán *et al.*, 2012; García-Merchán, 2012) com per la gran quantitat d'informació que ens proporciona aquest marcador. Les mostres d'estudis poblacionals, com ens ha passat amb *Liocarcinus*, no sempre s'agafen el mateix any i això podria provocar que els resultats no fossin correctes. Les mostres de García-Merchán *et al.* (2012) són majoritàriament del 2007, però Màlaga és del 2005, mentre que les mostres de García-Merchán (2012) són

majoritàriament del 2009 excepte Cadis i València, que són del 2010. Per tal de considerar si la diferenciació és espacial i/o temporal s'ha de fer un mostreig correcte. Les diferències entre poblacions que veiem podrien ser degudes a que els individus són d'anys diferents, per aquest motiu s'ha mostrejat el 2013 i analitzat amb el mtDNA per fer la comparativa.

L'objectiu d'aquest treball és estudiar l'estabilitat de les poblacions i l'efecte de les barreres oceanogràfiques al llarg del temps. Específicament, s'ha fet un estudi de mostres de *Liocarcinus depurator* (del 2013 de Cadis, Màlaga, Alacant, València i Delta amb el gen COI) per tal d'analitzar la diferenciació entre poblacions i mirar si les diverses barreres (Estret de Gibraltar, Front Almeria-Oran i Canal d'Eivissa) produeixen diferències significatives. A més a més, s'ha fet una posterior comparativa amb estudis previs publicats per García-Merchán *et al.* (2012) dels anys 2005-2007 i del 2009-2010 en García-Merchán (2012).

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. Material

Les mostres de *Liocarcinus depurator* que s'analitzen es van obtenir el 2013 a diferents punts de l'Atlàntic i el Mediterrani, els quals són: Cadis (CADI), Màlaga (WALB), Alacant (ALAC), València (VALE) i Delta (DELTA) (fig. 1) en dues campanyes: la campanya ARSA (Cadis) i la campanya MEDIT (Màlaga, Alacant, València i Delta). Les mostres ens les va proporcionar el Dr. Pere Abelló de l'ICM. Per tal d'estudiar aquesta espècie al llarg del temps es va fer l'extracció de DNA, amplificació i seqüenciació de les mostres seleccionades del 2013 i es van comparar els resultats amb els d'altres anys: 2005-2007 (García-Merchán *et al.*, 2012) i 2009-2010 (García-Merchán, 2012).

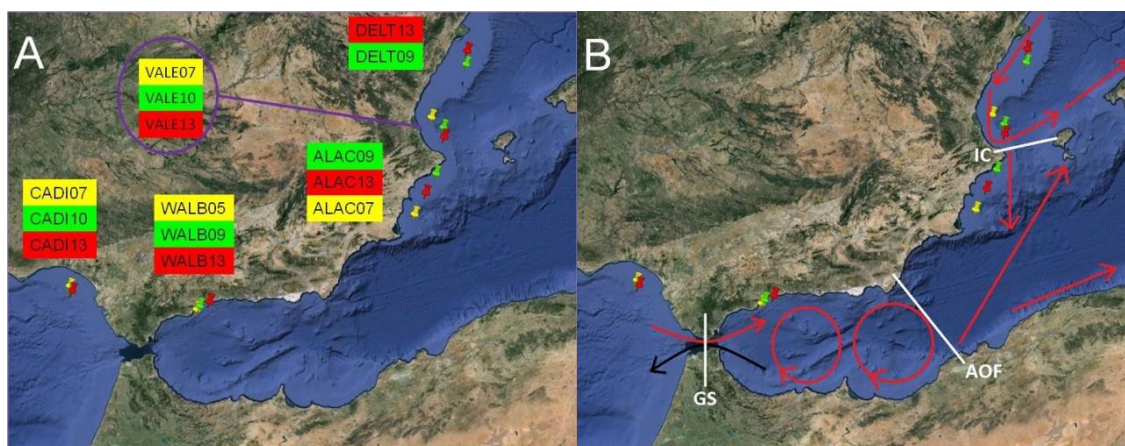


Fig. 1. Punts de la Península Ibèrica on s'han agafat mostres. A la figura A s'indiquen els noms dels llocs i els anys en que s'ha obtingut cada mostra. A la figura B es poden veure els fronts oceanogràfics amb línies blanques (GS: estret de Gibraltar, AOF: front Almeria-Oran, IC: canal d'Eivissa) i les fletxes que representen els corrents, sent les vermelles els corrents superficials que entren de l'Atlàntic i la negra l'aigua en profunditat que surt del Mediterrani. En vermell les mostres analitzades en aquest treball, en groc les mostres analitzades a García-Merchán *et al.* (2012) i en verd les mostres analitzades a García-Merchán (2012).

Les mostres de *L. depurator* (N=147) analitzades del 2013 van ser obtingudes a 5 localitats diferents (taula 1): Cadis (CADI), Màlaga (WALB), Alacant (ALAC), València (VALE) i Delta (DELTA). Es va procurar limitar un rang de latituds i longituds no molt ampli a cada zona de mostreig. El rang de mida és quelcom molt important, ja que ens indica l'edat de l'individu. Nosaltres els volíem tots de la mateixa edat, motiu pel qual el 93% de les mostres mesuren entre 30 i 50mm, tot i que a vegades ens vam sortir del rang perquè no teníem mostres suficients.

Taula 1. Número d'individus (número d'haplotips), diversitat haplotípica, diversitat nucleotídica, rangs de mida, latitud i longitud de cada sector.

	N(H)	h	π	Rang mida (mm)	Rang LAT	Rang LONG
CADI	32 (13)	0,877 ± 0,037	0,0045 ± 0,0005	27 a 50	36,2618 a 36,9822	-7,2362 a -6,5340
WALB	32 (12)	0,817 ± 0,053	0,0043 ± 0,0005	31 a 54	36,5892 a 36,7103	-4,4523 a -3,5888
ALAC	30 (9)	0,600 ± 0,103	0,0026 ± 0,0007	20 a 48	37,7223 a 38,5247	-0,5330 a -0,0025
VALE	26 (6)	0,354 ± 0,119	0,0016 ± 0,0007	32 a 46	38,8167 a 39,3328	-0,1237 a 0,2763
DELT	27 (4)	0,430 ± 0,103	0,0017 ± 0,0007	35 a 46	40,0177 a 40,5280	0,5603 a 1,0113
Total	147 (26)	0,616 ± 0,083	0,0029 ± 0,0006			

Analitzem aquestes mostres amb el gen COI (Citocrom oxidasa I) perquè els estudis anteriors es van dur a terme amb aquest gen, ja que és un gen mitocondrial, el que permet fer amplificació i seqüenciació directes. La seqüència del gen COI es fa servir per identificar espècies com si fos un codi de barres (Hebert *et al.*, 2003), ja que la seva taxa de mutació és suficientment ràpida com per distingir espècies amb un parentesc molt proper.

2.2. Extracció i seqüenciació de les mostres

Primer de tot es va fer l'extracció de DNA fent servir el protocol del QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen Inc). S'amplifica un fragment del gen mitocondrial COI fent servir els *primers* universals LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') i HC02198 (5'-TAAA CTTGAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Aquests *primers* es fan servir per obtenir les seqüències del codi de barres descrit anteriorment. Les amplificacions es fan de 20µL, amb 19µL de barreja i 1µL de DNA. La barreja consta de: 12.7 µL H₂O ECOLAV, 4 µL buffer (x5), 1 µL MgCl₂ (25mM), 0.5 µL dNTPs cada un (1mM), 0.4 µL *primer* F (LCO1490, 10µM), 0.4 µL *primer* R (HC02198, 10µM) i 0.2 µL GoTaq (5U/µL). El protocol d'amplificació emprat és: 4 min a 94°C; 30 cicles de 1min a 94°C, 1min a 48°C, 1min a 72°C i extensió final de 7min a 72°C. Per acabar, es baixa la temperatura a 4°C fins que es recullen els eppendorfs.

Per a la visualització es fan gels al 1.2% d'agarosa amb TBE (0.5X Tris Boric EDTA). A cada pouet es posa una barreja de 2 μ L de LB (Loading Buffer) i GelRed i 2 μ L de mostra (DNA de la extracció o de l'amplificació). Els gels es deixen córrer durant 20-30 minuts a 120V aproximadament.

La neteja de les amplificacions que es duen a seqüenciar es fa barrejant ExoSAP (1.2U d'Exonucleasa i 1.2U de Fosfatasa alcalina de gamba) amb les amplificacions en una proporció de 1:2. La barreja es posa 15min a 37°C (temperatura on actuen els enzims) i 15min a 50°C (xoc tèrmic per inactivar els enzims). S'afegeix 1 μ L de *primer* LCO1490 i s'envia a seqüenciar a MacroGen Inc (*primer* 25 μ M) o al Servei Científic i Tècnic de la Universitat de Barcelona (*primer* 5 μ M), segons escaigui.

2.3. Anàlisi de dades

Per tal de poder comparar els nostres resultats amb els d'altres anys es tallen totes les seqüències fent servir una seqüència prèvia de García-Merchán (2012) com a patró de referència, quedant seqüències de 527bp. Per tant, les seqüències s'importen amb el SeqMan (DNASStar), s'alineen, es mira que els pics hagin sortit bé i es tallen tal com hem indicat prèviament. Això es guarda en format FASTA en un únic fitxer. Les seqüències s'ordenen amb el BioEdit (Hall, 1999) per població, des de Cadis fins a Delta.

Les seqüències s'analitzen amb el DnaSP (Librado, & Rozas, 2009) per saber la diversitat haplotípica (h) i nucleotídica (π) i les seves desviacions estàndard. La xarxa haplotípica es fa amb el Network v4.612 (fluxus-engineering.com) fent servir l'algoritme Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999). La xarxa ens mostra la relació entre seqüències haplotípiques i ens permet examinar la partició geogràfica de les dades. La diferenciació genètica entre els llocs de mostreig s'estima amb els valors de la Γ_{ST} , que sabem si són significatius o no segons la seva probabilitat S_{nn} a través del test de permutació (Hudson, 2000), obtinguts amb el DnaSP. També fem un test exacte de Fisher (vassarstats.net) per saber si les diferències al llarg del temps són o no significatives. Tant Γ_{ST} com Fisher es fan de manera global per totes les poblacions i per parelles de poblacions, per saber entre quins anys es veuen les diferències.

Amb el GenAlex v6.5 (Peakall, & Smouse, 2012) vam fer un test de Mantel que correlaciona la distància genètica (Γ_{ST}) i la distància geogràfica per la costa (km) per saber si hi ha aïllament per distància. Amb una correlació entre h i π sabem si

podem fer servir la diversitat haplotípica o la nucleotídica indistintament (STATISTICA v8.0). També es mira com varia la diversitat haplotípica al llarg del temps i es comparen els valors de Γ_{ST} entre poblacions contigües per saber l'estat de les barreres oceanogràfiques segons l'any de recollida de les mostres.

Finalment es mira l'haplogrup al que pertanyen els diferents individus segons el seu caràcter Atlàntic o Mediterrani amb l'Structure 2.3.4 (Hubisz *et al.*, 2009), ja que en treballs previs s'havien identificat dos grups clarament diferenciats que corresponen a aquestes dues unitats (García-Merchán, 2012). Es defineix $K=2$ i es determina l'haplogrup de cada individu segons si la probabilitat de ser d'aquell grup es major al 50%. Per acabar es fa un anàlisi de coordenades principals amb el GenAlex per veure la relació de totes les poblacions segons les distàncies genètiques entre parelles de poblacions.

3. RESULTATS

3.1. Anàlisi poblacional de mostres del 2013

En els 147 individus analitzats del 2013 hem trobat 26 haplotips diferents (*taula S1*). Els haplotips més freqüents són el H_3 (sobretot individus de Cadis i Màlaga) i el H_2 (majorment individus d'Alacant, València i Delta). La xarxa ens mostra la relació que hi ha entre els diferents haplotips i ens permet observar la partició geogràfica de les dades on la mida de cada cercle es proporcional al número d'individus d'aquell haplotip i els colors identifiquen cada població (*fig. 2*). El número de canvis és proporcional a les longituds de les línies. Els punts mv són haplotips necessaris però que no hem trobat.

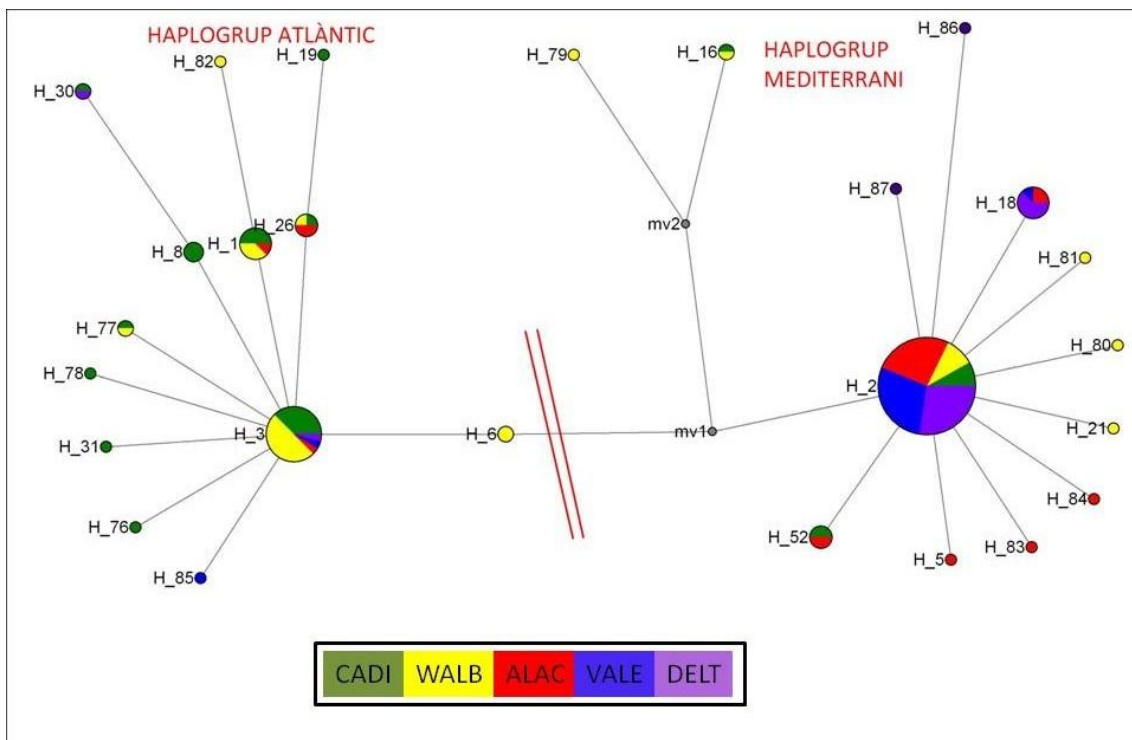


Fig. 2. Xarxa haplotípica dels individus analitzats del 2013. Els individus de Cadis es mostren en verd, Màlaga en groc, Alacant en vermell, València en blau i Delta en porpra.

Es va decidir que un haplotip pertanyia a un haplogrup concret quan la probabilitat de ser d'aquell haplogrup era major del 50% (això es va mirar amb el programa STRUCTURE considerant que hi ha dos grups diferents, sent K=2). El que s'anomena

haplogrup Atlàntic està format majoritàriament per individus de Cadis i Màlaga i l'haplogrup Mediterrani per Alacant, València i Delta (*fig. 2*).

Amb el Γ_{ST} per parelles de poblacions podem saber si la distància entre elles és elevada. La diferència genètica es considera significativa quan el p-valor de l'estadístic S_{nn} és inferior a 0,05 (*taula 2*). Els valors ens indiquen que els individus de Cadis i Màlaga són genèticament diferents als d'Alacant, València i Delta.

Taula 2. Valors de Γ_{ST} (semi-matriu inferior) i p-valor de la S_{nn} (matri superior) a partir del PM de les mostres del 2013. En negreta estan marcats els p-valors de la S_{nn} significatius.

	CADI	WALB	ALAC	VALE	DELT
CADI	0	0,523	0,000	0,000	0,000
WALB	0,013	0	0,000	0,000	0,000
ALAC	0,226	0,177	0	0,445	0,332
VALE	0,282	0,229	0,013	0	0,457
DELT	0,286	0,235	0,018	0,018	0

També es fa un test de Mantel, el qual correlaciona la distància genètica (Γ_{ST}) i la distància geogràfica per la costa (en quilòmetres) entre les diferents poblacions (*fig. 3*). L'elevada correlació i el valor de P (és significatiu) ens indica que hi ha aïllament per distància, per tant, a més distància geogràfica més distància genètica.

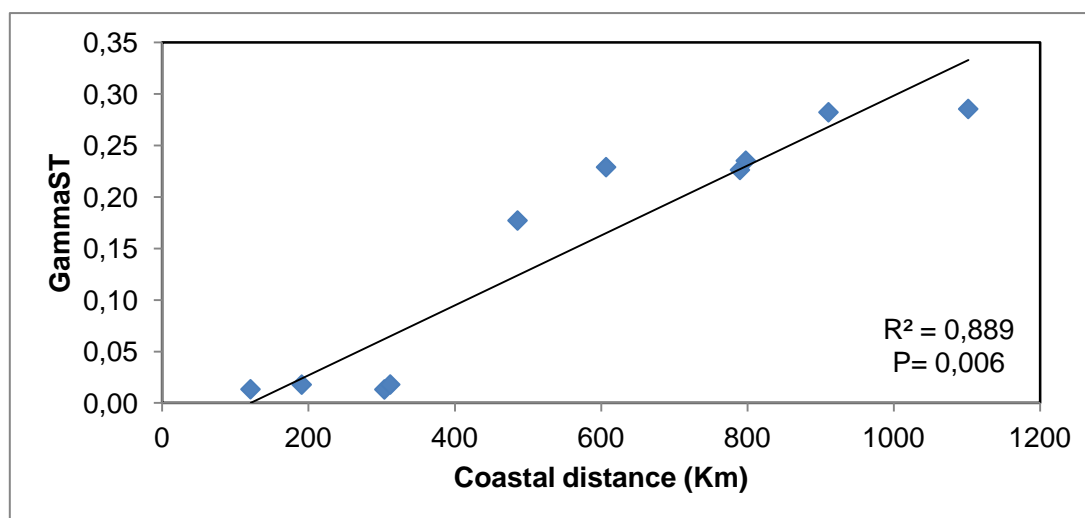


Fig. 3. Correlació amb el test de Mantel entre la matriu de distància genètica (Γ_{ST}) i matriu de la distància geogràfica entre parelles de poblacions.

3.2. Comparativa dins d'una mateixa població al llarg dels anys

Per treballar amb les dades obtingudes primer mirarem si hi ha correlació entre diversitat haplotípica (h) i diversitat nucleotídica (π) entre les cinc poblacions a cada estudi que identificarem amb l'any de la major part de les mostres (*fig. 4*). Les mostres que anomenem del 2007 són de García-Merchán *et al.* (2012), majoritàriament són agafades el 2007 a excepció de les de Màlaga que són del 2005, i les del 2009 de García-Merchán (2012), que les de Màlaga, Alacant i Delta són del 2009 i les de Cadis i València són del 2010.

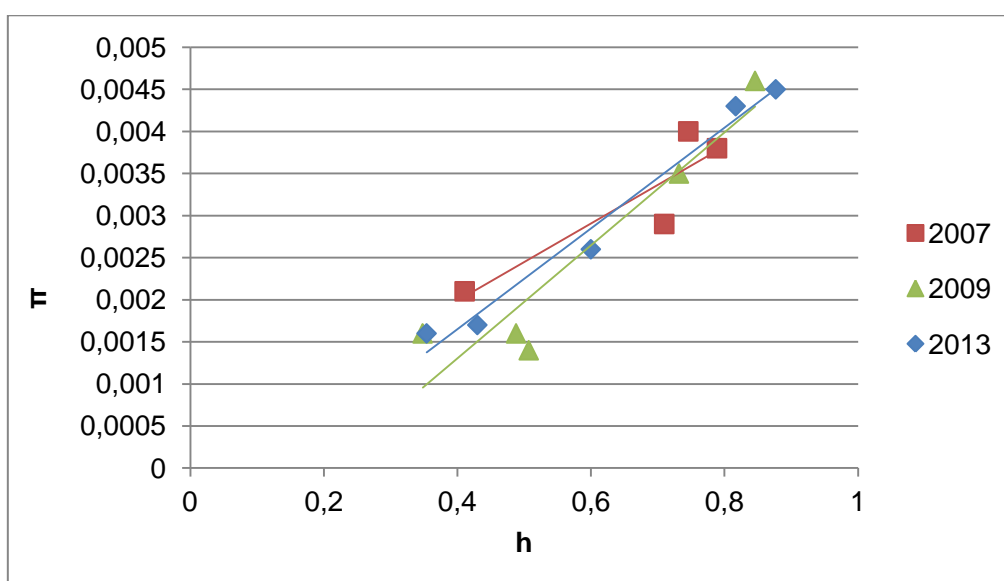


Fig. 4. Correlació entre la diversitat haplotípica i la nucleotídica en els tres anys.

S'observa una bona correlació entre h i π els tres anys, per tant podem treballar tant amb una diversitat com amb l'altra. Es podria dir que en el 2007 el valor de correlació no és significatiu, però això és degut a que ens falta la zona de Delta, si la tinguéssim ho seria, per tant, ho donem per bo.

Mirem la diversitat haplotípica a cada localitat els diferents anys (*fig. 5*). On hi ha més diversitat (superior a 0,7) és a Màlaga els tres anys, a Cadis el 2007 i 2013, a Alacant el 2007 i a València el 2009 (mostrejada el 2010). Delta té baixa diversitat tots els anys.

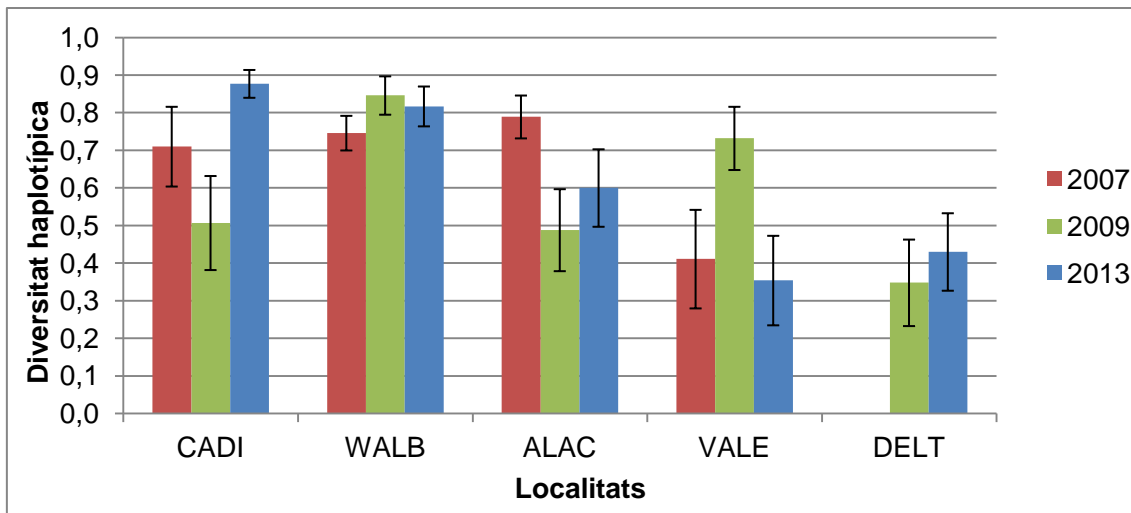


Fig. 5. Diversitat haplotípica i desviació estàndard a les diferents zones de mostreig al llarg del temps.

3.3. Comparativa entre poblacions al llarg del temps

Es miren les distàncies genètiques (Γ_{ST}) en cada població durant els anys que es van recollir les mostres i es fa un test exacte de Fisher per cadascuna (taula 3). Un cop hem mirat cada població de manera global, aquelles en que hem trobat diferències es comparen per parelles, mirant els anys de dos en dos d'una mateixa població. S'observen diferències a Cadis i Alacant, els quals es compararan per parelles d'anys. Veiem diferenciació genètica significativa a Cadis entre el 2010 i el 2013 i a Alacant entre el 2007 i els altres anys (2009 i 2013).

Taula 3. Γ_{ST} , Snn (p-valor) i Fisher (p-valor). A la meitat inferior només hem posat els anys i zones de mostreig que tenen valors significatius (en negreta).

	Γ_{ST}	Snn (p-valor)	Fisher (p-valor)
CADI	0,065	0,033	0,00625
WALB	0,010	0,607	1
ALAC	0,154	0,003	0,00014
VALE	0,045	0,071	0,12127
DELT	0,012	0,484	0,66874
CADI1013	0,075	0,000	0,00698
ALAC0709	0,207	0,000	0,00014
ALAC0713	0,134	0,003	0,00365

3.4. Efecte dels fronts

Observant el Γ_{ST} entre poblacions contigües podrem saber quins fronts eren actius aquells anys, és a dir, si feien de barrera o si els crancs passaven sense problemes (fig. 6). Un valor de S_{nn} inferior a 0,05 (significatiu) ens indica que hi ha diferència genètica entre aquelles poblacions i, per tant, el front estava tancat aquell any. Podem observar valors significatius en el 2007 en el GS i IC, en el 2009 per tots tres fronts (GS, AOF i IC) i en el 2013 només per AOF. Falta el NF en el 2007 perquè no tenim dades de Delta d'aquell any i el NF es fa comparant València i Delta.

Tots els fronts sembla que representin una barrera almenys dos anys. Es pot veure que GS i IC les diferències són significatives els mateixos anys. El valor de Γ_{ST} més elevat és 0,268 el 2009 al AOF i el valor més petit és 0,013 el 2013 tant al GS com al IC.

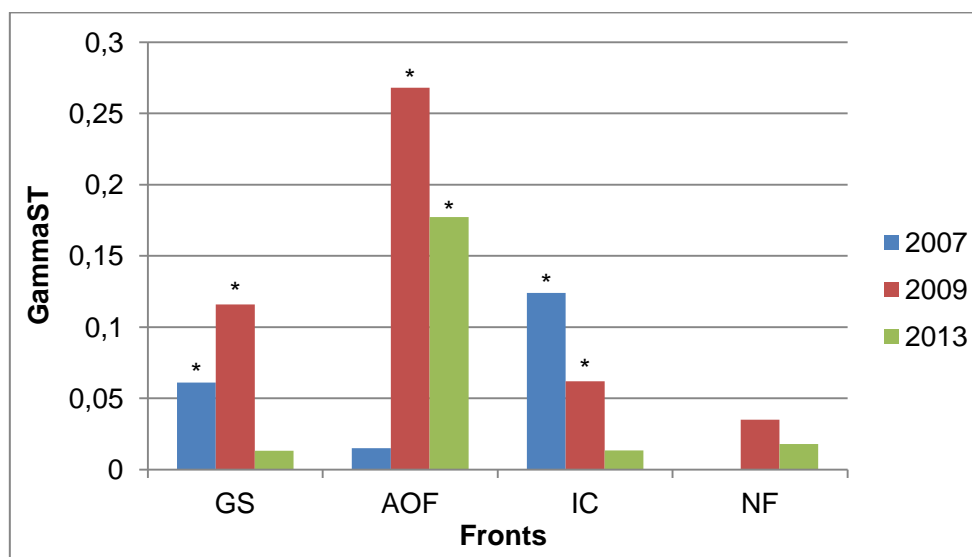


Fig. 6. Comparativa entre poblacions contigües (Γ_{ST}). GS és l'estret de Gibraltar (Cadis i Màlaga), AOF el front d'Almeria-Oràn (Màlaga i Alacant), IC el canal d'Eivissa (Alacant i València) i NF l'absència de front (València i Delta). Els valors significatius estan marcats amb un * sent $S_{nn} p < 0,05$.

Tot seguit es mira el percentatge d'individus Atlàntics i Mediterranis que tenim i els agrupem segons la zona de mostreig i l'any de recollida de la mostra (fig. 7). Tots els descrits com a ATL tenen una probabilitat major a 0,7 a pertànyer a l'haplogrup Atlàntic segons el programa STRUCTURE i el 98% dels MED (haplogrup Mediterrani) major a 0,9.

A Cadis i Màlaga la predominança és Atlàntica i a Alacant, València i Delta és Mediterrània, tot i que a Alacant el 2007 hi va haver més individus Atlàntics (55% ATL). De predominança Atlàntica, Cadis en tenia més del 90% excepte el 2013 que té el 72%. Màlaga tots els anys té al voltant del 60% d'individus Atlàntics. Totes les localitats amb predominança Mediterrània tenen més del 80% excepte València l'any 2010 que en té el 69%.

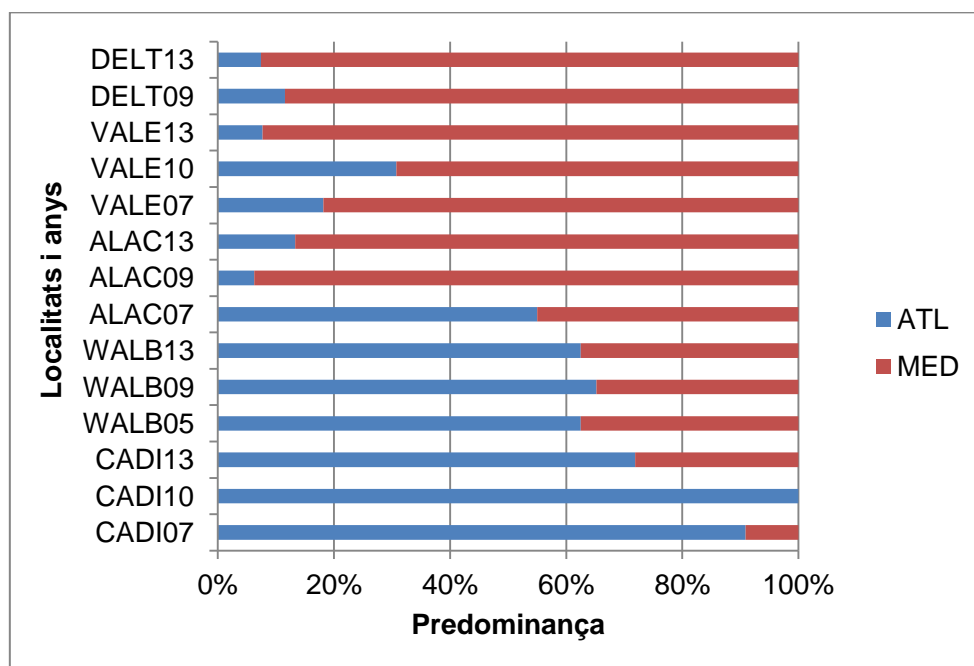


Fig. 7. Percentatge d'individus amb haplogrup Atlàntic o Mediterrani en cada població i any.

Finalment, un anàlisi de coordenades principals ens situa les mostres de diferents anys en un espai bidimensional a partir de la matriu de distàncies genètiques (Γ_{ST} de totes les poblacions i tots els anys) mostrant la relació entre les diferents poblacions (fig. 8). La component 1 és la més important perquè ens explica el 90% de les relacions entre les poblacions. C1 ens separa visualment les poblacions amb influència Atlàntica de les d'influència Mediterrània. Podem veure que les mostres de Màlaga són molt estables al llarg del temps (es troben juntes). València i Delta, tot i estar una mica separats els diferents anys, es pot considerar que no són genèticament diferents (taula 3). Cadis i Alacant estan més disperses, sent Cadis del 2013 i Alacant del 2007 les més semblants a Màlaga.

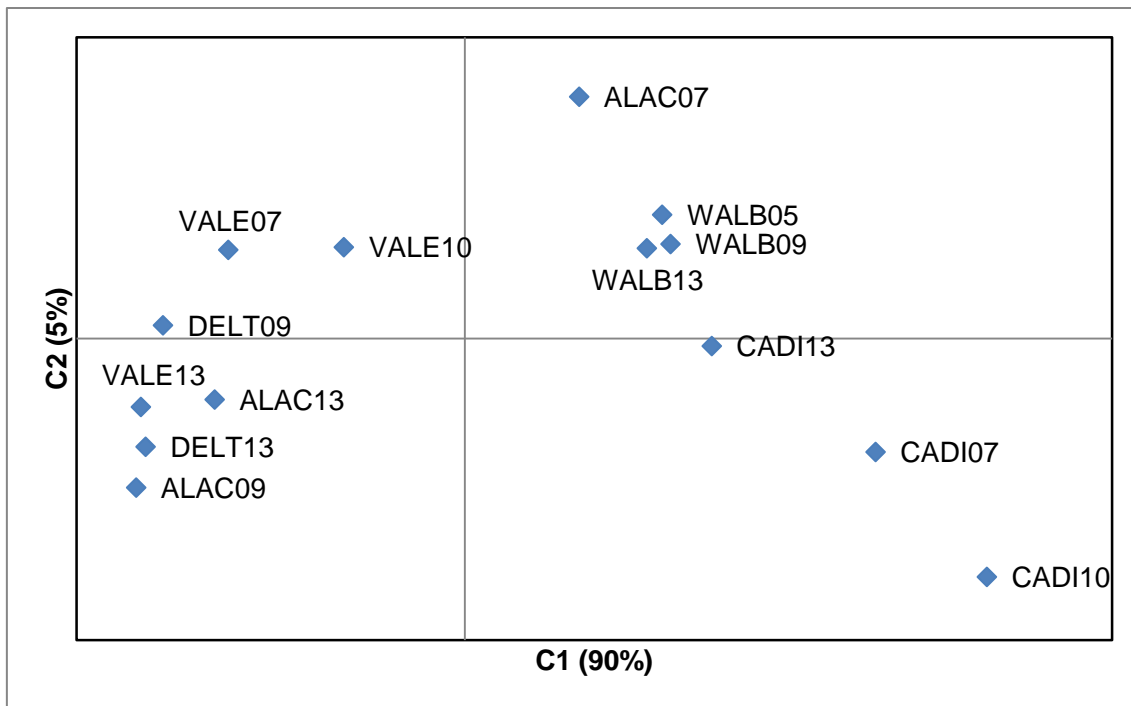


Fig. 8. Anàlisi de coordenades principals (PCoA).

4. DISCUSSIÓ

Per tal d'estudiar l'efecte de les barreres oceanogràfiques de l'Atlàntic i el Mediterrani al llarg del temps es van agafar mostres de *Liocarcinus depurator* al llarg de diversos anys. Estudiant l'estabilitat de les poblacions hem fet una comparativa en el temps i l'espai per intentar entendre el comportament de tres barreres: l'estret de Gibraltar (GS), el front d'Almeria-Oran (AOF) i el canal d'Eivissa (IC). La majoria de la recerca en estructura genètica d'espècies marines s'ha centrat en l'efecte del GS i AOF (Patarnello *et al.*, 2007; Galarza *et al.*, 2009). El IC es va estudiar amb *Epinephelus marginatus* i no es va veure cap efecte significatiu (Schunter *et al.*, 2011b), però en canvi *Serranus cabrilla* sí es veu afectat per les discontinuïtats del AOF i el IC (Schunter *et al.*, 2011a). En el cas de *L. depurator* es va veure diferenciació genètica entre poblacions separades per els tres fronts, però sols en alguns dels anys estudiats.

Amb un Γ_{ST} i un test de Fisher observem diferenciació genètica a Cadis i Alacant al llarg del temps a *L. depurator*. A Calderón *et al.* (2012) troben variabilitat entre l'any 2006 i el 2008 a Cadis, Carboneres i Jàvea amb *P. lividus*, en el cas de Carboneres caldria destacar que els individus d'ambdós anys no compartien cap haplotip. La seva hipòtesi és que la variabilitat temporal pot estar lligada a canvis en els patrons dels corrents, a diferències en l'èxit en la reproducció o una combinació d'aquests i altres factors. Aquestes poblacions es podrien correspondre a les de Cadis, Alacant i València de *L. depurator*, encara que Carboneres està més propera que Alacant de la part nord del AOF. A l'anàlisi de coordenades principals podem veure com els individus de Cadis del 2013 i els d'Alacant del 2007 s'assemblen als de Màlaga de tots tres anys (*fig. 8*). Els percentatges d'aquests individus de pertànyer a un haplogrup o a un altre també són semblants (*fig. 7*). Amb aquest anàlisi podem deduir que el GS va estar obert en direcció est-oest el 2013, ja que hi ha una major freqüència d'individus amb haplogrup Mediterrani i per això els individus de Cadis del 2013 estan a prop dels de Màlaga. Quan el front GS està tancat (2007 i 2009) a Cadis hi ha més predominança Atlàntica (90% i 100% respectivament), però quan està obert (2013) n'hi ha un 72%, ja entra aigua del Mediterrani. De la mateixa manera deduïm que AOF no va actuar de barrera al 2007 en direcció sud-nord, perquè Alacant té una major freqüència d'individus amb haplogrup Atlàntic. Els altres dos anys a Alacant, juntament amb València i Delta, la predominança és clarament Mediterrània, tot i que el 2010 València només tenia un 69% d'individus Mediterranis. Que no hi hagi diferència entre València i Delta és normal perquè no hi ha front entre aquestes dues

localitats, tot i que València al 2010 és una mica més Atlàntica que les altres. A Màlaga la predominança és Atlàntica i sempre està al voltant del 60%, pel que podríem dir que l'entrada d'aigua Atlàntica a través del GS i d'aigua Mediterrània a través del AOF és estable.

Les diferències entre anys poden ser degudes a l'efecte asimètric dels corrents sobre els fronts. El GS té un flux d'entrada d'aigua superficial (profunditat màxima al voltant dels 100m) al Mediterrani, mentre que la sortida d'aigua en profunditat cap a l'Atlàntic (Milot, 2005). Amb els nostres resultats podem deduir que l'entrada superficial d'aigua al Mediterrani és constant, mentre que la sortida a l'Atlàntic varia segons l'any. Contràriament, el AOF i el IC, segons els resultats trobats, tindrien una sortida constant nord-sud (d'Alacant a Màlaga i de València a Alacant respectivament) i una entrada sud-nord variable. Altres hipòtesis per explicar la variabilitat genètica entre poblacions estan relacionades amb les característiques biològiques i el comportament de les espècies, per exemple la seva capacitat de reproduir-se amb èxit els individus de diferents localitats. Per moltes espècies s'ha observat que l'estructuració genètica es defineix per la influència de les condicions d'alta salinitat i temperatura de les aigües Atlàntiques i les Mediterrànies, pel que es podria considerar la possibilitat de que hi hagués selecció natural (Patarnello *et al.*, 2007; Palero *et al.*, 2008). Per tant, s'ha de tenir en compte com afecten la temperatura i la salinitat les quals, tot i que amb fluctuacions, tendeixen a pujar amb el temps (Vargas-Yáñez *et al.*, 2010).

5. CONCLUSIONS

En el nostre estudi genètic de les cinc poblacions mostrejades el 2013 es veu una clara diferència entre els individus de Cadis i Màlaga, els quals tenen una gran influència Atlàntica, envers el d'Alacant, València i Delta, majorment Mediterranis, el qual ens fa pensar en la gran importància del AOF com a barrera oceanogràfica.

Trobem aïllament per distància, ja que a major distància geogràfica hi ha major distància genètica.

El flux gènic a través dels anys és majoritàriament unidireccional. A GS el flux és constant oest-est, al AOF i IC és constant nord-sud i la resta són variables.

Al llarg del temps observem diferències a Cadis i Alacant. Sembla que GS el 2013 i AOF el 2007 deixaven passar aigua en ambdues direccions i, per aquest motiu, les poblacions de Cadis i Alacant s'assemblen a les de Màlaga aquells anys.

Després de veure com varia la diversitat haplotípica a les diferents localitats al llarg del temps, de la mateixa manera que la predominança Atlàntica o Mediterrània de cadascuna podem concloure que les poblacions no són estables al llarg del temps.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abelló, P. (2008). "Los crustáceos" en: E. Macpherson, A. Garcia-Rubies, M. Demestre, R. Villanueva, P. Abelló & M. Ramón, La riqueza de nuestros mares: especies de interés del sector pesquero español, pp. 474-637. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación – Secretaría General de Pesca Marítima, Madrid.
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bandelt, H.J.; Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Bryden, H. L. & Kinder, T. H. (1991). Steady two-layer exchange through the Strait of Gibraltar. *Deep-Sea Research* 38(S1): S445-S463.
- Calderón, I.; Pita, L.; Brusciotti, S.; Palacín, C. & Turon, X. (2012). Time and space: genetic structure of the cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* in Western Mediterranean. *Marine Biology* 159: 187 – 197.
- Fernandez, V.; Dietrich, D.E.; Haney, R.L. & Tintore, J. (2005). Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Progress in Oceanography* 66: 321–340.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Galarza, J.; Carreras-Carbonell, J.; Macpherson, E.; Pascual, M.; Roques, S.; Turner, G. & Ciro, R. (2009). The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1473–1478.
- Galindo, H.M.; Olson, D.B. & Palumbi, S.R. (2006). Seascape genetics: A coupled oceanographic genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Current Biology* 16: 1622–1626.

- García-Merchán, V. H. (2012). *Estructura genètica poblacional y discontinuidades oceanogràfiques en crustàceos decàpodos*. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona.
- García-Merchán, V. H.; Robainas-Barcia, A.; Abelló, P.; Macpherson, E.; Palero, F.; García-Rodríguez, M.; Gil de Sola, L. & Pascual, M. (2012). Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic-Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 664-672.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B. Sciences* 270: 313-321.
- Hellberg, M.E.; Burton, R.S.; Neigel, J.E. & Palumbi S.R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70: 273–290.
- Hubisz, M.; Falush, D.; Stephens, M. & Pritchard, J. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- Hudson, R.R. (2000). A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011–2014.
- Kelly, R.P. & Palumbi, S.R. (2010). Genetic structure among 50 species of the northeastern pacific rocky intertidal community. *PLoS One* 5: 1–13.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- López-Jurado, J.L.; Marcos, M. & Monserrat, S. (2008). Hydrographic conditions affecting two fishing grounds of Mallorca island (Western Mediterranean): during the IDEA Project (2003–2004). *Journal of Marine Systems* 71: 303–315.
- Millot, C. (1999). Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems* 20: 423–442.

- Millot, C. (2005). Circulation in the Mediterranean Sea: evidences, debates and unanswered questions. *Scientia Marina* 69: 5–21.
- Mitarai, S.; Siegel, D. A.; Watson, J. R.; Dong, C. & McWilliams, J. C. (2009). Quantifying connectivity in the coastal ocean with application to the Southern California Bight. *Journal of Geophysical Research* 114: C10026.
- Palero, F.; Abelló, P.; Macpherson, E.; Gristina, M. & Pascual, M. (2008). Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 708–717.
- Palero, F.; Abelló, P.; Macpherson, E.; Beaumont, M. & Pascual, M. (2011). Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 407–418
- Patarnello, T.; Volckaert, J. & Castilho, R. (2007). Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology* 16: 4426–4444.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pinot, J.M.; López-Jurado, J.L. & Riera, M. (2002). The Canales experiment (1996–1998). Interannual, seasonal and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Progress in Oceanography* 55: 335–370.
- Planes, S. & Lenfant, P. (2002). Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Molecular Ecology* 11: 1515–1524.
- Reece, J.S.; Bowen, B.W.; Joshi, K.; Goz, V. & Larson, A. (2010). Phylogeography of Two Moray Eels Indicates High Dispersal Throughout the Indo-Pacific. *Journal of Heredity* 101: 391– 402.
- Salat, J. (1996). Review of hydrographic environmental factors that may influence anchovy habitats in northwestern Mediterranean. *Scientia Marina* 60(S2): 21–32.

- Schunter, C.; Carreras-Carbonell, J.; Macpherson, E.; Tintoré, J.; Vidal-Vijande, E.; Pascual, A.; Guidetti, P. & Pascual, M. (2011a). Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology* 20: 5167-5181
- Schunter, C.; Carreras-Carbonell, J.; Planes, S., Sala, E.; Ballesteros, E.; Zabala, M.; Harmelin, J.G.; Harmelin-Vivien, M., Macpherson, E. & Pascual, M. (2011b). Population connectivity in a commercial and endangered species: the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401:126–133.
- Tintoré, J.; La Violette, P. E.; Blade, I. & Cruzado, A. (1988). A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: the Almeria-Oran front. *Journal of Physical Oceanography* 18: 1384–1397.
- Vargas-Yáñez, M.; Moya, F.; García-Martínez, M. C.; Tel, E.; Zunino, P.; Plaza, F.; Salat, J.; Pascual, J.; López-Jurado, J.L. & Serra, M. (2010). Climate change in the Western Mediterranean Sea 1900-2008. *Journal of Marine Systems* 82: 171-176.
- White, C.; Selkoe, K.A.; Watson, J.; Siegel, D.A.; Zacherl, D.C. & Toonen, R.J. (2010). Ocean current help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 277: 1685–1694.

7. ANNEX

Taula suplementària 1. Haplotips trobats en els individus del 2013 a cada localitat. Els noms es corresponen als haplotips trobats en anys anteriors, sent les del 2007 de García-Merchán *et al.* (2012) i les del 2009 de García-Merchán (2012).

Haplotip:	CADI13	WALB13	ALAC13	VALE13	DELT13
H_1	4	3	1		
H_2	6	7	19	21	20
H_3	9	12	1	1	1
H_5			1		
H_6		2			
H_8	3				
H_16	1	1			
H_18			2	1	5
H_19	1				
H_21		1			
H_26	1	1	2		
H_30	1				1
H_31	1				
H_52	2		2		
H_76	1				
H_77	1	1			
H_78	1				
H_79		1			
H_80		1			
H_81		1			
H_82		1			
H_83			1		
H_84			1		
H_85				1	
H_86				1	
H_87				1	