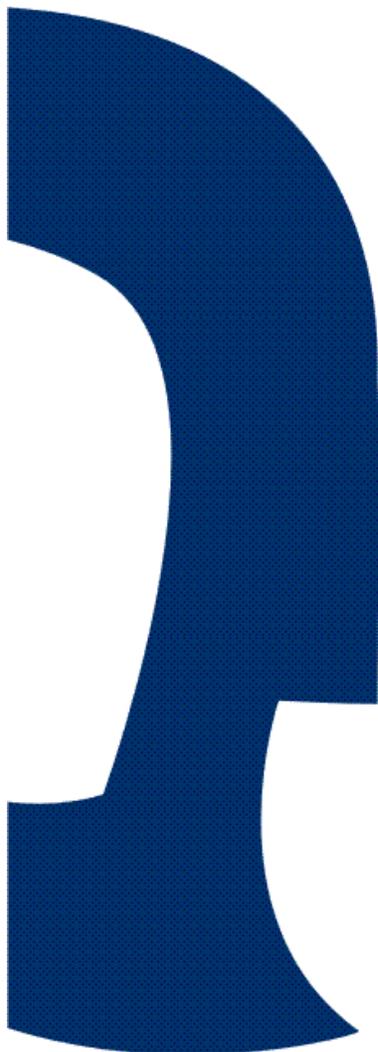


TÍTULO DEL TFT

El uso de la información genética en la gestión de la biodiversidad marina de islas oceánicas: el cangrejo moro *Grapsus adscensionis* en la Macaronesia



Autor: Pablo Manent Sintes

Curso 2013/2014

Nombre tutor/es:

Nieves González Henríquez

José Juan Castro Hernández

Trabajo Fin de Título para la obtención
del Máster en Gestión Costera

TÍTULO: El uso de la información genética en la gestión de la biodiversidad marina de islas oceánicas: el cangrejo moro *Grapsus adscensionis* en la macaronesia.

Proyecto que financió el trabajo final de Máster: *BIOTECMAR: Procedimientos y protocolos para la Gestión Sostenible de la Biodiversidad Marina*. Programa de Cooperación Transnacional PCT-MAC 2007-2013.

Autor: Pablo Manent Sintés

Titulación en curso: Máster de Gestión Costera

Tutora: Dra. Nieves González Henríquez
Coordinadora de programas ACIISI

Co-tutor: Dr. José Juan Castro Hernández
Departamento de Biología, ULPGC

Fdo. Pablo Manent Sintés

Fdo. Nieves González Henríquez

TÍTULO: El uso de la información genética en la gestión de la biodiversidad marina de islas oceánicas: el cangrejo moro *Grapsus adscensionis* en la macaronesia.

Proyecto que financió el trabajo final de Máster: *BIOTECMAR: Procedimientos y protocolos para la Gestión Sostenible de la Biodiversidad Marina*. Programa de Cooperación Transnacional PCT-MAC 2007-2013.

Autor: Pablo Manent Sintés

DNI:

Titulación en curso: Máster de Gestión Costera

Tutora: Dra. Nieves González Henríquez

Coordinadora de programas ACIISI

Co-tutor: Dr. José Juan Castro Hernández

Departamento de Biología, ULPGC

Fdo. Pablo Manent Sintés

Castro Hernández

Fdo. Nieves González Henríquez

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Los archipiélagos macaronésicos.....	5
1.2 Las corrientes marinas predominantes en la región de estudio.....	6
1.3 Colonización, aislamiento y estructuración genética en islas oceánicas.....	7
1.4 Marcadores genéticos y su utilidad en el análisis de la biodiversidad.....	10
1.5 Conservación de la biodiversidad en el medio marino.....	11
1.6 Objetivos del trabajo.....	14
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
2.1 Especie modelo de estudio.....	15
2.2 <i>Localización del estudio y recolección de las muestras</i>	16
2.3 Procesado genético de las muestras en el laboratorio.....	16
2.3.1 Aislamiento del ADN.....	17
2.3.2 Amplificación, purificación del producto de PCR y reacción de secuenciación.....	17
2.3.3 Reacción de secuenciación.....	19
2.3.4 Purificación de la reacción de secuenciación y secuenciación.....	19
2.4 Análisis de datos de secuencias nucleotídicas de ADN mitocondrial.....	19
2.4.1 Diversidad, diferenciación y estructura genética.....	20
2.4.2 Red de haplotipos.....	20

3. RESULTADOS.....	21
3.1 Aislamiento de ADN genómico total.....	21
3.2 Diversidad genética poblacional (intra-archipiélago).....	22
3.3 Diferenciación genética y Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA).....	23
3.4 Red de haplotipos.....	25
4. DISCUSIÓN.....	25
5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

La información genética como una herramienta de inferencia de procesos evolutivos que han operado en combinación con los mecanismos de dispersión y las condiciones oceanográficas puede ser útil para detectar la distribución geográfica actual de la variación genética y utilizarla con fines conservacionistas, atendiendo a la biodiversidad como una unidad compleja y jerárquica, cuyos niveles jerárquicos están interconectados a través de sus atributos (variación genética), procesos (procesos genéticos, dispersión) y patrones (estructura genética, divergencia). En el presente caso, se analizaron los niveles de variación genética de secuencias nucleotídicas de la región control del ADNmt de *Grapsus adscensionis* y su distribución geográfica en los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias para proponer medidas de gestión útiles en la conservación de la especie. Los niveles de variación genética detectados en la Macaronesia mostraron que Canarias fue el archipiélago más diversificado tanto en la diversidad de haplotipos ($h_d = 0.959$) como de nucleótidos ($\pi = 0.0054$). Por el contrario, la isla de Madeira mostró la menor diversidad de haplotipos ($h_d = 0.866$) y una diversidad nucleotídica intermedia ($\pi = 0.0044$), superior a la de Azores ($\pi = 0.0037$). Estos valores bajos de diversidad nucleotídica indicarían un efecto fundador, relacionado con una fuente de variación reducida durante el proceso de colonización en islas oceánicas, que ha condicionado la capacidad posterior de evolución de sus poblaciones. Así, la comparación de los valores de diversidad genética entre archipiélagos sugirió que la disponibilidad de hábitat de *G. adscensionis* y/o el tamaño y el número de islas que componen cada uno de los archipiélagos macaronesicos, han condicionado posiblemente el tamaño poblacional efectivo de las islas y, en consecuencia, en los niveles de diversidad genética detectados. Además, las señales genéticas de las glaciaciones del periodo cuaternario sobre las especies marinas en los archipiélagos macaronésicos se manifestaron a través de los niveles bajos de diversidad genética en Azores y en Madeira, aunque en esta última quizás no sólo reflejaron el efecto glacial sobre los niveles de diversidad genética, sino también los efectos producidos por una menor disponibilidad de hábitat. No obstante, el carácter ancestral de Canarias se manifestó a través de la máxima diversidad genética detectada en la Región Macaronésica por este archipiélago más meridional. De hecho, la mayor estabilidad climática en estas islas durante las glaciaciones ha permitido mantener numerosos

haplotipos privados, singulares así como unas frecuencias de haplotípicas equilibradas. La leve divergencia genética por un lado así como la conformación en estrella de la red de haplotipos y la estrecha relación entre los haplotipos principales entre los archipiélagos macaronésicos por otro sugirió una cohesión genética en la región, principalmente entre Azores y Madeira. El flujo genético habría mantenido la conectividad genética entre estos dos archipiélagos a lo largo de su historia evolutiva. Por el contrario, la significación del nivel de diferenciación genética entre Azores y Canarias ($F_{ST} = 0.0653$, $p < 0.001$) mostró que la conectividad genética entre estos archipiélagos fue menos intensa y frecuente. Al aplicar el conocimiento filogeográfico obtenido a la gestión de la especie apoyándose en el concepto de biodiversidad y atendiendo a escalas complementarias se establecieron dos figuras de protección: (i) La Región Macaronésica como una ESU bajo una escala global, siendo capaz de atender el papel que han tenido las islas macaronésicas en la evolución de las especies marinas litorales atlanto-mediterráneas durante la Crisis Messiniense del Mediterráneo y las oscilaciones climáticas del Cuaternario. (ii) En una escala regional, dos MU: Azores y Madeira (MU1) y Canarias (MU 2), cada una de ellas gestionadas independientemente.

SUMMARY

Genetic information, as a tool for the inference of evolutionary processes which have operated in combination with dispersal and oceanographic conditions, can be useful to detect the current geographic distribution of genetic variation. Furthermore, it can be used for conservationist purposes when biodiversity is attended as a complex and hierarchical unit, which levels are linked through their attributes (genetic variation), processes (genetic processes, dispersal) and patterns (genetic structure, divergence). In this study, the levels of genetic variation of the control region of DNAm of *Grapsus adscensionis* and their geographic distribution at Azores, Madeira and Canaries archipelagos were analyzed. Then, with this knowledge at hand, useful management measures for species conservation were proposed. The levels of genetic variation detected at the Macaronesia showed that the Canaries was the most diversified archipelago for both haplotype ($h_d = 0.959$) and nucleotide ($\pi = 0.0054$) diversity. Conversely, Madeira island showed the lowest haplotype diversity ($h_d = 0.866$) and an intermediate nucleotide diversity ($\pi = 0.0044$), higher than the one from Azores ($\pi = 0.0037$). These low values of nucleotide diversity showed a founder effect, related to a reduced source of genetic variation during the colonization process of oceanic islands, which has determined the posterior capacity of evolution of their populations. Therefore, the comparison of genetic diversity values among archipelagos suggested that *G. adscensionis* habitat availability, and/or the size and the number of islands of each archipelago, have determined the effective population size in the islands. Evenmore, the genetic effects of the quaternary ices ages at the macaronesian archipelagos were shown by the low levels of genetic diversity in Azores and Madeira. However, these values in Madeira could not only reflect the Ice ages effect on genetic diversity, but also the effects produced by reduced habitat availability. On the other hand, the ancestral nature of the Canaries was manifested by the highest genetic diversity levels of the Macaronesian Region at this southernmost archipelago. In fact, a higher environmental stability during the Ace ages at these islands maintained a large number of both private and unique haplotypes, as well as balanced haplotypic frequencies. Several signals suggested that gene flow would maintain the genetic connectivity among Azores and Madeira during their evolutionary history: the slight genetic divergence, the star conformation of the haplotype network and the close

relationship among the most frequent haplotypes. On the contrary, the significant level of genetic differentiation among Azores and the Canary Islands ($F_{ST} = 0.0653$, $p < 0.001$), the most separated archipelagos in the region, would suggest that genetic connectivity was less intensive and frequent. Finally, when this phylogeographic knowledge was applied to the species management at the region based on the biodiversity concept and attending to complementary scales, two figures of protection were established: (i) The Macaronesian Region as one ESU, under a global scale. This attended the role of the macaronesian islands in the evolution of Atlanto-mediterranean coastal marine species during both, the messinian crisis of the Mediterranean and the climatic oscillations in the quaternary. (ii) On a regional scale, two MUs: the one including Azores and Madeira (MU1) and the other including Canary Islands (MU2), each one with an independent management.

1 INTRODUCCIÓN

Las islas oceánicas son aquellas que se han formado por actividad volcánica sobre placas oceánicas, nunca han estado conectadas a los continentes y tienen la tendencia a ocurrir en zonas alejadas de la plataforma continental, cerca de puntos calientes de actividad volcánica (Whittaker y Fernández-Palacios 2007). Han sido el centro de atención de la comunidad científica desde tiempos remotos por ser laboratorios naturales ideales, debido a su abundancia y la variedad de formas distribuidas por todos los océanos (Whittaker y Fernández-Palacios 2007). Estas características permiten replicar unidades de estudio en las que las variables a estudiar son controlables, simplificándose así la complejidad desbordante de los sistemas continentales. Por lo que, han jugado un papel crucial en el avance científico en disciplinas como la biogeografía, ecología y evolución (Whittaker y Fernández-Palacios 2007).

La filogeografía, como disciplina de la biogeografía, concierne a los principios y procesos que definen la distribución geográfica de los linajes genéticos. Los análisis moleculares permiten establecer las relaciones filogeográficas, tanto entre poblaciones conspecíficas como entre distintas especies o taxones superiores. Además, permite la definición de escenarios biogeográficos implicados en su evolución, junto con conocimientos aportados desde diversos campos como la demografía, etología, paleontología y geografía histórica (Avice et al. 2000). Por lo tanto, la filogeografía es útil como herramienta de análisis de los procesos evolutivos que han operado en combinación con los mecanismos de dispersión de las especies marinas insulares y las condiciones oceanográficas para resultar en la distribución actual de tales linajes. Además, en combinación con información ecológica y biológica puede aplicarse a la preservación de las poblaciones naturales, bajo un mismo prisma que contemple el mayor rango de escalas que obedecen a la complejidad de la biodiversidad marina (Allendorf y Luikart 2007).

1.1 *Los archipiélagos macaronésicos*

Los archipiélagos de la Macaronesia, formados por las islas de Azores, Madeira, y Canarias (Brito et al 2007, Floeter et al. 2008, Almada et al 2013, Wirtz et al. 2013, pp 139), son grupos de islas oceánicas con una larga y compleja historia geológica en la que varios episodios de erupciones volcánicas resultaron en su configuración actual

(Fernández-Palacios y Díaz 2001). Las edades máximas de las islas más antiguas de cada archipiélago han sido datadas en 8 Ma en Azores (Abdel-Monem et al. 1975), 15 Ma en Madeira (Fernández-Palacios et al. 2011), 30 Ma en Salvajes y 20 Ma en Canarias (Coello et al. 1992). Su situación geográfica los caracteriza por un aislamiento pronunciado respecto al continente, cuyo máximo y mínimo corresponden a los 1370 km que separan las Azores de la costa portuguesa y los 96 km que separan Canarias de la costa marroquí, respectivamente (Fernández-Palacios y Dias 2001). El fondo marino de estas islas posee características orográficas similares debido a su formación volcánica, desde las llanuras abisales, situadas entre 3000 y 4000 metros de profundidad, hasta la superficie. Su litoral, que comprende la zona con mayor productividad y biodiversidad marina, se caracteriza por unos fondos abruptos, con frecuentes veriles, cuevas, túneles y cornisas, encontrándose el talud en zonas próximas a la costa. Estas características orográficas del fondo marino litoral limitan la extensión de una verdadera plataforma continental, reduciendo el hábitat potencial disponible así como la diversidad y el desarrollo de comunidades bentónicas litorales.

1.2 Las corrientes marinas predominantes en la región de estudio

Las corrientes oceánicas superficiales son el medio propulsor principal a través del cual la biota marina puede desplazarse, por lo que suelen estar relacionadas con los patrones biogeográficos y filogeográficos de los organismos marinos (Gaines et al. 2007). Así, tanto pueden facilitar el contacto entre las poblaciones en zonas convergentes o que están de paso a lo largo de su área de afección, como provocar el efecto contrario y actuar como barreras geográficas invisibles limitando el contacto demográfico y genético entre las poblaciones marinas.

El régimen de corrientes marinas superficiales que predomina en la región marina de la Macaronesia se integra en el sistema general de circulación del Atlántico Norte, siendo condicionado en gran medida por la acción del anticiclón de las Azores (Santos et al. 1995). El límite occidental del giro de anticiclónico subtropical del Atlántico Norte se compone de la corriente del Golfo, con aguas cálidas que alimentan la corriente del atlántico norte y la corriente de Azores (Figura 1). Esta última fluye hacia el Este marcando el límite oriental de la región subtropical, a partir del cual la corriente de Azores se ramifica en la corriente de Portugal, recorriendo el oeste de la costa

continental portuguesa que dará lugar, más al sur, a la corriente de Canarias que atraviesa el archipiélago de Madeira y Canarias (Barton 2001b, Pelegrí et al. 2005).

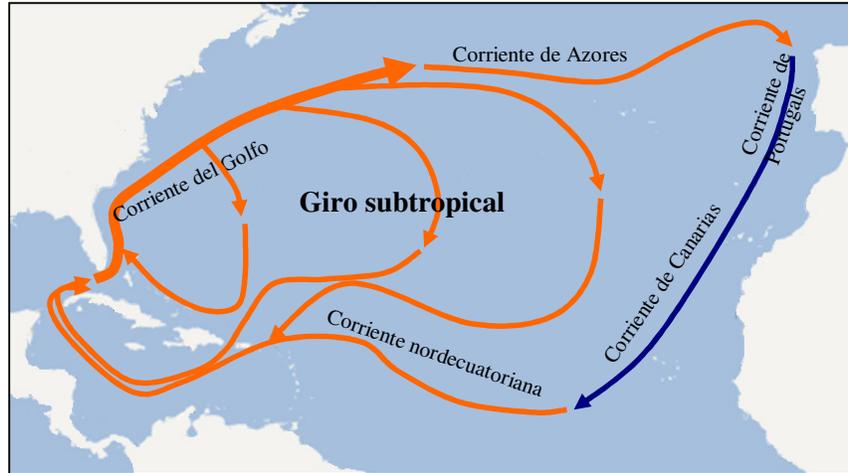


Figura 1: Corrientes superficiales oceánicas predominantes en la zona de estudio.

Cuando la corriente de Canarias alcanza la región tropical del atlántico oriental, su proximidad al ecuador hace que conecte con la corriente norte ecuatorial, de aguas más cálidas, y fluye hacia el oeste para completar el giro hacia la corriente del Caribe, que volverá a alimentar la corriente del Golfo y, consecuentemente, el giro anticiclónico (Santos et al. 1995). A pesar de compartir tales características oceanográficas, la localización geográfica de cada archipiélago condiciona las circunstancias oceanográficas locales, que junto a la distribución espacial de las islas y su forma, interaccionan con los sistemas biológicos marinos insulares, determinan la vida marina en cada uno de ellos (Barton 2001a, Hernández-León 1991, Arístegui et al. 1993, Landeira et al. 2009).

Por ejemplo, los remolinos ciclónicos y anticiclónicos derivados del efecto isla han sido indicados como un fenómeno local, capaz de disminuir la conectividad genética entre poblaciones marinas reteniendo las larvas planctónicas insulares (Rodríguez et al. 1999, Johnson y Black 2006, Rodríguez et al. 2009) y concretamente, influyendo en la composición de las comunidades zooplanctónicas costeras de la isla de Gran Canaria (Landeira et al. 2009).

1.3 *Colonización, aislamiento y estructuración genética en islas oceánicas*

La inferencia de eventos de colonización y dispersión en islas oceánicas mediante el uso de marcadores genéticos ofrece una información relevante para la gestión de la biodiversidad marina de estos sistemas cerrados, atendiendo a la insularidad como un factor clave que condiciona la abundancia y la dinámica de las poblaciones de especies marinas. Estos aspectos son fundamentales en el análisis de los mecanismos y los procesos ecológicos y/o evolutivos subyacentes que han condicionado la distribución geográfica actual de las especies marinas y su variación genética en una región.

Desde el punto de vista genético, el proceso de colonización de las islas oceánicas tiene una repercusión importante en la manera de cómo las poblaciones insulares llegan a establecerse o extinguirse. Al asumir que las islas oceánicas son colonizadas por un número bajo de individuos, la posterior evolución de la configuración genética de sus poblaciones marinas estará marcada inicialmente por el efecto fundador, es decir, cuando sólo una pequeña fracción de la variación alélica de la fuente suministradora llega a establecerse (Templeton 2006). Una vez establecida la población, la capacidad que tiene para reestablecer las condiciones de equilibrio dependerá principalmente de la configuración alélica de tales individuos colonizadores, de la tasa de creación de nuevos alelos por medio de mutaciones, la estrategia reproductiva de la especie colonizadora así como las tasas de extinción y supervivencia. Además, las fuerzas evolutivas tales como la mutación, la selección, el flujo y la deriva genética determinarán el modo de evolución de las poblaciones insulares. Una de ellas es el flujo genético, o número de migrantes entre poblaciones por generación, el cual es el componente principal de estructuración genética y determina el grado de aislamiento genético entre las poblaciones naturales (Slatkin 1985). Así, en ausencia de otras fuerzas evolutivas, el flujo genético: (i) mantiene la integridad de la especie reduciendo las diferencias genéticas entre las poblaciones (efecto homogeneizador) e (ii) incrementa la variación genética dentro de las poblaciones. Por otro lado, la deriva genética es el cambio aleatorio de las frecuencias alélicas entre generaciones y su influencia sobre el modo de evolución de las poblaciones es impredecible, ya que es un proceso estocástico en el que el tamaño poblacional juega un papel crucial (Allendorf y Luikart 2007). No obstante, en situaciones extremas de aislamiento entre dos poblaciones que originalmente mantenían intercambio de genes y que pasan a estar aisladas, dos efectos de la deriva

genética tras n generaciones son evidentes: (i) la pérdida de alelos poco frecuentes, (ii) la fijación de alelos con frecuencias elevadas, y (iii) la diferenciación y divergencia genética entre ambas (Allendorf y Luikart 2007). La primera de ellas es de vital importancia en poblaciones insulares, debido a que la consanguinidad resultante del cruce entre individuos emparentados puede producir un efecto deletéreo no deseado como es la depresión por consanguinidad, siendo éste más acentuado y probable en poblaciones pequeñas (Frankham 1995). Las poblaciones litorales marinas de islas oceánicas no suelen ser extensas, por lo que son más sensibles a los efectos genéticos depresivos sobre los cambios demográficos (Frankham 1998).

En el extremo opuesto se encuentra la panmixia, en la que los individuos reproductores contribuyen de igual modo a la descendencia y donde el emparejamiento entre individuos es aleatorio, aunque no el cambio de las frecuencias alélicas (Waples y Gaggiotti 2006). Así, entre un continuo de posibilidades entre las situaciones extremas de total aislamiento y panmixia (que rara vez ocurren naturalmente) que se dan en las poblaciones naturales, el grado de divergencia entre las poblaciones marinas de una región será resultado del balance del efecto producido entre el flujo genético y la deriva al desestabilizar el equilibrio entre los efectos de la migración y la deriva (*migration-drift equilibrium*). Aquí, el potencial de dispersión larvaria de las especies marinas juega un papel decisivo en la construcción de un patrón genético en una región dada, al ser también el vector de dispersión de los genes que condiciona el rango espacial en el que se produce un intercambio genético efectivo entre las poblaciones marinas (Hellberg 2009).

La mayoría de especies marinas, tanto bentónicas como pelágicas, pasan al menos una parte de su ciclo de vida en forma de huevos y/o larvas en el plancton, dónde consiguen atravesar largas distancias en los océanos y en función de la velocidad de las corrientes oceánicas, poder dispersarse a miles de kilómetros en una sola generación (Hellberg 2009). Sin embargo, a pesar de tener esta aptitud, numerosas evidencias han mostrado que la efectividad de la dispersión y el flujo genético a largas distancias están espacial y temporalmente limitados por diversos factores físicos (corrientes locales, gradientes de temperatura, salinidad), biológicos (duración del periodo larvario planctónico, capacidad de movimiento de la población adulta, sistema de apareamiento, comportamiento social), geográficos (relieve y paisaje submarino, insularidad, forma y disposición de las islas en un archipiélago) e históricos (e.g.: las glaciaciones del cuaternario) (Palumbi 1994).

1.4 *Marcadores genéticos y su utilidad en el análisis de la biodiversidad*

El éxito de la aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la PCR para resolver cuestiones de ecología y evolución puede ser atribuido parcialmente al desarrollo de cebadores universales y/o específicos que permiten obtener datos genéticos de porciones concretas del ADN, capaces de informar sobre diversos aspectos relacionados con los patrones que las especies desarrollan al intercambiar su material genético a lo largo de las generaciones.

El ADN mitocondrial (ADNmt), con un tamaño aproximado en vertebrados de 16.3 a 19.2 Kpb (miles de pares de bases), contiene genes extranucleares comunes a todos los vertebrados: 22 ARN de transferencia (ARNt), 2 ARN ribosómicos (12S ARNr y 16S ARNr) y 13 genes codificantes de diversas proteínas (Cantatore y Saccone 1987). Su organización génica se caracteriza por presentar ausencia de intrones, con genes adyacentes e incluso superpuestos, y una dispersión de los ARNt entre los genes (Attardi 1985; Meyer 1993) (Fig. 2).

El ADNmt tiene ciertas ventajas para su utilización en el análisis de estructuración genética de las poblaciones naturales, consolidándose como una herramienta de uso generalizado en estudios de filogeografía y su aplicación a la conservación de la biodiversidad, principalmente por destacar aquellos atributos, procesos y patrones genéticos clave en el mantenimiento a largo plazo de las especies (Bowen 1999, Moritz 2002). Diversas características son las responsables de dicha utilidad: (i) es haploide, mayoritariamente heredado por vía materna (linajes matriarcales), sin recombinación y con la presencia, en general, de un solo tipo de molécula en cada organismo; y (ii) presenta una elevada tasa mutacional, en algunos casos 10 veces superior a la presentada por el ADN nuclear. Así, el ADNmt posee una mayor sensibilidad para detectar señales genéticas informativas con la resolución requerida para el análisis de la estructura genética de las poblaciones naturales en una escala de miles a cientos de miles de años (Avice 2000).

Una de las regiones del genoma mitocondrial más usadas en estudios filogeográficos de especies marinas ha sido la región control o D-LOOP, por su elevada tasa de evolución (mutación). Aunque presente en la mayoría de los metazoos, la región control tiene diferentes características tales como longitud y presencia de motivos repetitivos (Quinteiro 2010).

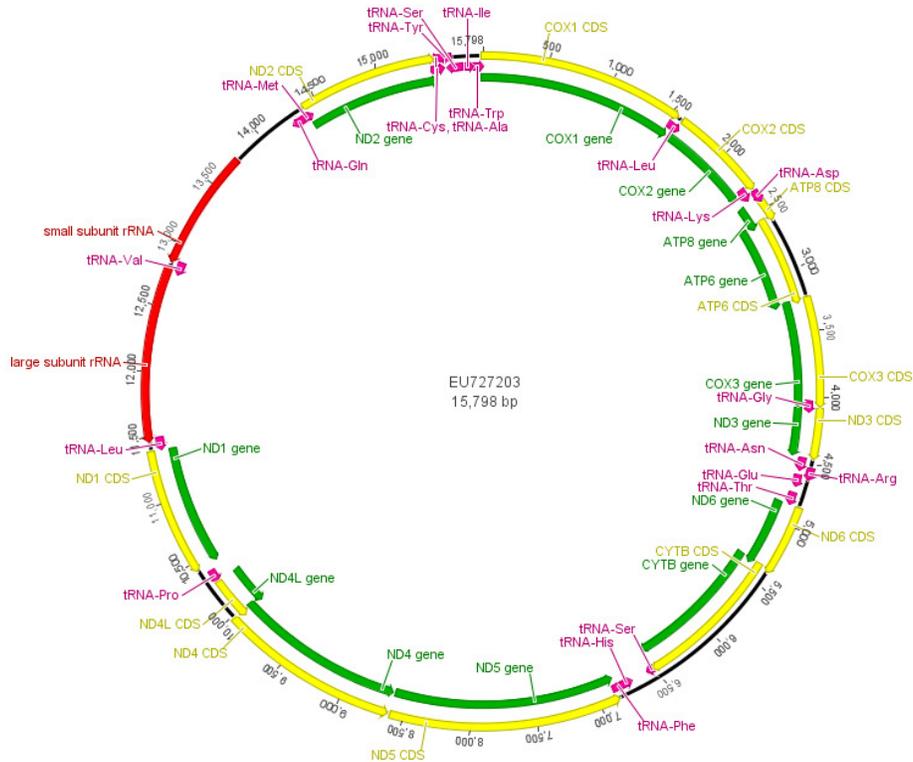


Figura 2: Organización genómica del ADN mitocondrial del cangrejo *Xenograpsus testudinatus* en la que se observan las posiciones y orientaciones de los genes (Imagen reproducida mediante el software Geneious 4.8.3).

1.5 Conservación de la biodiversidad en el medio marino

Bajo el sistema actual de gestión de especies, los adelantos en materia de conservación no siguen la intensidad con la que se pierden especies (REF). Este escenario necesita una mayor efectividad en la aplicación de la información a fines conservacionistas. En este sentido y aunque parezca una obviedad, se debería reflexionar sinceramente sobre el concepto de biodiversidad.

En este sentido, Noss (1990) definió la biodiversidad a través de varios niveles fundamentales de organización de la naturaleza, mediante los cuales la vida se nos manifiesta: el paisaje, las comunidades, las especies y los genes. Para cada nivel se identifican tres atributos jerárquicamente interligados e interdependientes: composición, estructura y función. El primero representa la identidad de elementos de un sistema, la estructura la manera de organización de esos elementos en el espacio y/o tiempo pudiendo crear o no un patrón definido y la función los procesos ecológicos y evolutivos subyacentes a la dinámica de cada nivel (Fig. 3).

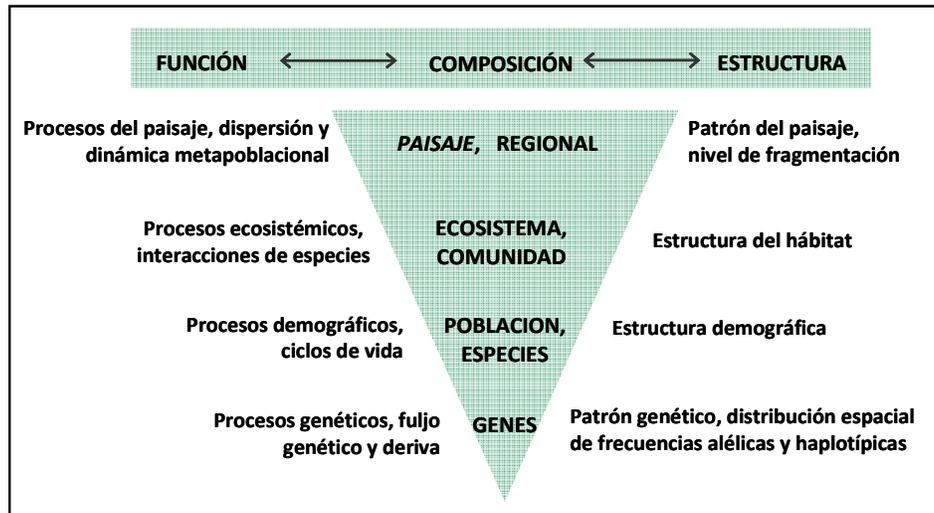


Figura 3. Esquema jerárquico y complejo del término biodiversidad (modificado a partir de Noss 1990).

Esta visión de la biodiversidad permite enlazar jerárquicamente la inherente capacidad que tienen los elementos de un sistema para desarrollar un patrón con los mecanismos y procesos biológicos, ecológicos y evolutivos, atendiendo a unas escalas espaciales y temporales específicas de cada nivel jerárquico (Noss 1990). En este sentido, es importante situar un marco espacio-temporal adecuado, en el que la complejidad de interacciones dentro y entre los diferentes niveles y atributos de la biodiversidad sea capaz de mostrarnos señales informativas correctas, es decir, biológicamente reales. Por lo que la capacidad de detectar patrones e inferir sobre los procesos en cada nivel de organización está íntimamente relacionada con los objetivos e hipótesis de estudio. Estos hechos ponen de manifiesto que la biodiversidad y su conservación pueden y deben analizarse desde diversos puntos de vista complementarios, que aporten explicaciones igualmente válidas atendiendo a diversas escalas espacio-temporales debido a que los diferentes mecanismos y procesos subyacentes a la biodiversidad, actúan sobre diferentes escalas espacio-temporales. Así, la definición de la biodiversidad percibida como el resultado final de los procesos evolutivos tiene como consecuencia lógica asumir que una parte de las medidas de conservación también deberían ir dirigidas al mantenimiento de tales procesos.

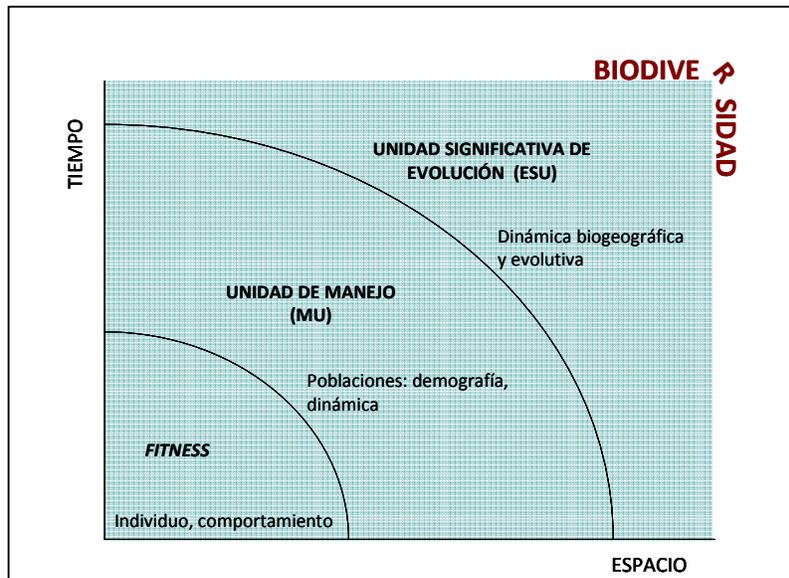


Figura 4: Representación de las escalas espacio temporales que delimitan cada uno de los tres niveles de organización de la biodiversidad y las figuras de protección con utilidad en su preservación (en negrita). (modificado a partir de Haila 1990)

La identificación de las poblaciones y/o las regiones que merezcan ser conservadas por sus niveles elevados de diversidad y/o singularidad genética por un lado, así como aquellas áreas geográficas (i) capaces de mantener la cohesión genética en una región, o (ii) históricamente aisladas por otro, han sido sugeridas como estrategias eficientes para preservar la biodiversidad (Allendorf y Luikart 2007). Por lo tanto, la comprensión de los procesos evolutivos que han generado los patrones espaciales de la diversidad genética y los factores históricos que han determinado el grado de divergencia entre las poblaciones marinas explicados anteriormente son aspectos cruciales para el desarrollo de estrategias de conservación efectivas que integren la preservación de procesos demográficos bajo una escala evolutiva. En este sentido las Unidades Significativas de Evolución (ESUs, Evolutionary Significant Units) han sido sugeridas como poblaciones o grupos de poblaciones que merecen una gestión independiente por su distinción evolutiva (Moritz 2002). No obstante, a pesar de que la comunidad científica reconoce la importancia del concepto, no hay consenso en el modo de identificar y cuantificar el límite espacial capaz de incluir o excluir poblaciones en una misma ESU en base a diferencias históricas (Moritz 2002). Sin embargo, sí que es útil y operativa la estimación del rango espacial dentro del cual no se

puede refutar la hipótesis de no diferenciación o panmixia, y donde todos los individuos tienen la misma probabilidad de establecer sus genes. Este concepto teórico, aunque muy poco probable en escenarios reales, permite la delimitación de unidades panmíticas entre las que ha habido un aislamiento histórico y, consecuentemente, la organización geográfica de la variación genética y facilitaría, por ejemplo, la toma de decisiones relativas al ordenamiento de especies de interés pesquero en una región con el objetivo de preservar el número máximo de linajes históricos (REF).

Atendiendo a una escala inferior de análisis (Fig. 4), también se han definido Unidades de Manejo (MU, Management Units) como aquellas poblaciones con una divergencia significativa en sus frecuencias alélicas, dentro de las cuales los individuos están demográficamente interconectados y en la que los procesos evolutivos operan en una escala más reducida (Palsbøll et al 2007).

1.6 *Objetivos del trabajo*

Atendiendo a los apartados introductorios anteriores, el principal objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento filogeográfico de especies marinas distribuidas en los archipiélagos macaronésicos de Azores, Madeira y Canarias, utilizando como especie modelo de estudio al cangrejo moro *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765), y aplicarlo a la gestión de la especie en dicha región. A su vez, para alcanzar dicho objetivo principal fue necesario esclarecer diferentes cuestiones evolutivas relativas a procesos intra- e interarchipiélago. Así, en el nivel intra-archipiélago fue relevante conocer los niveles de diversidad genética y determinar qué archipiélagos tienen los valores máximos, y cuales tienen variación haplotípica singular para la especie en la región. Por otro lado, en un nivel inter-archipiélago, el análisis de los niveles de diferenciación y divergencia genética permitió elucidar cuál es la fuerza evolutiva predominante (flujo genético *versus* deriva genética) en el modo de evolución de los archipiélagos analizados, y establecer las relaciones geográficas entre los haplotipos detectados, los cuales resolvieron el nivel jerárquico y esclarecieron el grado de estructuración genética en la zona.

Finalmente, esta información fue utilizada para proponer unidades genéticas con utilidad para la gestión y conservación de la especie en la región de estudio.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Especie modelo de estudio

El cangrejo moro (Fig. 4) *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765) es una especie de la familia Grapsidae que se distribuye a lo largo del Atlántico oriental y central, desde el sur de Portugal hasta Namibia, incluyendo los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias y de Cabo Verde, así como las islas de Santa Helena y Ascensión (Manning y Chace 1990, Shcherbakova et al. 2011). Clasificado como *G. grapsus* hasta 1990 (Manning y Chace 1990), se ha separado de la especie cogenérica presente en el Pacífico, incluyendo islas como las Galápagos, de las cuales es una especie representativa (Manning y Chace 1990). Además de caracteres morfológicos diferenciados en los adultos, se han descrito diferencias morfológicas entre estas dos especies en el estadio larvario (Cuesta et al. 1997, Guerao et al. 2001, Landeira y Cuesta 2012). Los estudios moleculares disponibles lo sitúan dentro de la Familia Grapsidae, en un clado con *Pachygrapsus* y *Metopograpsus* (Schubart et al. 2011). En los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias esta especie representa, junto a el cangrejo blanco *Plagusia depressa*, las dos especies intermareales con interés marisquero, lo que ha llevado a la sobreexplotación actual de, al menos, las poblaciones Canarias (Ayza et al. 2010).



Figura 5: Ejemplar de *Grapsus adscensionis* en su medio natural.

Normalmente los individuos de esta especie centran su actividad en el supramareal e intermareal de las zonas rocosas del litoral (Manning y Chace 1990, Shcherbakova et al. 2011). El rango de tallas de las poblaciones del Archipiélago Canario se sitúa entre

11.7 y 84.3 mm, mientras que su actividad reproductora se extiende de diciembre a septiembre (Ayza et al. 2010). La carga ovígera por las hembras preñadas parece dividirse en dos estaciones: de diciembre a marzo y de marzo a septiembre, con valores máximos entre febrero y mayo (Shcherbakova et al. 2011).

2.2 Localización del estudio y recolección de las muestras

El muestreo se llevó a cabo en los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias (Fig. 6), donde se recolectaron alrededor de 50 individuos del cangrejo moro *Grapsus adscensionis* en cada uno de los archipiélagos. Los tamaños muestrales ha demostrado ser resolutivo para esclarecer cuestiones filogeográficas en los mismos archipiélagos (Quinteiro et al. 2007). Los individuos fueron recolectados a mano durante periodos nocturnos de marea baja en la zona rocosa intermareal, haciendo uso de luz para facilitar la captura. Las muestras de los archipiélagos de Azores y Madeira fueron recolectadas por la *Universidade das Açores* y por el *Museu Municipal do Funchal (História Natural)*, respectivamente. Los individuos fueron recolectados entre los años 2010 y 2012.

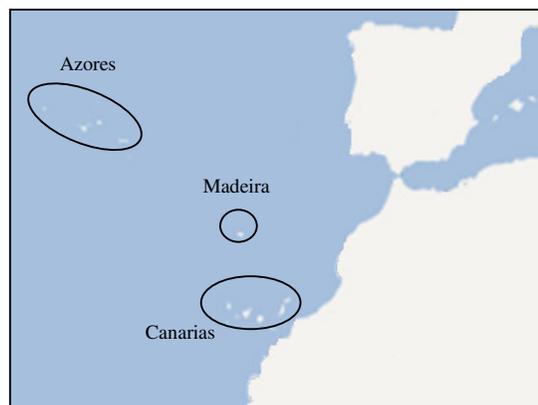


Figura 6: Localización de los archipiélagos donde fueron recolectados los individuos de *Grapsus adscensionis*.

2.3 Procesado genético de las muestras en el laboratorio

Una vez recolectados, los individuos se llevaron al laboratorio donde se separó una porción de tejido muscular de cada uno de ellos, que fue a su vez preservada en un tubo de 2 ml con alcohol 95 % y almacenada en un congelador a -20 °C.

A continuación se detallan cada uno de los pasos necesarios para el procesamiento genético de las muestras, hasta la obtención de los datos de secuencias nucleotídicas de la región control del ADN mitocondrial.

2.3.1 Aislamiento del ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo comercial del EZNA Mollusc DNA Isolation Kit (OMEGA BIO-TEK). Brevemente, el aislamiento consistió en la extracción del ADN genómico total disuelto, tras la digestión del tejido animal, a través de dos pasos clave. El primero, la rotura de las membranas nuclear y mitocondrial, consiguiendo liberar el ADN para posteriormente purificarlo, es decir, la eliminación de mucopolisacáridos mediante un filtro para evitar que coprecipiten con el ADN deseado y puedan interferir en la PCR. El segundo la precipitación del mismo.

Una vez realizada la extracción, fueron evaluados la integridad del ADN y el tamaño de los fragmentos aislados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (40 mM Tris HCl-acetato, 1 mM EDTA, PH = 8.3) y con SYBR SAFE 1X (Invitrogen, Life Technologies). Tras la carga de 5 μ L de ADN, los fragmentos fueron observados por transiluminación UV y fotografiados en un sistema automático captura de imágenes.

2.3.2 Amplificación, purificación del producto de PCR y reacción de secuenciación

El proceso de amplificación se basó en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR incluye tres reacciones: (i) la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en la que las dos hebras de la doble cadena se separan completamente, (ii) la ligación del cebador a las zonas flanqueantes de las regiones a ser amplificadas, y (iii) la extensión del cebador, en la que la Taq va adicionando bases nucleotídicas a la cadena del cebador en el extremo 3' hasta completar la cadena complementaria de la secuencia objetivo. Estos tres pasos constituyen un ciclo completo de amplificación, en el que se obtiene como producto el doble de copias de ADN de doble cadena de la secuencia objetivo, que servirán nuevamente de molde para el siguiente ciclo y así sucesivamente para aumentar el número de copias exponencialmente. Además de los ciclos anteriormente explicados, para completar el patrón de PCR se adicionó un paso previo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, y otro posterior de extensión final, a 72

°C durante 7 minutos. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Para llevar a cabo esta reacción, primero se preparó un “mix” de amplificación cuyos compuestos genéricos del cóctel fueron el tampón de amplificación, $MgCl_2$, dinucleótidos (dNTPs), la enzima termoestable ADN polimerasa (Taq), los cebadores, agua desionizada y el ADN extraído previamente. El volumen total por muestra fue de 15 μ l.

Una vez verificada la obtención del producto de PCR, se utilizó la solución enzimática ExoSAP-IT (Affymetrix Inc.), que utiliza las enzimas Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina para eliminar cualquier resto de nucleótidos no consumidos y/o cebadores remanentes en el producto de PCR. Concretamente, se añadió 1 μ L de ExoSAP-IT a cada 10 μ L de producto PCR. Luego, en un termociclador se incubó cada muestra a 37°C durante 30 min., seguido de un paso final a 80°C durante 15 minutos.

A continuación se indican los cebadores específicos que fueron utilizados para *Grapsus adscensionis*:

De acuerdo al conservado orden génico mitocondrial en especies de decápodos, la región control se sitúa entre el gen 12S rRNA, en su extremo 5' y los ARNt- Gln y ARNt-Met, en su extremo 3'. Partiendo de ello fue caracterizada dicha región mediante la amplificación con cebadores conservados para decápodos. Se obtuvo una secuencia con un total de 924 pb que incluye un fragmento del gen 12S rRNA, la región control y los ARNts, para Gln y Met (Fig. 7).

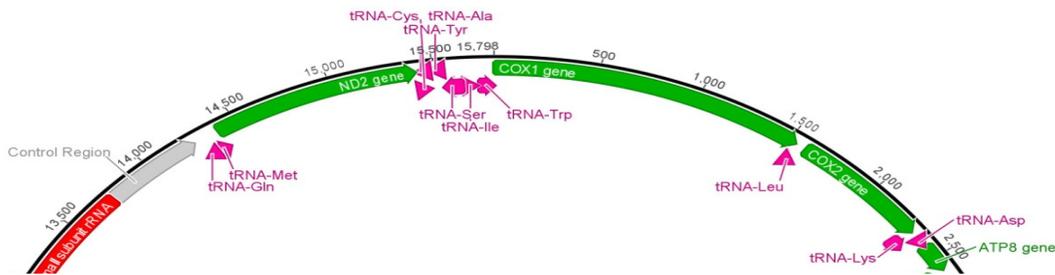


Figura 7. Parte del genoma mitocondrial completo de *Xenopograpsus testudinatus* (Ascension Number EU72703.1) utilizado para la caracterización de la región control en *Grapsus adscensionis*, ambos pertenecientes a la familia Grapsoidea. El arco de color gris incluye la región control.

Se diseñaron 2 cebadores flanqueando la región control basadas en las secuencias conocidas de la especie *Xenopograpsus testudinatus* (Ki et al. 2009) de los genes conservados 12S rRNA y ARNt-Gln. Así, dentro del gen 12S rRNA, se situó el cebador Gra-12S-1F (5'-TCGGTAACTCCTTTCATGCAACT-3') y, dentro del gen para el ARNt-Gln, el cebador reverso Gra-Gln-2R (5'-AGAAATGGTGCGATTCCATTACG-3'). Estos cebadores fueron evaluados y ajustadas las condiciones de reacción, siendo utilizados para la amplificación de las muestras disponibles.

2.3.3 Reacción de secuenciación

Una vez el producto de PCR fue purificado, se llevó a cabo la reacción de secuenciación utilizando el kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) en la que las bases nucleotídicas, de las secuencias amplificadas, quedan marcadas con fluorescencia para poder ser detectadas en el secuenciador. Protocolo de mix final resultante de los diferentes ensayos realizados para la puesta a punto de la reacción de secuenciación para un volumen total de 10µl. 0.5 ul Big Dye, 1.75 ul Buffer, 1 ul Primer (3.2µM), 4.75 ul Agua desionizada y 2.0 ul de ADN. El patrón de temperaturas de la reacción de secuenciación fue el siguiente: 96 °C 1 m / 40 ciclos (96 °C 10s / 50 °C 10s / 60 °C 4 m).

2.3.4 Purificación de la reacción de secuenciación y secuenciación de las muestras

La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit comercial Big Dye XTerminator Purification Kit. El protocolo consistió en añadir 45 µl de solución SAM y 10 µl de solución Xterminator por muestra. Sellar la placa y colocar en el agitador Thermo Finemixer (FinrPCRSh 2000-DX) a temperatura ambiente durante 30 min. Centrifugar a 2000xg durante 2 min. Finalmente, la secuenciación fue realizada en un secuenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

2.4 Análisis de datos de secuencias nucleotídicas de ADN mitocondrial

Una vez obtenida la matriz de secuencias de nucleótidos, se llevó a cabo el primer análisis de las secuencias para crear la matriz de datos de secuencias nucleotídicas, la

cual se alineó mediante el algoritmo de búsqueda de similitudes implementado en el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994).

2.4.1 *Diversidad, diferenciación y estructura*

Una vez obtenida la matriz de secuencias alineadas, se obtuvieron los parámetros básicos de diversidad genética poblacional para cada conjunto de muestras de los archipiélagos analizados. Concretamente, los índices incluyeron la diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (h), calculados con el paquete estadístico DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas 2009). Éstos

Se tomó como medida de diferenciación genética entre pares de archipiélagos el estimador F_{ST} (Hudson et al. 1992). La estructuración geográfica de la variación genética fue estimada y testada a través del análisis molecular de la varianza (AMOVA, Excoffier et al. 1992) implementado en el paquete estadístico ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier et al. 2005). El AMOVA permitió estimar índices de estructuración genética (Φ_{ST} haplotipos dentro de las poblaciones en relación con haplotipos de toda la especie; Φ_{SC} haplotipos dentro de la población, en relación con haplotipos dentro de la región y Φ_{CT} haplotipos dentro de las poblaciones en relación con haplotipos de la región.) usando información alélica contenida en los haplotipos, así como su frecuencia. Estos estimadores obedecen a la estructuración jerárquica de la variación genética entre individuos y entre poblaciones, se estimó la significación estadística de los componentes de covarianza mediante un test de permutación no paramétrico (Excoffier et al. 1992).

Además, se construyó un árbol de distancias genéticas, estimadas a partir del estimador de diferenciación poblacional F_{ST} , mediante el método neighbour-joining, mediante el paquete informático MEGA 5 (Tamura et al. 2011).

2.4.2 *Red de haplotipos*

Para detectar las relaciones filogeográficas entre los haplotipos de las poblaciones muestreadas y sus frecuencias se representó una red de haplotipos utilizando el método median-joining (Bandelt et al. 1999), implementado en el paquete informático Network v.4.6 (Fluxus Technology Ltd).

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento de ADN genómico total

Los geles de agarosa 2% llevados a cabo para todas las muestras analizadas mostraron resultados satisfactorios, con bandas de ADN con tamaños de fragmento por encima de 2642 bp, superior al tamaño esperado de la secuencia objetivo de la región control. En la figura 8 se puede observar una muestra representativa de la variedad en la cantidad y calidad del ADN extraído del total de individuos analizados.

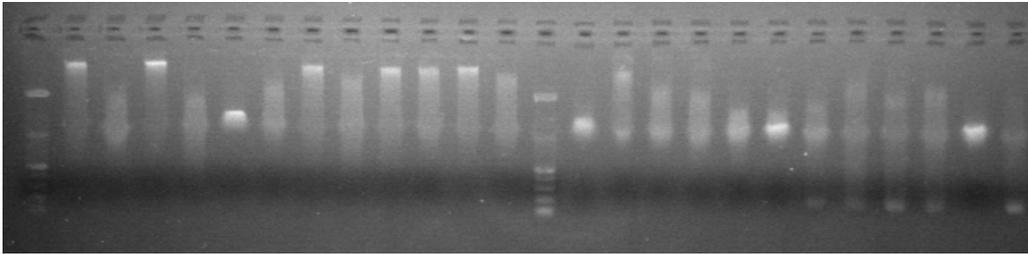


Figura 8. Gel de agarosa 1% que muestra las bandas de ADN aislado de varios individuos de *Grapsus adensionis*.

La PCR fue planteada en dos fases: la primera, en la que se ensayaron diferentes condiciones de tiempo y temperatura de la PCR así como diferentes concentraciones de ADN, CaMg_2 y cebadores del mix de amplificación. Finalmente, el mix de amplificación usado para el total de muestras analizadas incluyó 1x Green GoTaq Buffer (Promega), 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 0.3 unidades de GoTaq (Promega), 0.1 μM de cada cebador y 2 μL de la solución de ADN. El perfil térmico de la PCR para la region control mitocondrial fue el siguiente: 95 °C 3 min. / 35 ciclos (95 °C 40s / 60 °C 40s / 72 °C 1m). La figura 9 muestra la elevada calidad del ADN amplificado mostrando una única banda del tamaño esperado (600-700 bp), limpia de productos no deseados que pudieran dificultar la obtención de secuencias sin contaminaciones.

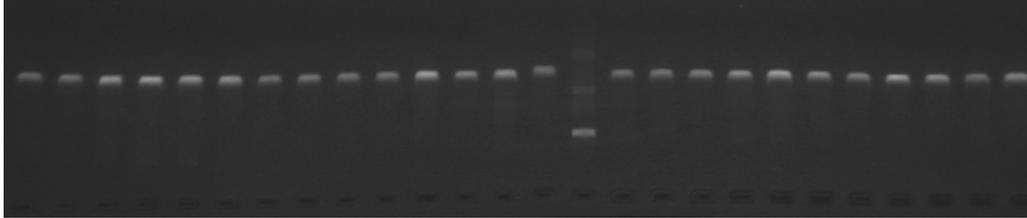


Figura 9. Gel de agarosa 2% que muestra las bandas del ADN de varios individuos de *Grapsus adscensionis* amplificado con los cebadores específicos Gra-12S-1F/ Gra-Gln-2R, que incluye la secuencia objetivo de la región control.

3.2 Diversidad genética poblacional (intra-archipiélago)

La matriz de datos elaborada para los análisis de genética de poblaciones consistió en 136 secuencias homólogas de 646 pares de bases de longitud de la región control de *Grapsus adscensionis*. La composición nucleotídica de las secuencias estuvo formada por un 28% de C, un 19% de T, un 32% de A y un 21% de G e incluyeron un total de 34 sitios polimórficos (s). El número de haplotipos detectados en el conjunto de la región macaronésica fue de 51. Por archipiélagos, el número máximo de haplotipos se detectaron en Azores y Canarias y el mínimo en Madeira (Tabla I). Los valores máximo y mínimo de diversidad nucleotídica también fueron detectados en los archipiélagos de Canarias y Azores respectivamente.

Tabla I. Índices de diversidad genética de las secuencias de la región control de *Grapsus adscensionis* en Azores, Madeira y Canarias. n: n° de secuencias, h: n° de haplotipos, h_p: n° de haplotipos privados, h_d: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar.

Archipiélago	n	h	h _p	h _d ± SD	π ± SD	s
<i>Grapsus adscensionis</i>	136	51	65	0.904 ± 0.020	0.0045 ± 0.00030	34
Azores	59	28	14	0.906 ± 0.028	0.0037 ± 0.00036	23
Madeira	51	20	8	0.866 ± 0.038	0.0044 ± 0.00038	23
Canarias	46	28	18	0.959 ± 0.016	0.0054 ± 0.00038	24

Es interesante resaltar la cantidad de haplotipos privados detectados en los 3 archipiélagos, los cuales representaron el 50% en Azores, el 40% en Madeira y el 64% en Canarias de los haplotipos totales detectados. En general, los índices de diversidad globales para la especie en la región de estudio son elevados con un moderado valor de diversidad nucleotídica, especialmente en la muestra de Azores.

3.3 Diferenciación genética y Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)

El valor del estimador F_{ST} de diferenciación genética entre los archipiélagos de canarias y Azores ($F_{ST} = 0.0653$, $p < 0.001$) fue el más elevado y el único significativo, coincidiendo con la mayor distancia de separación de entre las 3 combinaciones de pares de archipiélagos dentro de la Región Macaronésica (Tabla II). El valor de F_{ST} entre Madeira y Azores ($F_{ST} = 0.00624$, n.s.) así como el obtenido entre Madeira y Canarias ($F_{ST} = 0.01612$, n.s.), más próximos entre sí, fueron ambos bajos, indicando la una magnitud de diferenciación genética muy leve y además, no significativa.

Tabla II. Valores de F_{ST} de *Grapsus adscensionis* entre pares de archipiélagos macaronésicos. * $p < 0.001$.

Áreas	Azores	Madeira
Madeira	0.00624	
Canarias	0.0653*	0.01612

Respecto al AMOVA, sólo se analizó 1 nivel jerárquico: entre y dentro de los archipiélagos. No se decidió realizar un AMOVA con un nivel jerárquico superior, en el que es necesario definir grupos de poblaciones (en nuestro caso archipiélagos), por no tener un mayor número de poblaciones. No obstante, el AMOVA indicó la significación del índice de fijación ($F_{ST} = 0.030$, $p < 0.01$) que cuantifica. No obstante, la magnitud de la diferenciación entre archipiélagos, a pesar de ser significativa, es leve. En consecuencia, este resultado revela por otro lado que más del 95% del componente de variación se detectó dentro de los archipiélagos (Tabla III).

Tabla III. Análisis jerárquico de la varianza, AMOVA, de *Grapsus adscensionis* en los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias. ** $p < 0.01$.

Fuente de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Índice de fijación	% variación
Entre archipiélagos	2	7.468	0.04447	$F_{ST} = 0.030^{**}$	3.01
Dentro de archipiélagos	153	219.346	1.43364		96.99

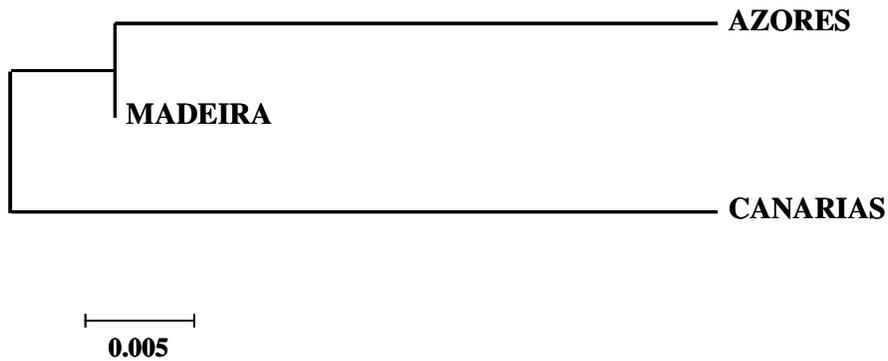


Figura 10. Árbol neighbour-joining de distancias genéticas estimadas a partir de valores de F_{ST} de *Grapsus adscensionis* en la Región Macaronésica. La longitud de cada rama representa la magnitud de la divergencia en función de la escala señalada.

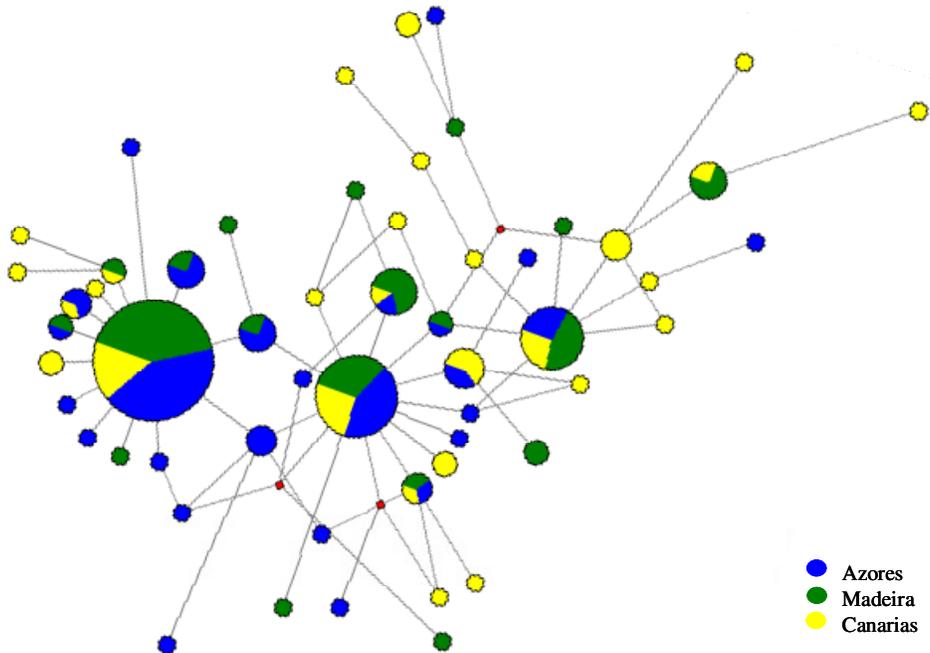


Figura 11. Red de haplotipos de la región control mitocondrial de *Grapsus adscensionis*, detectados en los archipiélagos de Azores (azul), Madeira (verde) y Canarias (amarillo). El diámetro del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y, a su vez, la porción de área ocupada en cada círculo representa la frecuencia de ese haplotipo en cada archipiélago.

La divergencia genética entre los 3 archipiélagos analizada y representada en un árbol neighbour-joining mostró que los archipiélagos de Madeira y Azores quedaron agrupados bajo el mismo nodo por un lado y que los archipiélagos de Azores y Canarias son los más divergentes de la Región Macaronésica (figura 10).

3.4 Red de haplotipos

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos puede observarse en la figura X. Así, la topología de la red de haplotipos muestra una conformación en estrella, en la que la partir de los dos haplotipos principales y muy frecuentes (círculos mayores del gráfico), presentes en todos los archipiélagos aparecen, radialmente y en la mayoría de los casos con una mutación singular singular, haplotipos menos frecuentes pero representados en más de un archipiélago o particulares de cada archipiélago que son los que más abundaron en el conjunto de secuencias analizadas. El número de mutaciones entre aquellos 2 haplotipos principales es únicamente de dos mutaciones singulares, por lo que si consideramos a estos haplotipos como los ancestrales más probales, es lógico señalar la formación de dos haplogrupos íntimamente relacionados, ambos representados en los 3 archipiélagos (Fig. 11).

4 DISCUSIÓN

Los resultados sobre los niveles de diversidad genética de *Grapsus adscensionis* en la Macaronesia mostraron que el archipiélago canario fue el más diversificado, tanto en la diversidad de haplotipos como de nucleótidos de las secuencias analizadas. Por el contrario, la isla de Madeira mostró, por un lado, la menor diversidad de haplotipos mientras que, por otro, la diversidad nucleotídica fue intermedia entre Azores y Canarias. El tamaño efectivo de las poblaciones naturales y la disponibilidad de hábitat son factores decisivos en la creación y mantenimiento de variación tanto haplotípica como nucleotídica. En este sentido, las poblaciones marinas litorales de islas oceánicas *per se* ya sufren las consecuencias de una reducción del hábitat disponible, por lo que se esperaría que sus tamaños efectivos fueran también menores que en el continente. Además, el efecto fundador íntimamente ligado a la colonización de los archipiélagos macaronésicos condiciona la variación inicial de las poblaciones insulares y, a su vez, compromete la capacidad posterior de diversificación genética de las especies que llegaron a establecerse en esas islas. En base a estas premisas, los resultados obtenidos

sugirieron que las zonas rocosas intermareales que conforman el hábitat natural donde están presentes las poblaciones de *G. adscensionis* podrían oscilar en tamaño en función de la amplitud de la franja costera con este tipo de hábitat y/o el tamaño y el número de islas que componen los archipiélagos de Azores, Madeira y Canarias, condicionando en mayor medida sus tamaños efectivos insulares y en consecuencia reverter en los niveles de diversidad genética encontrados aquí. Esta afirmación podría explicar la menor diversidad de haplotipos detectada en el archipiélago de Madeira, el cual está conformado únicamente por tres islas. No obstante, los niveles intermedios de diversidad nucleotídica detectados en Madeira podrían ser resultado de un escenario evolutivo en el que el flujo genético intra-archipiélago ha jugado un papel importante en la creación y mantenimiento de mutaciones nucleotídicas, aunque éstas no mantengan una relación con la capacidad de creación y mantenimiento de haplotipos.

La teoría de coalescencia predice que valores elevados de diversidad haplotípica y nucleotídica indicarían una situación de estabilidad de las poblaciones naturales y con un amplio tamaño efectivo ancestral. No obstante, este no parece ser congruente con el escenario demográfico que revela la diversidad genética de *Grapsus adscensionis* en la Región Macaronésica, sino más bien con el caracterizado por ciclos de reducción-expansión demográfica a partir de poblaciones ancestrales de escaso tamaño efectivo poblacional. Aunque los valores detectados no mostraron señales de extinción en ninguno de los archipiélagos analizados, de acuerdo con las indicaciones de Domingues et al (2007b), los periodos glaciares del cuaternario, y el enfriamiento del océano en la región de estudio, parecen haber provocado extinciones masivas de diversas especies de peces litorales (Almada et al. 2001, Domigues et al. 2006, Domingues et al. 2007b). No obstante, tales eventos de reducción-expansión sí pudieron responder a los efectos de las glaciaciones ocurridas durante el cuaternario, especialmente en Azores donde fueron detectados niveles bajos de diversidad genética. La baja diversidad haplotípica y el bajo número de haplotipos privados en Madeira quizás no reflejen únicamente el efecto erosivo de las glaciaciones, al menos no en la medida de cómo pudo afectar en Azores, sino también los efectos producidos por una menor disponibilidad de hábitat para la especie, comentados anteriormente. Finalmente, la mayor diversidad genética detectada en el Archipiélago Canario es congruente con la hipótesis de su carácter ancestral en la región estudiada. Así, numerosos estudios han señalado a las islas occidentales de las Canarias y Madeira como principales refugios glaciales para especies de peces templadas y subtropicales del Atlántico oriental, en las que se han detectado niveles

elevados de diversidad genética en comparación con otras poblaciones atlánticas (incluida la de Azores) y mediterráneas (Almada et al. 2001, Domingues et al. 2006, Domingues et al. 2007b, Domingues et al. 2008). *G. adscensionis* es una especie distribuida en el océano Atlántico oriental, cuyo límite norte se sitúa en Azores, por lo que las Islas Canarias pudieron ser utilizadas por esta especie como refugio en latitudes más cálidas y estables, donde las condiciones ambientales no redujeron drásticamente sus tamaños poblacionales, ni alteraron la tasa de creación y mantenimiento de haplotipos, manifestada también a través de unas frecuencias de haplotipos más equilibradas.

Al comparar estos resultados con los descritos para especies de peces litorales de estos mismos archipiélagos, en las que también ha sido analizada región control del ADNmt, se observa que los niveles de diversidad genética de *Grapsus adscensionis* que hemos detectado son menores que los dados para *Parablennius parvicornis* (Domingues et al. 2008) y *Diplodus sargus* (Domingues et al. 2007c), y mayores que los registrados en *Coryphoblennius galerita* (Domingues et al. 2007b), *Thalassoma pavo* (Domingues et al. 2008) y *Tripterygion delaisi* (Domingues et al. 2007a). Además, al compararlos con los de otras especies de invertebrados litorales analizadas en la Macaronesia, los niveles de diversidad genética de *G. adscensionis* fueron ostensiblemente mayores que los que se han descrito para el pulpo (*Octopus vulgaris*), pero similares a los de el cirrípedo *Megabalanus azoricus* (Manent et al. 2014). Asumiendo que los individuos adultos de estas especies litorales no consiguen atravesar las distancias que separan pares de islas dentro de un archipiélago, la ausencia de un patrón común respecto a los niveles de diversidad intra-archipiélago sugiere que tanto los regímenes oceanográficos locales y los patrones generales de corrientes superficiales, así como las particularidades reproductivas de las especies y concretamente aquellas relacionadas con los mecanismos específicos de dispersión larvaria (e.g.: el tiempo que las larvas permanecen en el plancton), condicionan la frecuencia y la magnitud del éxito de los intercambios genéticos entre islas de un mismo archipiélago a lo largo del tiempo. Esta limitación espacial de la conectividad genética provoca dos tipos de escenarios, en cada uno de los cuales el predominio del efecto producido por el flujo genético o la deriva condicionaría la diversificación genética de las especies insulares aumentando o disminuyendo los niveles de variación, respectivamente.

Los niveles alcanzados por el estimador F_{ST} de diferenciación entre pares de archipiélagos sugiere la población de *Grapsus adscensionis* de Canarias funciona como una entidad genéticamente diferente respecto a la de Azores, actuando la de Madeira como una estructura de transición entre los dos últimos. Así, la población de Madeira no muestra diferenciación alguna con la de Azores y muy leve con la de Canarias. No obstante, la partición jerárquica de los niveles de variación genética entre y dentro de archipiélagos, así como la estrecha relación entre los haplotipos principales, soportan la hipótesis de que esta estrecha relación geográfica entre los linajes genéticos de *G. adscensionis* es consecuencia de recurrentes intercambios genéticos entre los archipiélagos macaronésicos a lo largo de su historia evolutiva. De este modo, el flujo genético parece haber tenido un papel fundamental en la leve divergencia genética observada. Estas señales genéticas de cohesión demográfica entre los archipiélagos macaronésicos están en concordancia con la relaciones afloradas en la red de haplotipos. La conformación en estrella de la red de haplotipos, en la que la identificación de dos haplogrupos principales puede llegar a ser comprometida, no quedando claramente soportada en base a una única mutación singular de diferencia en dos posiciones de las secuencias analizadas detectadas entre los dos haplotipos mayoritarios. Probablemente éstos hayan sido los únicos que todavía muestren señales claras por su elevada frecuencia y ocurrencia generalizada en todos los archipiélagos macaronésicos, de tener un origen en el aislamiento histórico de linajes ancestrales. Además, la presencia y frecuencia de uno u otro haplotipo predominante en cada uno de los archipiélagos no ha sido equitativa, lo que permite establecer un patrón congruente con el árbol de distancias neighbour-joining y los niveles de diferenciación genética detectados mediante el estimador F_{ST} de diferenciación entre pares de archipiélagos. De este modo, los dos haplotipos más frecuentes fueron detectados mayoritariamente en Azores y Madeira, lo que soportaría por un lado la existencia de reducciones poblacionales más drásticas en Azores y Madeira, derivadas de los periodos glaciares, a tamaños poblacionales menores y, en Madeira, a la menor disponibilidad de hábitat, de acuerdo a los niveles de diversidad genética detectados.

Por otro lado, la mayor diversificación de las poblaciones canarias de *Grapsus adscensionis* tiene su posiblemente causa en la mayor estabilidad climática oceánica de esta zona del Atlántico durante las glaciaciones del cuaternario, lo que ha permitido mantener numerosos haplotipos privados, así como multitud de haplotipos singulares originados a partir del haplotipo predominante. Además, esta configuración en estrella

de la red de haplotipos es consistente con una expansión demográfica reciente, seguida de una considerable reducción poblacional ya apuntada en otros estudios de especies marinas litorales del océano Atlántico nororiental como respuesta común a la historia paleoclimática del Atlántico Norte, originada por eventos de aislamiento, persistencia y diferenciación en refugios glaciares y posterior recolonización hacia las zonas de reducción o extinción de latitudes más elevadas (Briggs 1974, Patarnello et al 2007, Floeter et al. 2008, Maggs et al. 2008, Almada et al. 2013).

Además, el patrón de diferenciación y divergencia genética que hemos detectado está soportado por dos motivos relacionados con la reproducción y dispersión larvaria de *Grapsus adscensionis*. En primer lugar, el ciclo reproductivo de esta especie en Canarias, con presencia de hembras ovígeras, se extiende a largo del año (Shcherbakova et al. 2011). Esto puede facilitar que, a través de la dispersión larvaria, el flujo genético mantenga niveles de conectividad genética entre las islas de los archipiélagos de la región macaronésica suficientes como para darse una diferenciación genética leve. Además, las velocidades de desplazamiento de las corrientes asociadas al giro anticiclónico del Atlántico norte (REF) apoyarían esta hipótesis, ya que la duración de la fase larvaria de esta especie permitiría alcanzar las distancias que pares de archipiélagos (Landeira, com. pers.), más concretamente entre Azores y Madeira y entre Madeira y Canarias.

La gestión de la biodiversidad marina de los archipiélagos macaronésicos, desde un punto de vista evolutivo, debería justificar la preservación de la región macaronésica debido a su implicación en el mantenimiento de procesos clave para la biodiversidad marina global. Además, debido a su aislamiento histórico, en esta región se han desarrollado y manifestado distinciones biológicas, ecológicas y/o evolutivas particulares, derivadas de su aislamiento (Brito et al. 2007). En este sentido y atendiendo a la preservación del área de estudio, se recomienda la consideración de dos niveles de análisis para obtener una visión amplia, que permita introducir medidas de gestión a una escala Atlántomediterránea, así como otra reducida macaronésica. El primero de ellos abordaría el papel de las islas macaronésicas en los procesos ecológicos y evolutivos de las especies marinas que han influenciado la distribución de tales especies, así como su evolución en el océano Atlántico y Mediterráneo. El segundo, en un nivel de escala inferior, intentaría abordar una planificación de gestión de la biodiversidad marina en la Región Macaronésica, organizada geográficamente bajo el patrón biogeográfico y filogeográfico de la Región, y proponer medidas que

resalten aquellas islas, o poblaciones locales, en donde las particularidades genéticas de las especies manifiesten características relícticas, singulares y de diversidad dignas de ser preservadas. En este sentido, es ampliamente aceptado por la comunidad científica que las islas macaronésicas han jugado un papel relevante en la supervivencia y mantenimiento de las poblaciones de especies templadas litorales del hemisferio norte en el océano, ante eventos históricos clave que produjeron reducciones y extinciones masivas en esta región, como consecuencia de la Crisis Messiniense en el Mediterráneo (5,59-5,3 Ma, Krijgsman et al. 1999), y de las oscilaciones climáticas con periodos intermitentes glaciares e interglaciares durante El Cuaternario (3 Ma – 18 Ka, Hewitt 2000).

Durante el Messiniense, la cuenca mediterránea sufrió una desecación importante por el cierre del Estrecho de Gibraltar, formándose lagos hipersalinos donde algunas especies consiguieron sobrevivir, originando la mayoría de los endemismos mediterráneos actuales. Al abrirse nuevamente al Océano Atlántico (5Ma, Almada et al. 2013), el Mediterráneo fue recolonizado principalmente a partir de la fauna marina de las costas atlánticas europeas y africanas continentales adyacentes, y de los archipiélagos de Madeira y Canarias, que formaban parte de un océano todavía tropical (Almada et al. 2013). Este flujo masivo se ha manifestado a través de una mayor afinidad genética de las áreas atlánticas, implicadas en dicha recolonización, y una mayor divergencia con el resto de fauna litoral de zonas costeras no implicadas en este evento (Floeter et al. 2008, Maggs et al. 2008, Almada et al. 2013). No obstante, el mantenimiento del intercambio genético entre los archipiélagos macaronésicos y el Mediterráneo no tiene un patrón claro (Patarnello et al. 2007). Patarnello et al. (2007) sugieren algunas conclusiones generales: las especies mayoritariamente pelágicas o con capacidades dispersivas amplias como la sardina *Sardina pilchardus* o la caballa *Scomber colias* son capaces de mantener un flujo genético elevado entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas. No obstante, otras especies litorales de hábitos bentónicos, cuyo potencial de dispersión es reducido, mantienen niveles elevados de divergencia genética entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas, debido probablemente a varias causas como la separación histórica, aislamiento reciente y dinámica poblacional o tamaños de población efectiva diferente como la sama *Dentex dentex*, la herrera *Lithognathus mormyrus*, el pejeverde *Thalassoma pavo*, la sepia *Sepia officinalis* o el erizo *Paracentrotus lividus* (Patarnello et al. 2007, Almada et al. 2013).

Durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario (2.4 – 0.9 My, Hewitt 2000), los archipiélagos macaronésicos operaron como refugios glaciares en el Océano Atlántico (Maggs et al. 2008). Es decir, actuaron como zonas donde las especies marinas encontraron condiciones más estables acordes a sus exigencias ecológicas, y donde numerosas especies templadas y subtropicales evitaron las bajas temperaturas de latitudes más elevadas. En el hemisferio norte, el casquete polar avanzó y retrocedió en ciclos repetitivos, consonantes con las oscilaciones climáticas, que llegaron a ser dramáticas para la mayoría de especies marinas, tanto pelágicas como bentónicas en zonas templadas del Atlántico (Briggs 1974). Esto provocó que las especies marinas evolucionaran de modo diferente en función de la latitud (zonas boreales, templadas y tropicales), y de las capacidades de dispersión y de resiliencia particulares de cada especie (Hewitt 2000). Así, las especies pudieron: (i) extinguirse sobre extensas partes del rango geográfico de distribución, (ii) dispersarse a nuevas localidades dónde las condiciones ambientales y los nuevos hábitats disponibles permitieron establecerse o (iii) sobrevivir en refugios estables para luego expandirse de nuevo a las zonas dónde ocurrían durante los periodos interglaciares a modo de ciclos de reducción/expansión poblacional (Hewitt 2000). Por lo tanto, atendiendo estas premisas, las islas de la Macaronesia, principalmente Madeira y las Canarias, sirvieron como importantes refugios para especies de peces litorales bentónicos de mares templados y tropicales, tales como la fula blanca *Chromis limbata* (Domingues et al. 2006) y el sargo *Diplodus sargus cadenati* (Domingues et al. 2007c), varias especies de barrigudas (Almada et al. 2001, Almada et al. 2005, Domingues et al. 2008), el cabecinegro *Tripterygion delaisi* (Domingues et al. 2007a) la raya *Raja clavata* (Chevolot et al. 2006), varias especies de lapas del género *Patella* (Sá-Pinto et al. 2008) y la esponja *Phorbas fictitius* (Xavier et al. 2010), entre otras. A pesar de que Azores ha sido indicado como un refugio glacial (la raya *Raja Clavata*, Chevolot et al. 2006), las bajas temperaturas del último periodo máximo glacial (25-18 Ka) que se alcanzaron a este archipiélago, produjeron extinciones y drásticas reducciones poblacionales en especies de peces bentónicos litorales, las cuales volvieron a ser recolonizadas posteriormente (hace 12000 años) a partir de las poblaciones de Madeira y Canarias (Almada et al. 2001, Almada et al. 2005, Domínguez 2006, 2007b, 2008).

Para *Grapsus adscensionis* únicamente ha podido aplicarse a la gestión de la especie la información contenida en los resultados de este estudio. En consecuencia, esta primera contribución pone de manifiesto cómo planificar geográficamente la

gestión de esta especie en función de los niveles de diversidad y divergencia genética. En este sentido, nuestros resultados sugieren dos unidades de gestión (*MU*, *sensu* Palsbøll et al. 2007), demográfica y genéticamente independientes, que merecerían una gestión separada debido a la divergencia significativa de sus frecuencias alélicas, siendo Azores y Madeira (*MU* 1), por un lado, y Canarias (*MU* 2), por otro. Esta sugerencia, a pesar de que podría no estar de acuerdo con la leve estructuración genética en la región de estudio, así como la estrecha relación observada entre los haplotipos principales, responde a una estrategia basada en la prevención. Además, parece tener más sentido la proposición de una única unidad de conservación que englobe a la Macaronesia bajo una escala global, tal y como ha sido sugerido con anterioridad. Del mismo modo, esta estrategia también parece tener su razón de ser en la preservación de los procesos evolutivos que operan dentro de cada *MU*, bajo una escala más reducida que contempla las conexiones demográficas locales de cada archipiélago, tanto dentro como entre islas. De este modo y recurriendo al término biodiversidad (*sensu* Noss 1990), como apoyo conceptual, funcional y estructural, y a las escalas que operan en los diferentes niveles jerárquicos explicados en la introducción, nuestra propuesta cumpliría con parte de las expectativas iniciales sugeridas para la conservación de la biodiversidad utilizando como ejemplo a la especie *G. adscensionis*.

Así, el objetivo perseguido pasaría por gestionar independientemente poblaciones demográficamente distintas o *MUs*, cuya distribución en la región macaronésica respondería adecuadamente a las particularidades ecológicas y evolutivas locales de cada una de las especies marinas y, no tanto, a un patrón generalizado (Manent et al. 2014). Esto afloraría bajo una escala más amplia representada por una *ESU* “macaronésica”, en la cual destacarían linajes genéticos independientes más profundos, llegando incluso a producirse fenómenos de especiación que, al mismo tiempo, responderían satisfactoriamente ante los niveles de endemismos que sugieren diversos autores para la delimitación biogeográfica de la Macaronesia, como una unidad biogeográfica independiente, en base al extenso conocimiento ictiogeográfico (Briggs 1974, Brito et al. 2007, Floeter et al. 2008, Briggs y Bowen 2012, Almada et al. 2013).

5 CONCLUSIONES

En base a los propósitos iniciales del presente trabajo, que podrían resumirse en la voluntad de conocer diferentes aspectos filogeográficos de especies marinas

distribuidas en los archipiélagos macaronésicos de Azores, Madeira y Canarias, utilizando como especie modelo de estudio al cangrejo moro *Grapsus adscensionis* y aplicarlos a la gestión de la especie en dicha región. Las señales informativas que han ofrecido las secuencias de la región control del ADN mitocondrial de *Grapsus adscensionis* han incluido los procesos evolutivos que han operado bajo la influencia de diversos factores clave capaces de explicar la historia evolutiva de la especie en la región analizada. Los niveles de diversidad así como de diferenciación, divergencia y estructuración genética detectados han sido la información que se ha fundamentado la discusión final del trabajo. Estos factores han sido los siguientes: las oscilaciones climáticas, las interacciones de la especie en estudio con el ambiente marino costero así como las estrategias de reproducción y de dispersión entre las poblaciones estudiadas a lo largo de la historia evolutiva en la región que ocurrieron principalmente desde el periodo cuaternario. Concretamente, los valores de diversidad nucleotídica reflejaron un efecto fundador, característico del proceso de colonización en islas oceánicas y el efecto que las oscilaciones climáticas ocurridas durante el cuaternario ocasionaron en los niveles de diversidad. Además, la comparación de los valores de diversidad genética entre archipiélagos sugirió que la disponibilidad de hábitat de *G. adscensionis* y/o el tamaño y el número de islas que componen cada uno de los archipiélagos macaronésicos han sido los factores que han condicionado los niveles de diversidad genética detectados.

Sin embargo, la mayor estabilidad climática del archipiélago canario durante las glaciaciones del cuaternario ha permitido mantener unos niveles máximos de diversidad genética en la región mostraron señales genéticas evidentes de linajes ancestrales. Por otro lado, los análisis de diferenciación y divergencia genética entre archipiélagos, así como las relaciones entre los haplotipos detectados sugirieron una cohesión genética en la región, principalmente entre Azores y Madeira. Por el contrario, Azores y Canarias fueron los archipiélagos más divergentes y entre los que los niveles bajos de flujo genético han mantenido un mayor aislamiento genético. Finalmente, la información filogeográfica obtenida ha sugerido dos figuras de protección que pueden ayudar a gestionar las poblaciones de *Grapsus adscensionis* desde una perspectiva evolutiva: (i) La Región Macaronésica como una ESU bajo una escala global, y (ii) dos MU en la Macaronesia: Azores y Madeira (MU1) y Canarias (MU 2).

Por lo tanto, se puede concluir que tanto los objetivos planteados como las cuestiones concretas sobre aspectos filogeográficos intra-archipiélago como inter-archipiélago fueron alcanzados.

No obstante, debido a que el conocimiento científico basado en inferencias estadísticas siempre es limitado y representa una muestra de los sistemas biológicos por un lado, y a que las inferencias basadas en una única región del ADNmt muestra señales genéticas limitadas por otro, el presente trabajo al mismo tiempo ha sido capaz de resolver algunas cuestiones importantes, abre nuevas dudas que pueden contribuir a profundizar en otros aspectos filogeográficos igualmente importantes para una gestión adecuada de la especie. Tales cuestiones abiertas estarían focalizadas en escalas reducidas intra-archipiélago que deberían intentar elucidar los patrones genéticos dentro y entre islas de un mismo archipiélago, así como intentar relacionar medidas de diversidad genética con tamaños poblacionales para comprender mejor los efectos de la reducción y consecuente fragmentación de las poblaciones naturales.

6 BIBLIOIGRAFÍA

- Abdel-Monem AA, Fernández LA, Bonne GM. 1975. K-Ar ages from the eastern Azores group (Santa Maria, São Miguel and the Formigas islands). *Lithos*, 8: 247-254
- Allendorf FW, Luikart G. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Malden
- Almada VC, Oliveira RF, Gonçalves EJ, Almeida AJ, Santos RS, Wirtz P. 2001. Patterns of diversity of the northeastern Atlantic blenniid fish fauna (Pisces: Blenniidae). *Global Ecology and Biogeography*, 10: 411-422
- Almada F, Almada VC, Guillemaund T, Wirtz P. 2005. Phylogenetic relationships of the north-eastern Atlantic and Mediterranean blenniids. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86: 283-295
- Almada VC, Falcón Toledo J, Brito A, Levy A, Floeter SR, Robalo JJ, Martins J, Almada F. 2013. Complex origins of the Lusitania biogeographic province and northeastern Atlantic fishes. *Frontiers of Biogeography*, 5: 20-28
- Arístegui J, Sangrá P, Hernández-León S, Canton M, Hernandez-Guerra A, Kerling JL. 1994. Island induced eddies in the Canary Islands. *Deep-Sea Research*, 41: 1509-1525.
- Arístegui J, Tett P, Hernández-Guerra A, Basterretxea G, Montero MF, Wild K, Sangrá P, Hernández-León S, Cantón M, García-Braun JA, Pacheco M, Barton ED. 1997. The influence of island generated eddies on chlorophyll distribution: a study of mesoscale variation around Gran Canaria. *Deep-Sea Research I* 44, 71-96
- Attardi G. 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93: 93-145
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ayza O, García-Mederos AM, Arrasate-López M, Tuset VM, Santana JI, Santana-González B, Fernández-Fonte V, González JA. Aspectos reproductores de dos cangrejos (Decapoda: Brachyura) de interés marisquero en Canarias: *Grapsus adscensionis* (Grapsidae) y *Plagusia depressa* (Plagusiidae). 29pp. *In: Libro resúmenes XVI Simposio Ibérico de Estudios de Biología Marina*.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48

- Barton ED. 2001a. Turbulence and diffusion: island wakes. *In: Encyclopedia of Ocean Sciences*, J. Steele, S. Thorpe and K. Turekian (eds). Academic Press, London, Vol 1, pp. 1397-1403
- Barton ED. 2001b. Canary and Portugal currents. *In: Encyclopedia of Ocean Sciences*, J. Steele, S. Thorpe and K. Turekian (eds). Academic Press, London, Vol 1, pp. 1397-1403
- Bowen BW. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8(12 Suppl): S5-S10
- Briggs JC. Briggs. 1974. *Marine zoogeography*. McGraw-Hill, New York
- Briggs JC, Bowen B. 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of biogeography*, 39: 12-30
- Brito A, Falcón JM, Herrera R. 2007. Características zoogeográficas de la ictiofauna litoral de las islas de Cabo Verde y comparación con los archipiélagos macaronésicos. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, 18: 93-109
- Coello J, Cantagrel JM, Hernan F, Fuster JM, Ibarrola E, Ancochea E, Casquet C, Jamond C, Díazde Terán JR. 1992. Evolution of the eastern volcanic ridge of the Canary Islands based on new K-Ar data. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 53: 251-274
- Cuesta JA, González-Gordillo JI, Rodríguez A. 1997. First zoeal stages of *Grapsus adscensionis* (Osbeck) and *Planes minutus* (Linnaeus) (Brachyura: Grapsidae) described from laboratory hatched material, with notes on larval characters of the Grapsinae. *Journal of Natural History*, 31: 887-900
- Domingues VS, Almada VC, Santos RS, Brito A, Bernardi G. 2007a. Phylogeography and evolution of the triplefin *Tripterygion delaisi* (Pisces, Blennioidei). *Marine Biology*, 150: 509-519
- Domingues VS, Faria, C, Stefanni S, Santos RS, Brito A, Almada VC. 2007b. Genetic divergence in the Atlantic–Mediterranean Montagu’s blenny, *Coryphoblennius galerita* (Linnaeus 1758) revealed by molecular and morphological characters. *Molecular Ecology*, 16: 3592-3605
- Domingues VS, Santos RS, Brito A, Alexandrou M, Almada CV. 2007c. Mitochondrial and nuclear markers reveal isolation by distance and effects of Pleistocene glaciations in the northeastern Atlantic and Mediterranean populations of the white seabream (*Diplodus sargus*, L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346: 102-113

- Domingues VS, Santos RS, Brito A, Almada CV. 2006. Historical population dynamics and demography of the eastern Atlantic pomacentrid *Chromis limbata* (Valenciennes, 1833). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 139-147
- Domingues VS, Stefanni S, Brito A, Santos RS, Almada CV. 2008. Phylogeography and demography of the Blenniid *Parablennius parvicornis* and its sister species *P. sanguinolentus* from the northeastern Atlantic Ocean and the western Mediterranean Sea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 397-402
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50
- Fernández-Palacios JM, Diaz E. 2001. Marco Biogeográfico Macaronésico. 45-52 pp. *In: Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología y conservación*. Fernández-Palacios JM, Martín Esquivel JL (eds). Publicaciones Turquesa S.L. Sta. Cruz de Tenerife
- Fernández-Palacios JM, Nascimento L, Otto R, Delgado JD, García-del-Rey E, Arévalo JR, Whittaker RJ. 2011. A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *Journal of biogeography*, 38: 226-246
- Floeter SR, Rocha LA, Robertson DR, Joyeux JC, Smith-Vaniz WF, Wirtz P, Edwards AJ, Barreiros JP, Ferreira CEL, Gasparini JL, Brito A, Falcon JM, Bowen BW, Bernardi G. 2008. Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography*, 35: 22-47
- Frankham R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327
- Frankham R. 1998. Inbreeding and Extinction: Island Populations. *Conservation Biology*, 12: 665-675
- Guerao G, Schubart CD, Cuesta JA. 2001. The first zoeal stages of *Grapsus grapsus* (Linnaeus) and *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Brachyura, Grapsidae) from the western Atlantic. *Nauplius*, 9: 111-121
- Johnson MS, Black R. 2006. Islands increase genetic subdivision and disrupt patterns of connectivity of intertidal snails in a complex archipelago. *Evolution*, 60: 2498-2506
- Haila Yrjo. 1990. Toward an Ecological Definition of an Island: A Northwest European Perspective. *Journal of Biogeography*, 17: 561-568

- Hellberg ME. 2009. Gene Flow and Isolation among Populations of Marine Animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40: 291-310
- Hernández-León S. 1991. Accumulation of mesozooplankton in a wake area as a causative mechanism of the "island-mas effect". *Marine Biology*, 109: 141-147
- Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583–589
- Ki JS, Dahms HU, Hwang JS, Lee JS. 2009. The complete mitogenome of the hydrothermal vent crab *Xenograpsus testudinatus* (Decapoda, Brachyura) and comparison with brachyuran crabs. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 4: 290-299
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400: 652-655
- Landeira JM, Lozano-Soldevilla F, Hernández-León S, Barton ED. 2009. Horizontal distribution of invertebrate larvae around the oceanic island of Gran Canaria: the effect of mesoscale variability. *Scientia Marina*, 73: 761-771
- Landeira JM, Cuesta JA. 2012. Morphology of the second zoeal stage of *Grapsus adscensionis* (Osbeck, 1765) (Crustacea, Decapoda, Grapsoidea) confirms larval characters of the family Grapsidae. *Zootaxa*, 3540: 59-64
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, Henzler C, Taimour Jolly M, Kelly J, Olsen J, Perez KE, Stam W, Viard F, Wares J. 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for north atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, 89: S108-S122.
- Manent P, Quinteiro J, Rodríguez-Castro J, Pérez-Dieguez L, Rey-Méndez M, Gois AR, Alves A, Araújo R, Carreira G, Almeida C, Freitas R, González JA, Lopes E, González N. 2014. The application of phylogeographic analysis toward the conservation of marine biodiversity of Macaronesian and Cape Verde islands. 240-241 pp. *In: Book of Abstracts submitted to the IV Congress of Marine Sciences*
- Manning RB, Chace FA. 1990. Decapod and stomatopod Crustacea from Ascension Island, South Atlantic Ocean, *Smithsonian Contributions to Zoology*, 503: 1-91
- Meyer A. 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes. 1-37pp. *In: Molecular Biology Frontiers*, ed. PW Hochachka and TP Mommsen. London: Elsevier

- Moritz C. 2002. Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. *Systematic Biology* 51: 238-254
- Noss RF. 1990. Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology*, 4: 355-364
- Palsbøll PJ, Bérube M, Allendorf FW. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:11-16
- Palumbi S. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 547- 572
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Molecular Ecology*, 16: 4426-4444
- Pelegrí JL, Arístegui J, Cana L, González-Dávila M, Hernández-Guerra A, Hernández-León S, Marrero-Díaz A, Montero MF, Sangrà P, Santana-Casiano M. 2005. Coupling between the open ocean and the coastal upwelling region off northwest Africa: water recirculation and offshore pumping of organic matter. *Journal of Marine System*, 54: 3-37
- Quinteiro J, Rodríguez-Castro J, Rey-Méndez M. 2007. Population genetic structure of the stalked barnacle *Pollicipes pollicipes* (Gmelin, 1789) in the northeastern Atlantic: influence of coastal currents and mesoscale hydrographic structures. *Marine Biology*, 153: 47-60
- Quinteiro J . 2010. Filogenia Molecular, Estructura Poblacional y Trazabilidad Genética de Escómbridos (Pisces: Scombridae). Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela. 295pp
- Rodríguez JM, Hernández-León S, Barton ED. 1999. Mesoscale distribution of fish larvae in relation to an upwelling filament off Northeast Africa. *Deep Sea Research Part-1, Oceanographic Research Papers*, 46: 1969-1984
- Rodríguez JM, Moyano M, Hernández-León S. 2009. The ichthyoplankton assemblage of the Canaries–African Coastal Transition Zone: A review. *Progress in Oceanography*, 83: 314-321
- Sa-Pinto A, Branco M, Sayanda D, Alexandrino P. 2008. Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus *Patella* in the Macaronesian Islands. *Molecular Ecology*, 17: 519-532
- Santos RS, Hawkins S, Monteiro LR, Alves M, Isidro EJ. 1995. Marine research, resources and conservation in the Azores. *Aquatic Conservation: Marine and*

Freshwater Ecosystems, 5: 311-354

Schubart CD. 2011. Reconstruction of phylogenetic relationships within Grapsidae (Crustacea: Brachyura) and comparison of trans-isthmian versus amphi-atlantic gene flow based on mtDNA. *Zoologischer Anzeiger*, 250: 472-478

Shcherbakova A, Riera R, Almansa E, Felipe B, Rodríguez C, Reis D, Andrade JP, Sykes AV. 2011. Reproductive investment and fecundity of the Red rock crab (*Grapsus adscensionis*) in Tenerife (Canary Islands, Atlantic Ocean) (Decapoda, Grapsidae). *Vieraea*, 39: 139-147

Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and systematics*, 16: 393- 430

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739

Templeton AR. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882

Waples RS, Gaggiotti O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15: 1419-1439

Whittaker RJ, y Fernández-Palacios, JM. 2007. Island biogeography: ecology, evolution, and conservation, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.

Wirtz P, Brito A, Falcón JM, Freitas R, Fricke R, Monteiro V, Reiner F, Tariche O. 2013. The coastal fishes of the Cape Verde Islands –new records and an annotated check-list. *Spixiana*, 36: 113-142

1. Descripción detallada de las actividades desarrolladas durante la realización del TFM

A continuación se detallan las actividades que desarrollé durante la realización del TFM:

Lectura bibliografía relacionada con objetivos del estudio. Concretamente artículos y capítulos de libros científicos relacionados con la filogeografía, genética de poblaciones, conservación, Biodiversidad, biología de la especie objetivo *Grapsus adscensionis*, biogeografía, etc. Además, se consultaron publicaciones sobre protocolos genéticos de laboratorio. Trabajo de laboratorio llevado a cabo en el laboratorio de biología molecular del departamento de biotecnología del ITC en Pozo Izquierdo. Estas tareas incluyeron: La extracción de ADN de los tejidos almacenados y su cuantificación mediante electroforesis de geles de agarosa y haciendo uso del espectrofotómetro "NANODROP". Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): optimización de variables como los tiempos y temperaturas óptimas y el número de ciclos necesarios para obtener un producto de PCR abundante y de calidad. Purificación de los productos amplificados en la PCR y preparación de las muestras amplificadas anteriormente mediante la reacción de secuenciación y correctamente conservadas. Secuenciación de las mismas en el secuenciador automático de capilares ABI3500 (Applied Biosystems). Obtención de datos de cromatogramas mediante el paquete informático DATA COLLECTION (Applied Biosystems) conectado al secuenciador para después ser analizados utilizando el paquete de análisis BIOEDIT. Una vez finalizado el proceso de creación de datos de secuencias de la región objetivo de análisis, se realizaron diversos análisis estadísticos con la matriz de secuencias alineadas (homólogas) concernientes a estimar los parámetros de diversidad genética de cada archipiélago por un lado, y por otro a estimar los parámetros de diferenciación y divergencia genética, así como la construcción de un árbol de distancias genéticas y una red de haplotipos. Durante el análisis fue necesario utilizar paquetes estadísticos específicos y de manipulación de datos detallados en el TFM. También se dedicó un tiempo prudente para comprender principalmente el porqué de la elección de un modelo evolutivo determinado en función de las hipótesis que quieren ser resueltas y un método estadístico concreto que nos dé la confianza necesaria para discernir sobre escenarios posibles que nuestros datos consiguen revelar y elegir finalmente aquel más biológicamente real. De este modo, tuve que leer bibliografía específica de análisis de datos de genética de poblaciones y filogenias, para luego interpretar los resultados

relacionándolos con los conocimientos adquiridos en la previa lectura bibliográfica anteriormente indicada. Finalmente se elaboró el TFM que ha sido presentado para la obtención del Master de Gestión Costera.

2. Formación recibida (cursos, programas informáticos, etc.)

La formación necesaria (programas estadísticos, funcionamiento de aparatos de laboratorio, protocolos, etc.) ha sido adquirida mediante dedicación personal así como mediante conversaciones mantenidas con colegas que bien colaboraban en el proyecto que ha financiado los gastos del presente trabajo, o bien aquellos investigadores del ámbito de trabajo desarrollado, ya sea de otras universidades como centros de investigación. No obstante, mi experiencia anterior en estudios similares facilitó este punto.

3. Nivel de integración e implicación dentro del departamento y relaciones con el personal

El TFM fue realizado en el departamento liderado por la Dra. Nieves González Henríquez que, en un primer momento, estuvo ubicado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas, (ICCM) perteneciente a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) para finalizar en el departamento de Biología de la ULPGC. Así, la relación con compañeros de trabajo siempre ha sido motivada por una actitud positiva y de crítica constructiva, así como de intentar mantener una implicación ética y firme en el trabajo en equipo. Además, como mi experiencia anterior como investigador en estudios de genética llevados a cabo en el ICCM ha estado siempre vinculada al mismo departamento, mi integración siguió siendo buena tanto en el plano profesional como el personal.

4. Aspectos positivos y negativos más significativos relacionados con el desarrollo del TFM

Los aspectos más positivos que más valoro de mi experiencia durante el desarrollo del TFM han sido: El conocer a personas de las que he podido aprender a como mantener el entusiasmo por estudiar la naturaleza. Tener la oportunidad de trabajar en proyectos de investigación que han ayudado a avanzar, en lo que espero llegue a ser la tesis doctoral, en la línea de investigación que me interesa principalmente, como es el uso de la

genética de poblaciones en estudios de ecología, filogeografía y conservación marina. Por otro lado, los aspectos negativos han sido muy escasos pero parecen demorarse en el tiempo y han estado limitados al simple hecho de ver a compañeros que, por culpa de falta de financiación, han tenido que dejar de lado, temporalmente por suerte en algunos casos, sus expectativas académicas y profesionales como investigadores.

5. Valoración personal del aprendizaje conseguido a lo largo del TFM

Finalmente, la valoración personal del aprendizaje conseguido a lo largo del TFM ha sido positiva y útil para ampliar mi desarrollo profesional para llevar a cabo proyectos de investigación relacionados con la genética de poblaciones y evolución de especies marinas con fines conservacionistas y de gestión del medio marino.