

Amama
Aita, Ama, Ekaitz
eta Angelari

ESKER ONAK

Norbaitek inoiz esan zidan bidaiak bi motatakoak bakarrik izan zitezkeela: luzeak eta aspergarriak, edo laburrak eta biziak. Eta, azken finean, zer da ba Doktorego-tesi bat, bizitzako bidaia/etapa bat baino? Nire kasuan horrela izan da behintzat. Baina inolaz ere ez aipatutako multzo bietako batean sailkatzeko bidaia; luzea, bai noski, baina guztiz bizia, gorabehera izugarriekin. Pertsonalki eta profesionalki hazten eta hezten lagundu didan bidaia aberasgarria izan da, ezbairik gabe.

Bidaia luze honetan modu batera edo bestera bidelagun izan dudana zenbaiten zordun naiz. Hasteko gidari izan zaituztedan Andone eta Haritz. Genetikaren arloan, Andone, zuk erakutsi dizkidazu jakintza eta, askotan beharrezkoagoak izan diren, planteamendu molde garrantzitsuenak. Haritz, zuk aldiz, hain arrotzak zitzaizkidan tunidoen ekologia eta arrantza-kudeaketa arloetako ezagutza eta gorabeherak aplikatzen lagundu didazu. Gainera, biek ala biek erakutsi dizkidazue zientzia mundu honen aurpegiak, atseginenak eta baita gordinenak ere. Zuen zuzendaritza, gomendioak eta baikortasuna, zientzia munduko nire lehen pausuentzat bultzada izan dira. Mila esker.

Mikel eta Carmen, eskerrik asko zuei ere. Zuen laguntza, ikuspuntu, eta ideien iraulketa zentzudunik gabe, nekez ikusiko lukete argia artikuluek, eta are gutxiago tesi honek. Genetikako taldera heldu nintzenean “Abereak” zuen izena, eta zuen artean gustora sentiarazi ninduzuen hasieratik. Eskerrik asko taldekide guztiei behar izan zaituztedanean hor egoteagatik: Antropoko garaietako lan & komeriengatik Iratxe, Igor eta Ir (haiek garaiak!), Peitx maisua (animo kamarada), Otsanda eta Aitor aholkuengatik eta Txusa (encurtido invertebrado), filogenien inguruko jarraibideengatik. Eskerrik asko ere zerbitzuko Irati eta Ferri, Taqman teknologian “aditu” bilakatzen laguntzeagatik (jeje). Ezin ahaztu Mikel, Jorge, David eta Alba, taldeko kimu berriak, batez ere informatika alorrean beti laguntzeko prest egoteagatik. Eskerrik asko baita ere Jokin, Unai (hire aitari ere eskerrak luzatu), Haritz, Dani, Carolina, Urko eta Asier, zuen egonaldietan asko lagundu didazue eta. Nahiz eta taldekoa ez izan, eskerrik asko Montse! zure animo eta kafeak momentu aldatsuenak garaitzeko premiazkoak izan baitira.

Mila esker Genetika saileko lagunei, orotariko zalantza edo beharrei erantzuna bilatzen laguntzeagatik, baita ere Inmari, azken txanpako galderak ebazten laguntzeagatik. Eskerrik asko Maialen (zazpi bizitza oparitzeagatik), Iraia, Ane, Olatz², Naiara, Jone, One, Koldo, Ainhoa, Eguz, Dorkaitz, Amaia eta Apraizi, bazkalorduak eta kafeak barre artean eta gustura asko pasarazteagatik.

AZTIko Nicolas, Igaratza, Iñigo, Igor, Maite eta Borjari eskerrik asko, Ziburun, Hondarribian edo Cambrils-en laginketa-lan mardulean laguntza emateagatik. Eskerrak baita Jon, Katerin, Josu, Naiara, Iñaki, Alaitz eta Sarairi, askotariko laguntza behar izan dudanean beti

baiezkoa erantzuteagatik. Eskerrik asko Cambrils-en ezagutu zintuztedan Toni, Silvia, Maria eta Joan-i, arrantza-egun ederrengatik, eta baita ardoagatik ere! Neure buruari ere eskerrak, goizaldeko 03`00retako Arrigorriaga-Bermeo, Arrigorriaga-Hondarribi etab.-eko hamaika bidaietan emandako bakarriketa eta animoengatik.

Ezin ahaztu laborategira gatza eta piperra ekarri zenituen andaluziar-txokoari: Electroni-Miguel, milesker munduaren aurrean zaren modukoa agertzeagatik beti, eta Giltzero, ez zinen adiskidetasun bila etorri baina nik behintzat, lagun handia topatu dut zugar. Zurekin batera Clara ekarri zenuen, mundua ulertzeko ikuspegi ezin alaiagoa erakusten duen pertsona handi hori. Eskerrik asko bioi guztiagatik! Arrantza-taldeari eskerrak, nahiz eta azkenaldian baztertuta zaituztedan, deskonektatzeko paradak eskaintzeagatik, Asturiaseko lupinak zain ditugu!!Eskerrik asko baita ere Goiri, Aitzpea (nahiz eta ez sinetsi, asko lagundu didazu) eta Amalur, batez ere "aitatxo pistatxo" moduko momentuak oparitzeagatik!

Eskerrik asko aita eta ama. Eskerrik asko beti nigan sinetsi izan duzuelako eta behar izan dudanean animatu egin nauzuelako, eta horretan jarraitzen duzuelako. Momentu txarretan nirekin egon zarete eta hemendik aurrera, poztasunak eta momentu ederrak ere zuekin konpartitzen jarraitu nahi dut. Mila esker txikitatik bizitzan hain garrantzitsuak diren printzipio, aholku eta onberatasunaren garrantzia helarazteagatik eta haiekin hezteagatik. Eskerrik asko Ekaitz, bizitzako alderdi askotan gidari ezin hobea izan zaitudalako, eta askotan diozun bezala, zuri tokatu izan zaizulako beti bidea irekitzea. Eskerrik asko ere laginketa kontuetan eta behar izan dudanean laguntzeko prest egoteagatik. Hiruroi eskerrak baita ere kobratu gabeko 20 hilabeteetan, eskatu gabe ere, ekonomikoki laguntzeko beti prest egoteagatik.

Bukatzeko, eskerrik asko Angela. Zure laguntza, animo eta sakrifizio infinituengatik. Hasiera-hasieratik hor egon zara, eta bidaia honen bukaeran ere hemen zara ahal zenuen guztian laguntzen, beti bezala nire ondoan. Maiz falta izan zaidan oxigenoa zuk eman didazu, makalguneak zure bultzadek ordezkatu dituzte, munduaren garratzasunei zure gozoki paregabeekin aurre egin diegu, eta garrantzitsuena, kanpoko ankertasunak zure hitzek uxatu dituzte.

Ziur asko eskerrak jaso gabe jende asko utzi dudala, hala bada, bidaide izan zaituztedan guzti-guztiori eskerrik asko eta laster arte!

Aurkibidea

Laburpena	3
Abstract	4
I. Kapituluak: Sarrera	5
1. <i>Thunnus</i> generoa	7
1.1. <i>Thunnus</i> generoaren sistematika	7
1.2. Hegaluze eta hegalabur populazioen egoera	9
1.2.1. Hegaluzea	9
1.2.2. Hegalaburra	10
1.2.3. Hegaluze eta hegalabur arrantzaren garrantzia sozioekonomikoa	11
2. Itsas genetika	12
2.1. Populazio egituraketaren identifikazioa	13
2.2. Kontserbazioa eta jasangarritasun genetikoa	14
2.3. Espezie identifikazioa eta trazabilitatea	15
Hipotesiak eta helburuak	17
II. Kapituluak:	21
- <u>Lehenengo ikerlana</u> SNP aurkikuntzak hegaluzearen eta hegalaburraren mundu mailako populazio egitura argitzen laguntzen du	23
III: Kapituluak:	55
- <u>Bigarren ikerlana II</u> : SNP markatzaile berriek hegaluzearen (<i>Thunnus alalunga</i>) egitura genetikoa eta populazioaren tamaina efektiboa argitzen dituzte	57
IV. Kapituluak:	81
- <u>Hirugarren ikerlana</u> : Hegaluzearen eredu filogeografikoak eta <i>Thunnus</i> espezieen arteko lotura filogenetikoak DNAMt-an oinarrituta	83
V. Kapituluak :	103
- <u>Laugarren ikerlana</u> : Hegaluzearen jatorria egiaztatzeko SNPetan oinarritutako trazabilitate lanabes genetikoa	105
VI. Kapituluak: Eztabaida orokorra	119
1. SNP markatzaile aurkikuntza hegaluzean	123

2. Hegaluzearen egitura genetikoa _____	125
2.1. Mediterraneo itsasoa _____	126
2.2. Ozeano Atlantikoa eta ozeano Pazifikoa _____	128
2.3. Ozeano Indikoa _____	128
3. Aplikazioa hegaluzearen kudeaketan _____	129
3.1. Hegaluze stock-en definizioa eta mugaketa _____	129
3.2. Ipar Atlantikoko hegaluzearen tamaina efektiboaren estimazioa _____	132
4. <i>Thunnus</i> generoko lotura filogenetiko eta ebolutiboak _____	132
4.1. Hegaluzearen populazio egitura DNAMt-ean oinarrituta _____	132
4.2. <i>Thunnus</i> generoaren eboluzioa _____	133
5. Hegaluzearen jatorria egiaztatzeko SNPetan oinarritutako trazabilitate lanabes genetikoa__	135
Ondorioak_____	137
Bibliografia_____	141



Laburpena

LABURPENA

Hegaluzearen (*Thunnus alalunga* Bonn., 1978) kudeaketa egokia izan dadin, mundu mailako populazio egitura genetikoaren ulermen egokia beharrezkoa da. Aldakortasun genetikoa aztertzeke helburuarekin, Doktorego-tesi honetan hegaluzean nukleotido bakarreko polimorfismoak (SNPak) aurkitzeke estrategia desberdinak eta SNPen aplikazioa burutu dira espeziearen banaketa osoa eta hainbat belaunaldi ordezkatzan dituen lagin kopuru handian. 53 eta 58 SNP nuklearreko bi panelek 0,000 eta 0,051 arteko F_{ST} balioak erdietsi dituzte 26 laginketa tokitan 1.331 hegaluze lagin genotipatzean. Genetikoki homogeneousak diren lau populazio definitu dira: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, ozeano Indikoa eta ozeano Pazifikoa. Bestalde, bost eskualde mitokondrietako (CR, 12S, 16S, Cyt *b* eta COI) sekuentzia eta bederatzi SNP mitokondrial aztertu dira gaur egun definitutako hegaluze stock-etako laginetan. Azterketa filogeografikoek distantzia geografikoekin korrelazionatutako bi haplotalde daudela erakutsi dute, Mediterraneoan izan ezik, zeinek ezohiko isolamendu maila agertzen duen. Bukatzeko, populazio tamaina efektibo garaikide eta historikoa estimatu dira ipar Atlantikoan, emaitzek erakutsi dute ez dela gainbehera genetikorik gertatu populazio honetan.

Bost eskualde mitokondrialen sekuentziazioan eta mitokondria-genoma osoen sekuentzietan oinarritutako *Thunnus* generoaren filogeniak ez du zortzi espezieen egungo *Neothunnus* eta *Thunnus* subgeneroetan oinarritutako azpitaldekapena babesten. Datazio analisisiek hegaluzea generoko espezierik zaharrena dela nabarmentzen dute, moja atunak (*Thunnus obesus*) hurbiletik jarraiki. Espeziazio hauen ostean, denboraldi labur batean, generoko gainontzeko espeziazio gertaerak jazoko ziren. Bestalde, berriki gertatutako Pazifikoko atungorriaren sorkuntza proposatzen dugu lan honetan, Atlantikoan bizi zen hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arbasoak Pazifikoa populatu eta fundatzaile efektuaren ondoren gertatutako. Ikerketa honetan, gainera, bestelako antzinako eta orain dela gutxiko hibridazio gertaerak antzeman ziren *Thunnus* espezieen artean.

Bukatzeko, SNP nuklear eta mitokondrialetan oinarrituta, legez kanpoko, aitortu gabeko eta arautu gabeko arrantza galarazteke lanabes genetiko bat diseinatzea lortu dugu, hegaluzetik eratorritako produktuen etiketazioa egiaztatzeke. Doktorego-tesi honetan, SNPak indibiduoek jatorri geografikoa esleitzeko bezain informagarriak direla nabarmendu da. Izan ere, 32 SNP informagarri erabilita indibiduen %68a Mediterraneo, Atlantiko edo Indo-Pazifikora esleitu dira %100eko fidagarritasunaz.

ABSTRACT

The optimal management of the over-exploited, pelagic tuna, albacore (*Thunnus alalunga* Bonn., 1978) requires a better understanding of population structure than has been provided by previous molecular methods. Despite numerous studies the population structure remains controversial. This PhD thesis reports the different approaches for single nucleotide polymorphisms (SNPs) development in albacore and the application of these SNPs to survey genetic variability across the geographic range of the species. Two panels of 53 and 58 nuclear SNPs yielded values of F_{ST} ranging from 0.0 to 0.051 between samples after genotyping 1,331 albacore individuals collected throughout the worldwide distribution of this species. Results indicated the existence of four genetically homogeneous populations delimited within the Mediterranean Sea, the Atlantic Ocean, the Indian Ocean and the Pacific Ocean. For the North Atlantic Ocean albacore, *short-* and *long-term* effective population sizes were estimated, and results showed no historical decline for this population.

In addition, sequences from five mitochondrial regions (CR, 12S, 16S, Cyt *b* and COI), plus nine mitochondrial SNPs were analyzed in samples from all actually defined stocks of albacore. The phylogeographic analyses revealed the presence of two haplogroups, which frequencies were correlated with geographic distances except for the Mediterranean, which shows an unusual level of isolation also with SNP based analysis.

Regarding the 8 species included in *Thunnus* genus, the five mitochondrial regions above and mitochondrial genome wide sequences don't support actual subdivision in two subgenera *Neothunnus* and *Thunnus*. Results also evidence hybridization events between species of the genus *Thunnus* either, in this regard, in this PhD thesis has been proposed an ancient introgression of albacore mtDNA in the common ancestor of Pacific and Atlantic bluefin, which then inhabited the Pacific Ocean and originated the Pacific bluefin tuna.

Finally a genetic traceability tool based on both nuclear and mitochondrial SNPs has been designed to be implemented to hinder Illegal, Unreported and Unregulated fishing certifying the labelling of derived products. In this PhD thesis, we show that SNPs are highly informative for assigning individuals to their geographic origin. In fact, applying 32 informative SNPs we found that 68% of individuals were assigned to their Mediterranean, Atlantic or Indo-Pacific origins, with 100% reliability.

I. Kapitulua



Sarrera

1. *Thunnus* generoa

1.1. *Thunnus* generoaren sistematika

Thunnus generoaren fosil-erregistroa Eozeno ertainera artekoa da, 40 milioi urte ingurukoa alegia (Carrol 1988; Benton 1993). Zortzi espeziek osatzen dute *Thunnus* generoa, Collett-ek (1978) espezieak bi subgenerotan banatu zituen: batetik, *Thunnus* subgeneroa, ur epeletako espezieak biltzen dituen (atun gorrien taldea), eta bestetik *Neothunnus* subgeneroa, ur tropikaletakoak (atun hegats-horien taldea) (1.1. Taula). Sailkapen hau, bero-trukaketarako barne sistema izatean (*Thunnus*) edo ez izatean (*Neothunnus*) oinarritzen da. Bestalde, hezurdura ardatzeko ezaugarriek eta bestelako ezaugarri anatomikoak ere kontuan hartzen dira espezieak aipatutako subgeneroetan sailkatzeko (Nakamura 1965; Gibbs & Collette 1967).

1.1. Taula. *Thunnus* generoko espezieen sailkapena Colletteren (1978) arabera, izen zientifikoa, izen arrunta euskaraz, izen arrunta ingelesez eta espezie bakoitzaren FAO kodea.

Subgeneroa	Izen zientifikoa	Euskarazko izen arrunta	Ingelerazko izen arrunta	FAO kodea
<i>Thunnus</i>				
Subgeneroa				
	<i>Thunnus alalunga</i>	Hegaluzea	Albacore	ALB
	<i>Thunnus thynnus</i>	Hegalaburra	Atlantic bluefin tuna	BFT
	<i>Thunnus orientalis</i>	Pazifikoko atungorria	Pacific bluefin tuna	PBF
	<i>Thunnus maccoyii</i>	Hegoaldeko atungorria	Southern bluefin tuna	SBF
	<i>Thunnus obesus</i>	Moja atuna	Bigeye tuna	BET
<i>Neothunnus</i>				
Subgeneroa				
	<i>Thunnus albacares</i>	Atun hegats-horia	Yellowfin tuna	YFT
	<i>Thunnus tonggol</i>	Tongol atuna	Longtail tuna	LOT
	<i>Thunnus atlanticus</i>	Atun hegats-beltza	Blackfin tuna	BLF

Moja atunak (*Thunnus obesus*) bi subgeneroei dagozkien ezaugarriak ageri dituen arren, *Thunnus* subgenero barruan sailkatuta dago. Izan ere, *Thunnus* subgeneroaren ezaugarriak eratorriak eta ur epeletara egokitutakoak direla onartuta dago (Collette 1978). Hegalaburraren (*Thunnus thynnus*) eta Pazifikoko atungorriaren (*Thunnus orientalis*) banaketa alopatrikoan eta haien arteko desberdintasun morfologiko ezan oinarrituta, taxonomistek bi atun hauek espezie baino, subespezie gisa sailkatu zituzten (Jones & Silas 1960; Iwai & Nakamura 1964; Iwai *et al.* 1965; Gibbs &

Collette 1967). Nahiz eta barne luzakinaren transkriptoaren (ITS1) sekuentzia bi espezieetan berbera izan, gene mitokondrialetan oinarritutako zenbait lanek (Sharp & Pirages, 1978; Chow & Inoue, 1993; Chow & Kishino, 1995; Alvarado Bremer *et al.* 1997) agerian utzi zuten haien arteko desberdintasun genetikoa generoko gainontzeko espezien arteko desberdintasunen maila berekoak direla.

Thunnus generoaren jatorri monofiletikoa datu anatomiko (Collette 1978) zein molekular guztiek babesten dute. Alabaina, azterketa molekular gehienek ez dute *Thunnus* eta *Neothunnus* subgeneroen banaketa sostengatzen. Sharp & Piragesek (1978) eta Chow & Kishinok (1995) *Thunnus* subgeneroak talde monofiletikoa osatzen zuela arbuiatu zuten hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) dibergentzia izugarria oinarri hartuta. Chow & Inouek (1993) murriztapen-zatien luzerako polimorfismoen (RFLP) bidez eta Elliott eta Wardek (1995) alozimetan oinarrituta, hegalaburra eta hegoaldeko atungorria (*Thunnus maccoyii*) hegaluze eta Pazifikoko atungorritik baino, filogenetikoki *Neothunnus* subgenerotik hurbilago zeudela erakutsi zuten. Era berean, sekuentzia mitokondrialak eta nuklearrak erabilia, Chow *et al.*-ek (2006) aipatutako subgeneroen existentzia ezeztatu zuten. Kontrol eskualde (CR) mitokondrialaren sekuentzietan oinarrituta, Alvarado Bremer *et al.*-ek (1997) *Thunnus* eta *Neothunnus* subgeneroen jatorri monofiletikoa babesten zituzten emaitzak argitaratu zituzten; hala eta guztiz ere, ez zuten zehazten moja atunaren sailkapena subgenero bietako batean. Sekuentzia nuklear eta mitokondrialak aztertu dituzten lanek (Chow *et al.* 2006) aldizkako espeziazioak gerta zitezkeela aipatzen dute, honek subespezieen existentzia baztertuko luke.

Laburbilduz, *Thunnus* generoaren barneko erlazio filogenetikoena oraindik ere guztiz argitu gabeko gaia da (Tsen *et al.* 2012). Honela, GenBank datu-basean dauden sekuentzia mitokondrial gehienen bilketak, *Thunnus* generoaren historia ebolutiboa definitzen lagunduko luke. Generoko zortzi espezieen arteko lotura filogenetikoak deskribatzen dituzten lan gehienak gene bakarrean edo bi genetan oinarritutakoak dira. Haatik, tamaina desberdinetako sekuentzien ikuspegiak (genoma mitokondrial osoa, kateatutako hainbat gene eta gene bakarra) eta hauen azterketatik eratorritako emaitzen alderaketak, generoaren filogenia argitzen eta espeziazio gertaeren erreferentzia tenporalak ezartzen lagundu dezake. *Thunnus* generoko lotura filogenetikoak argiak ez izateaz gain, espeziazio gertaeren datazio zehatzik ere ez da ezagutzen. Hau horrela izanik, DNA mitokondrialaren ikuspegi anizkunak aipatutako prozesu ebolutiboak ulertzen lagunduko luke.

1.2. Hegaluze eta hegalabur populazioen egoera

1.2.1. Hegaluzea

Hegaluzea, *Thunnus alalunga* (Bonnaterre 1788), ur tropikal, subtropikal eta epeletan bizidena (Collette & Nauen 1983) espezie ozeaniko, epi eta mesopelagikoa da.

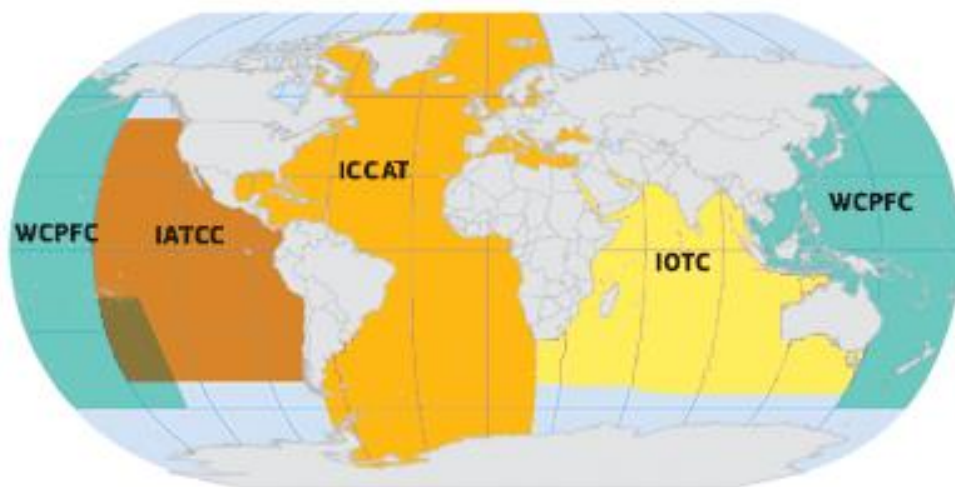
Thunnus generoan, hegaluzeak dauka banaketa eremurik zabalena, ozeano Pazifikoan, Indikoan eta Atlantikoan, Mediterraneo itsasoan barne aurkitzen baita. Espeziearen banaketa muga latitudinalak 50-55°I paralelotik 40-45°H paraleloan kokatzen dira (Arrizabalaga *et al.* 2014). Ur tropikal eta epeletako banaketa kosmopolita espeziearen baldintza ozeanografikoekiko (tenperatura aldakuntza handiak, adibidez) egokitzapenaren adierazgarri da, tenperaturaren aldakuntza izugarriekin. Espeziea 13,5°C eta 25,2°C arteko mugan aurkitu ohi da, nahiz eta 9,5°C-tako tenperatura jasan dezakeen denboraldi laburretan zehar (Arrizabalaga 2003).

Thunnus generoko tunidorik txikiena da. Collette & Nauen-ek (1983) espeziearen gehiengo luzera 127cm-tan ezarri zuen, Le Gall-ek (1974) ordea, 130 cm-tan ezarri zuen gehiengo Atlantikorako. Teorikoki hegaluzea 15 urtera arte bizi badaiteke ere (Le Gall 1974), markatutako hegaluzerik ez da hamar urtetik gora aske bizi izan (Arrizabalaga 2003; Santiago & Arrizabalaga 2005). Atlantikoan, 90 cm-tara heltzean (5 urte), arrainen %50ak heldutasuna lortzen dutela asumitzen da (Bard, 1981), Mediterraneoan aldiz, 62 cm-ra heltzean (Arena *et al.* 1980). Interes komertziala duten beste espezie batzuekin alderatuz gero, (antxoia europarra (*Engraulis encrasicolus*); mihi-arraina *Xystreureys rasile*), hegaluzearen bizi zikloa askoz luzeagoa da, honek gehiegizko arrantza jasan osteko berreskurapena mantsoagoa izatea eragin dezake (Collette *et al.* 2011).

Hegaluzearen ugalketari dagokionean, hau ez da ongi ezagutzen gainontzeko tunidoekin alderatuz gero (Juan-Jordá *et al.* 2013). Ugalketa-estrategia errunaldi luzeetan, tenperatura altuko uretan eta aldi bakoitzeko arrautza-askatze ugarietan gertatzen da. Tenperatura altuak eta baita termoklina sakonak ere ugalketa estimulatu dutela dirudi. Atlantikoko hegaluzearen erruteguneak bi hemisferioetako mendebaldeko eskualde subtropikaletan kokatzen dira: Venezuela aurreko uretan, Sargazo itsasoan (Le Gall 1974; Nishikawa *et al.* 1985), Mexikoko golkoan (Richards 1984) eta Brasilgo ekialdeko kostaldearen aurrean (Beardsley 1969; Koto 1969). Mediterraneoan, zenbait eremutan aurkitu dira hegaluze larbak (Ueyanagi 1971, Dicenta 1975, Lalami *et al.* 1973, Piccinetti & Manfrin 1993, Marano 1999, García *et al.* 2002).

Espeziearen kudeaketari dagokionez, Arrantza Antolaketarako Erakunde Erregionalek (RFMO) tunidoen arrantzategiak mundu mailan kudeatzen dituzte (1.1. Irudia):

- **ICCAT:** Atlantiar Atunak Zaintzeko Nazioarteko Batzordea (Atlantikoko eta Mediterraneoko tunidoen arduraduna).
- **IOTC:** Indiar Ozeanoko Atunaren Batzordea (Indikoko tunidoen arduraduna).
- **WCPFC:** Pazifiko Mendebalde eta Zentraleko Arrantza Batzordea (Pazifiko mendebaldeko eta eremu zentraleko arduraduna).
- **IATTC:** Atun Tropikalaren Batzorde Interramerikarra (Pazifikoko ekialdeko eta eremu zentralen arduraduna).



1.1. Irudia: Hegaluzearen stock-en kudeaketaz arduratzen diren Arrantza Antolaketarako Erakunde Erregionalek (RFMO) (“Batzordearen Arrantza Politika Komunaren kanpo-hedaduraren gaineko komunikazioa Europako parlamentuari, kontseiluari, ekonomia eta gizarte batzordeari eta erregioen batzordeari” Brusela, 2011.7.13 COM(2011) 424 amaia).

RFMO erakunde hauek sei stock definitu dituzte hegaluzea kudeatzeko: (i) Mediterraneo itsasoa, (ii) ipar Atlantikoa, (iii) hego Atlantikoa, (iv) Indikoa (v) ipar Pazifikoan eta (vi) hego Pazifikoa.

1.2.2. Hegalaburra

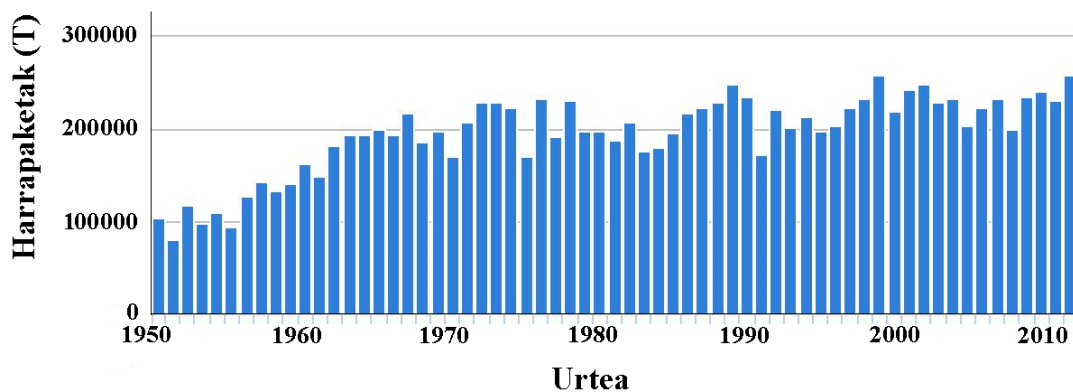
Hegalaburra edo zimarroia (*Thunnus thynnus* Linnaeus 1758) ipar Atlantiko eta Mediterraneoko ur epeletan bizi da (Nakamura 1969; Collette & Nauen 1983; Fromentin & Fonteneau 2001; Riccioni *et al.* 2011). Urazalean eta urazalpeko uretan bizi ohi da, nahiz eta 1000 m arteko sakonera arte heldu daitekeen (Block *et al.* 2001).

20 urterekin hegalaburrak 270 cm eta 400 kg izan ditzake, *Thunnus* generoan tamainarik handiena lortzen duen espeziea da. Bizitza luzeko espeziea da, bizi zikloa 40 urte ingurukoa baita (Cort *et al.* 2014). Bizi ziklo luzeak, heldutasun sexual berantiarak (4-5 urte Atlantiko ekialdean), errute-gune mugatuak eta ugalketa aldi motzak (1-2 hilabete) izateak kolapso arriskuan jarri dezakete espeziea, batez ere gehiegizko eta etengabeko arrantza baldintzetan (Collette *et al.* 2011).

Atlantiar Atunak Zaintzeko Nazioarteko Batzordea (ICCAT) Atlantikoko hegalaburra zaintzeko ardura duen erakundea da. 1980tik bi stock definitu dira Atlantikoan, harrapaketa historikoen banaketa etenean oinarrituta (Fromentin & Powers, 2005). Kudeaketa unitate bien arteko muga 45°W meridianean kokatzen da: (i) Atlantiko mendebaldea eta (ii) Atlantiko ekialdea (Mediterraneoan barne). Gaur egun, hegalaburrarentzat berreskuratze plan bat (ICCAT [14-04] gomendioa) ezarrita dago, zeinek urtero Baimendutako Guztizko Harrapaketa (TAC) kuota ezartzen duen espeziearen berreskuratzea lortzeko beste neurri osagarri batzuen artean.

1.2.3. Hegaluze eta hegalabur arrantzaren garrantzia sozioekonomikoa

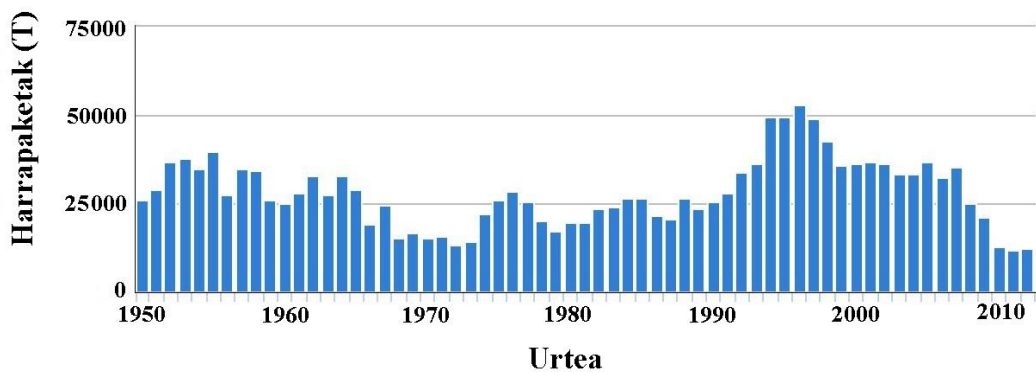
Freskoan zein kontserban salduta, hegaluzeak lortzen duen prezio altua dela eta, merkataritza- zein kirol-arrantzageti garrantzitsuak hedaturik daude mundu zabalean. *Thunnus* generoan hegaluzea da kontserbetan balio komertzial handienetakoa lortzen duena, eta harrapaketa guztiak kontuan izanik, laugarrena (FAO 2011). Mundu mailako espeziearen arrantzak gora egin du nabarmen 50. hamarkadatik, urteko 200,000 tona ingurura helduz (1.2. Irudia).



1.2. Irudia. Mundu-mailako hegaluze harrapaketen bilakaera 1950etik 2012ra (FishStatJ- FAO 2014-tik eraldatua).

Hegalaburraren balio ekonomikoa askoz ere handiagoa da sushi eta sashimi merkatuek 80. hamarkadan jasan zuten garapena dela eta. Gaur egun neurrigabeko prezioak lortzen ditu japoniar merkatuetan (Fromentin & Powers 2005), 2013. urtean adibidez, 222 kg-ko hegalabur bakar bat 1,38 milioi eurotan saldu zen Tokioko Tsukiji merkatuan. Espeziearen harrapaketek goia jo zuten

80. hamargarren hamarkadaren erdialdean; azken urteotan, harrapeketek behera egin dute urteroko TAC-ak ezartzearekin batera.



1.3. Irudia. Mundu-mailako hegalabur harrapaketen bilakaera 1950etik 2010ra (FishStatJ- FAO 2014-tik eraldatua).

Bi espezieen berezko ezaugarriek (bizi ziklo luzea, errute-gune ia ezezagunak eta errunaldi motzak), balio ekonomiko handiarekin batera, gehiegizko arrantzaren eraginez bereziki kalteberak izatea eragin dute (Collette *et al.* 2011). Kalteberatasun maila honek espezieen gain aplikatzen diren kudeaketa neurriek epe luzera eraginkorrak izatea eskatzen dute. Horretarako, metodologia zientifiko desberdinek stock-en inguruan eskaintzen duten jakintza-alor anitzetako informazioak (populazio egituraketa, migrazioak, aldakortasun genetikoa, etab.) fidagarria, eguneratua eta baliagarria izan behar du, kudeatzaileek erabaki egokiak har ditzaten.

2. Itsas genetika

Gehiegizko ustiapenak eragindako arazoaren eta populazioaren egituraren inguruko ezjakintasunaren aurrean, itsas genetikak eta bioteknologiak ozeanoetako biodibertsitatean eragina duten modelo eta prozesuak hobeto ulertzen laguntzen dute. Frederick Sanger-ek 70. hamarkadan lehen sekuentziazio metodologia garatu zuenetik, genetika arloko ikerketak hedapen azkarra izan du. Honela, genetika ustiaturako hainbat itsas espezieetan aplikatzeak ugaritasun, banaketa eta egituraketa ereduaren ulermena hobetu du, gainera, iraultza kontzeptuala suposatu zuen teoria ekologiko zein ebolutiboetan (Hauser & Seeb, 2008). Bestalde, berriki argitaratutako arrain espezie ugariren genomen sekuentziazioak ornodunen eboluzioaren inguruko zantzu garrantzitsuak azalarazten ari da (Roest & Weissenbach, 2005), baita arrain espezieetan barne.

2.1. Populazio egituraketaren identifikazioa

Stock edo populazio kontzeptuak funtsezkoak dira ustiatutako espezieen ikerketan, izan ere, arrantza kudeaketarako politikak definitzeko eta aplikatzeko oinarrizko unitateak dira. Gisa honetan, stock-en (edo kudeaketa unitateen) definizioa eta euren mugatzea, giltzarri dira ustiapenaren jomuga diren espezieen kudeaketa jasangarria lortze aldera. Berau lortzeko, populazio egitura ikertzeko hurbilketa anitzen erabilerak erabateko informazioa eskuratzea ahalbidetzen du, izan ere, teknika bakoitzak bere aldetik, populazioaren aspektu espezifikoaren ezagutza erlatiboak eskainiko ditu (Ihssen *et al.* 1981; Ruzzante *et al.* 1999; Waldman *et al.* 1997). Ikuspuntu biologiko eta genetiko batetik, osotasun genetikoaren kontuan hartzen duen stock-aren definizioa baliagarriagoa da (Jamieson 1973; Ovenden 1990), honek baliabideen dibertsitate genetikoaren epe luzera begira kontserbatzea ahalbidetuko baitu. Hauexek, genetikoaren hain zuzen ere, izan da lan honetan kontuan izan den ikuspuntua.

Arrantza-egituraren okerreko kudeaketak, hau da, benetako populazio egiturarekin bat ez datozen kudeaketa unitateen definizioak, populazioaren murriztapena, eta ondorioz produktibitatearen behar-kada, sor lezake (Hauser & Carvalho 2008), eta kasu larrietan arrantza-egituraren guztizko gainbehera edo kolapsoa eraginez (Fu & Fanning 2004). Bestalde, gehiegizko ustiapena jasaten duten populazioek aniztasun genetikoaren galera jasan dezakete (Hauser *et al.* 2002). Galera honek, etengabe aldatzen ari den inguru baten aurrean espezieak duen moldagarritasunean kaltea eragin dezake.

Tunidoen populazio egituraren azterketan metodologia desberdinak erabiltzen dira: markatze-berratzematea (Arrizabalaga *et al.* 2004), otolitoetako traza-elementuak (Macdonald *et al.* 2013) eta datu morfometrikoak besteak beste (Bard 1981). Markatzaile molekularrei z dagokienean, eodol-taldearen azterketak (Arrizabalaga *et al.* 2004), ez sekuentzia nuklear eta mitokondrialek (Nakadate *et al.* 2005), ezta mikrosateliteek (Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012) ere ez dute lortu modu bateratuan mundu mailako hegaluzearen populazio egitura ebaztea.

Gaur egun, Nukleotido Bakarreko Polimorfismoak (SNP) populazio egituraketan ikerketarako markatzaile molekular hautagaiak bilakatu dira mikrosateliteak bezalako markatzaileen aurrean. SNPak genomaren zehar ugariagoak dira, eta sinpleagoak izaki (ez dira errepikapen kopuruan oinarritzen mikrosateliteak bezala) euren genotipazioa ere sinpleagoa da. Alabaina, mikrosateliteen diskriminazio maila bera lortzeko SNP kopuru handiagoa behar da (Morin *et al.* 2004). Hala ere, egungo sekuentziazio teknologiek genoma osotik barreiatutako SNP kopuru handia aurkitzea eta balioztatzea ahalbidetzen dute. Teknika hauek bereziki baliagarriak dira erreferentziazko genoma faltan duten espezie ez-ereduetarako (Metzker 2010). Lan honetan sekuentziazio masiboa espezie arteko amplifikazioarekin bateratu da (espezie arteko amplifikazio gurutzatua- *cross species amplification*). Sekuentziazio masibo bidez hegalaburrean aurkitutako SNPak amplifikazio bidez filogenetikoki gertu dagoen hegaluzean testatu ziren, honek aurretik

hegalaburrean aurkitutako markatzaile ugari hegaluzean balioztatzea ahalbidetu du. Balioztatze prozesua aurkako noranzkoan ere burutu da, hau da, hegaluzean aurkitutako SNPak hegalaburrean balioztatu dira. Metodologia honen zenbait adibide daude bai mikrosateliteetan (Takagi *et al.* 2001; Montes *et al.* 2012) eta baita SNPetan ere (Helyar *et al.* 2012).

Bestalde, sekuentzia mitokondrialek espezie barruko gene-leinu desberdinen banaketa geografikoa bideratzen dituzten prozesuak ikertzea ahalbidetzen dute (azterketa filogeografikoak hain zuzen ere) (Lourie & Vincent, 2004; Viñas *et al.* 2004; Kunal *et al.* 2014); baita hurbileko espezieen arteko lotura genetikoaren eta historia ebolutiboaren ikerketa ere (azterketa filogenetikoak) (Chow & Kishino 1995; Alvarado Bremer *et al.* 1997).

Gehienbat hegaluzea ardatz duen lan honetan, espeziearen mundu mailako populazio egituraren azterketa egin dugu SNP nuklearren bi panel desberdin erabiliz. Gainera, azterketa filogeografikoa ere burutu da 5 gene mitokondrialen sekuentziaziotik abiatuta. Bestalde, hegaluzean aurkitutako SNPen bidez eta anplifikazio gurutzatua erabilita, hegalaburraren populazio egitura aztertu dugu. Azkenik, GenBank datu basean sekuentzien eskuragarritasuna aprobetxatuz, zortzi espezieen arteko lotura filogenetikoak aztertu dira.

2.2. Kontserbazioa eta jasagarritasun genetikoa

Populazio barneko, populazioen arteko edota belaunaldi desberdinen arteko aldakortasun genetiko mailaren ebaluaketa kontserbazio genetikoari hertsiki lotutako kontzeptua da. Ustiatua izaten ari den (edo ustiagarri izan daitekeen) populazio baten “osasun genetikoari” buruzko informazioa ematen duen neurria da. Zentzu honetan, aldakortasun genetikoaren neurketak ustiapen maila desberdinen baldintzapean populazio batek izan dezakeen berreskurapen probabilitatea ebaluatzea ahalbidetzen du. Mota honetako ebaluaketek kontserbazio programetan daukaten pisua geroz eta garrantzitsuagoa da, izan ere, gehiegizko ustiapena, zatiketa edo bestelako giza-perturbazio edo bizi diren ingurunean aldaketarik jasan duten populazioen biziraupenak (erresistentzia) aniztasun genetikoan datza.

Europar arrantzategi gehienak gehiegizko ustiaketa jasaten dutenez, tamaina zentsalaren gainbehera nabarmena pairatzen ari dira. Baina, indibiduen galera nabarmen honek aniztasun genetikoan ere galera eragin ote du? Galdera honetan datza mamia. Erantzuna topatzeko populazioaren tamaina efektiboa (N_e) estimatu dugu, bideragarritasun genetikoan eragiten duen kontzeptua da tamaina efektiboa. N_e populazio ideal bateko ugaltzaile kopurua da, zeinetan jito genetikoak eragindako maiztasun alelikoen aldaketa tasa, populazio errearen berdina den. N_e populazio batek momentu jakin batean duen aniztasun genetikoari hertsiki lotuta dago, eta populazioaren eboluzioa iragartzen du. Modu honetan, aniztasun genetikoaren galeratik eratorritako desagerpen arriskuaren berri ematen du N_e -k, baita interes bereziko stock baten bideragarritasunean

izan dezakeen inpaktuaz, edota jasangarritasuna lortzeko espezie bati inplementatutako neurri arautzaileen egokitzapenez ere informa dezake.

Populazioaren tamaina efektiboa hiru denbora-tartetan defini daiteke: i) **garaikidea** (belaunaldi bakarra edo gutxi batzuk kontuan hartzen ditu), ii) **historikoa** (azkeneko hamarka edo milaka belaunaldiak kontuan hartzen ditu) eta iii) **antzinakoa** (azkeneko milaka-milioika belaunaldiak kontuan hartzen ditu) (Wang 2005). Doktorego-tesi honetan lehenengo bi denbora-tarteei egiten zaie aipamena. N_e -ren balioespen desberdinak nekez alderatu daitezke, izan ere eskala espazial eta denbora-tarte desberdinen berri ematen baitute (Schwartz *et al.* 1998).

Espezie itsastarretan mikrosatelite markatzaileetan oinarrituta estimatu ohi dira tamaina efektiboak, adibidez burbina ozelatua (*Sciaenops ocellatus*), (Turner *et al.* 2002), platuxa leuna (*Pleuronectes platessa*) (Hoarau *et al.* 2005) edo bakailao atlantiarra (*Gadus morhua*) (Poulsen *et al.* 2006). Kopuru txikiagoan bestelako markatzaileak erabiltzen dituzten lanak ere badira: RFLPak lupia ildaskatuan (*Morone saxatilis*) (Diaz *et al.* 2000), alozimak muxar handian (*Diplodus sargus*) (Lenfant y Planes, 2002) eta sekuentzia mitokondrialak ezpata-arrainean (*Xiphias gladius*) (Alvarado Bremer *et al.* 1995). Tunidoei dagokionean badira N_e estimazioak egin dituzten ikerlanak, guztiak ere mikrosatelite edo sekuentzia mitokondrialetan oinarrituak (Riccioni *et al.* 2010; Qiu & Miyamoto 2011; Qiu *et al.* 2013; Bravington *et al.* 2014 y Nomura *et al.* 2014), hauen artetik bakarrak ematen ditu hegaluzearen N_e estimazioak (Qiu *et al.* 2013) eta batek ere ez ditu SNPak erabiltzen.

Lan honetan ipar Atlantikoko hegaluzearen tamaina efektiboa (N_e) estimatu da. Horretarako, 24 urtetara arteko gehienezko denbora tarteko laginketa egin zen. Bi N_e -ren balioespen burutu ziren: 1) N_e garaikidea, kohorte arteko 58 SNPen maiztasun alelikoen fluktuaziotik balioetsia, eta 2) N_e historikoa, koaleszentziaren teoriaren bidez balioetsia. Hegaluzearantzat estimatutako N_e -en eta N_c -en arteko alderaketak ipar Atlantikoko stock-aren bideragarritasunaren adierazle dira.

2.3. Espezie identifikazioa eta trazabilitatea

Gehiegizko, legez kanpoko eta aitortu gabeko arrantzak, hein berean hirurek ere, populazio murriztuak dituzten espezieen berreskurapena oztopatzen dute (Beddington *et al.* 2007). Tunidoen arrantza kontuan izanda soilik, praktika hauek urtero 580 milioi dolarretako galerak sortzen dituzte. Hegalaburraren kasuan, 90. hamarkadako Mediterraneoko harrapaketatik erdia aitortu gabekoa izan zela uste da (ICCAT 2014). Galera ekonomikoez gain, legez kanpoko praktikek kalte izugarriak eragiten dituzte, itsas ingurunean praktika ez-jasangarriak erabili ohi baitituzte (Agnew *et al.* 2009). Hau horrela izanik, espeziearen edo honen jatorria aitortzean egin daitekeen iruzurra antzemateko lanabes espezifikoa garatzea ezinbestekoa da. Espezieari dagokionean, tunido espezie desberdinak bereizteko metodo molekularrak deskribatzen dituzten lan ugari dago (Bartlett *et al.* 1991; Takeyama *et al.* 2001; Pardo *et al.* 2004; Michelini *et al.* 2007; Lowenstein *et al.* 2009; Viñas

& Tudela, 2009; Santaclara *et al.* 2014). Teknika molekularrak poteratutako, izoztutako eta freskoan dauden produktuak identifikatzeko oso lanabes baliagarriak dira, baita harrapaketen lehorreratzean irregulartasunak antzemateko ere.

Itsas espezieetan populazio jatorria esleitzeko hainbat erreferentzia daude bakailaoan (*Gadus morhua*), legatz europarrean (*Merluccius merluccius*), sardinzarrean (*Clupea harengus*), antxoa europarrean eta mihi-arrain arruntean (*Solea solea*). Alabaina, tunidoetan erreferentzia bakarra dago (ES 2 392 293 B1 Patentea), hegaluzearen jatorria zehazteko hain zuzen ere. Jatorri geografiko indibiduala esleitzeak legez kanpoko arrantzan eta merkaturatzean iruzurraren aurkako kontrola zorroztea, eta ondorioz, stock zehatz baten kontserbaziorako egiten ari diren ahaleginak hobetzea ekarriko luke. Izan ere, aitortua izan ez den arrantzaren identifikazioak arrantza bidezko hilkortasunaren balioespenak zehatzagoak izatea ahalbidetzen du, eta honek stock-en kudeaketa eraginkorra ahalbidetzen du. Bestalde, arrain kontsumitzailea jakinaren gainean dago, geroz eta gehiago, arrantzagiek jasangarriak izan behar dutela, hori dela eta, jasangarritasunaren berme izango den etiketa are preziatuagoa izango du kontsumitzaileak. Ondorioz, stock-en babes eta kontsumitzaileen eskubideak bermatzeko Europar Batasunean kontsumituak izango diren arrantza produktuak jatorri geografikoa identifikatua egon behar du (McCluskey & Lewison 2008).

Bereizmen handiko metodologiak aplikatzen badira jatorri geografiko edo populazio-jatorri indibiduala erdieste da posible da. Zentzu honetan, SNP markatzaileak lanabes oso baliagarriak dira, genomak ugari direlako eta sekuentziazio-konparatibo bidez erraz asko deskriba daitezelako, baita ere, geroz eta gehiago, hirugarren belaunaldiko sekuentziazio (NGS) bidez (Metzker 2010). Horregatik, gaur egun, SNPak dira lanabes molekular errentagarrienak itsas arrainen trazabilitatearen esparruan (Nielsen *et al.* 2012).

Edonola ere ikerlanaren xedearen arabera bereizmen nahikoa agertzen duen markatzaile mota bat edo ugari (populazioaren karakterizazioa, tamaina efektiboaren balioespena, trazabilitatea etab.) erabiltzeaz gain, laginketa estaldura eta lagin bakoitzeko izaten den indibiduo kopurua ere oso garrantzitsuak dira. Izan ere, lan batzuek emaitzak osatugabetzat jotzen dituzte lagin kopurua nahikoa ez izategatik (Viñas *et al.* 1999) edo espeziearen banaketa ez delako guztiz kontuan izan (Davies *et al.* 2011).

Lan honetan guztira 137 SNP erabili dira edozein hegaluzeren jatorria esleitzeko gai den panel bat osatzeko. Hau da, lanabes fidagarri bat zeinek arrantza momentutik prozesatua den arte atunaren trazabilitatea bermatzen duen. Horretarako behar adinako lagin kopurua erabili da, bai erreferentziazko panela osatzeko baita testatze faserako ere.



Hipotesiak eta helburuak

HIPOTESIAK ETA HELBURUAK

Hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) balio komertziala altua izateak espeziea gehieneko errendimendu jasangarriaren (MSY) gaintik ustiatzea eragin dezake. Horregatik, arrantza kudeatzaileek ezartzen dituzten ekintza arautzaileak espeziearen populazio egitura errealekin bat datozen kudeaketa unitateetan oinarritu behar dira. Lanabes molekularrek, SNPak barne, kudeaketa unitateak (stock-ak) modu egokian definitzea ahalbidetzen dute, horregatik, ikerketa eremu honetan geroz eta gehiago erabiltzen dira. Populazio egituraz gain, gehiegizko arrantzak eragin dezakeen stock-en aldakortasun genetikoaren galeraren adierazgarri ere badira lanabes molekularrak. Bestalde, sekuentzia eta SNP mitokondrialek filogeniak eta filogeografia argitzeko baliagarriak ere badira. Bukatzeko, SNP nuklear zein mitokondrialak, legez aurkako arrantzaren eta arrantza produktuetan iruzurraren aurka jarduteko baliagarriak dira.

Genetikaren ikuspuntutik, hegaluzearen hainbat alderdi argitzea beharrezkoa da:

- i) Ez dago adostasunik espeziearen mundu mailako populazio egiturari dagokionean.
- ii) Ez da ezagutzen gehiegizko arrantzak populazioaren tamaina efektiboarengan izan duen eragina, eta ondorioz, hegaluze populazioen aniztasun genetikoan galerarik egon ote den.

Galdera hauen ebazpenak kudeaketa jasangarria aurrera eramateko kontuan hartu beharreko gutxieneko stock kopurua zehaztea eta espeziearen “osasun genetikoa” baloratzea ahalbidetuko du. Espeziearen kontserbaziorako neurriak hartzeko eta neurriok ebaluatzeko oinarritzko informazioa dira galdera hauen ebazpenak.

- iii) *Thunnus* generoko zortzi espezieen arteko lotura filogenetikoaren gaia eztabaidagarria da gaur egun ere, eta hortaz, argitzeke dagoen kontua. Gainera espeziazio eta kladogenesio datazioen inguruan ezjakintasun handia dago.

HIPOTESIAK

Hegaluzea eta *Thunnus* generoa biltzen dituen Doktorego-tesi honetako hipotesiek honakoa planteatzen dute:

Hegaluzearen populazio egituraketari dagokionez:

-H0: Mundu mailan hegaluzea sei populaziotan banatzen da, Arrantza Antolaketarako Erakunde Erregionalek definitutako sei stock-ekin bat datorrelarik.

-H1: Mundu mailan hegaluzea populazio kopuru desberdin batean banatzen da, Arrantza Antolaketarako Erakunde Erregionalek (RFMO) definitutako sei stock-ekin zehatz-mehatz bat ez datorrena.

Ipar Atlantikoko N_e -aren ebaluaketari dagokionez:

-H0: Ipar Atlantikoko stock-aren gain eragindako gehiegizko arrantzak tamaina zentsalaren murrizketa eragin du baina ez N_e -ari eragiteko bezain bestekoa, eta hortaz, ez du aniztasun genetikoan eraginik izan modu esangarrian.

-H1: Ipar Atlantikoko stock-aren gain eragindako gehiegizko arrantzak tamaina zentsalaren murrizketa eragin du populazioaren tamaina efektiboari eraginez, eta ondorioz aniztasun genetikoa murriztu egin da.

Thunnus generoaren ikerketa filogenetikoari dagokionez:

-H0: Gaur egun *Thunnus* generoa bi subgenerotan banatzen da datu anatomiko eta fisiologikoetan oinarrituta, datu genetikoek banaketa hau babesten dute.

-H1: Gaur egun *Thunnus* generoa bi subgenerotan banatzen da datu anatomiko eta fisiologikoetan oinarrituta, datu genetikoek banaketa hau ezeztatzen dute.

HELBURUAK

Doktorego-tesi honetako helburu orokorrak hauek dira: alde batetik, hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) karakterizazio genetikoa, espeziearen kudeaketa jasangarrian lagungarri izan dadin, eta bestalde, ezagutza berrien ekarpenak egin bere historia ebolutiboa *Thunnus* generoaren barnean. Honetarako lau helburu zehatz definitu dira:

i) Mundu mailako hegaluzearen egitura genetikoa ebaztea eta Bizkaiko Golkoko hegaluzearen egituraketa tenporala argitzea. Horretarako, SNP markatzaile berriak aurkitu ditugu eta espeziearen banaketa espazial eta tenporal gehiena baitan hartzen duen laginketa osatu dugu. Mundu mailako egituraketa eta egituraketa tenporala ebaztea lagungarria izango da RFMO-ek neurri arautzaileak hartzeko garaian.

ii) Ipar Atlantikoan aldakortasun genetikoaren galera posiblea ebaluatzea N_e -aren estima garaikide eta historikoaren bidez. Horretarako ahalik eta belaunaldi gehien bere baitan hartzen dituen kohorteen laginketa burutu da. Ebaluaketa hauek hegaluzearen gain gehiegizko arrantzak botilalepo efektua eragin ote duen jakinaraziko digu.

iii) *Thunnus* generoa osatzen duten espezieen arteko loturak ulertzea eta espeziazio gertaerak datatzea sekuentzia mitokondrialen bidez. Honek genero barruan lerro ebolutiboak ezartzea eta gaur egun datu anatomiko eta molekularren artean dagoen eztabaida ebaztea ekarriko luke.

iv) Hegaluzearen jatorri geografikoa desberdintzatzeko trazabilitate lanabesa hobetu aurreko patentean erabilitako markatzailei SNP berriak gehituz. %100-eko eraginkortasuna lortuz gero lanabes berri hau baliabide erabilgarria izango litzateke iruzur komertzialari eta legez kanpoko arrantza ekintzei aurre egiteko.

II. Kapitulu



SNP aurkikuntzak hegaluzearen eta hegalaburraren mundu mailako populazio egitura argitzen laguntzen

SNP aurkikuntzak hegaluzearen eta hegalaburraren mundu mailako populazio egitura argitzen laguntzen du

A. Albaina, M. Iriondo, I. Velado, U. Laconcha, I. Zarraonaindia, H. Arrizabalaga, M.A. Pardo, M. Lutcavage, W. S. Grant, A. Estonba

Laburpena

Hegaluzea (*Thunnus alalunga* Bonn., 1978) eta hegalaburra (*T. thynnus* L., 1758) espezie komertzial garrantzitsuak dira, eta gehiegi ustiatuak izaten ari dira, modu egokienean kudeatuak izateko, metodo molekularrek orain arte lortu dutena baino populazio egituraren ulermen hobea beharrezkoa da. Nahiz eta bi espezieen inguruko hainbat ikerlan egon, hauen populazioen egiturak eztabaidagai izaten jarraitzen du. Ikerlan honek hegaluzean eta hegalaburrean Nukleotido Bakarreko Polimorfismoen (SNP) garapena deskribatzen du, eta markatzaile hauen aplikazioa espezieen hedadura geografiko osoan zehar aldakortasun genetikoa neurtzeko. 54 DNA nuklear zatiren sekuentziak 35 hegaluzetan konparatuz 616 SNP aurkitu ziren guztira. 53 SNPeko panelarekin 0,0 eta 0,050 arteko F_{ST} balioak lortu ziren hegaluzearen banaketa eremu guztiko 460 hegaluze genotipatzean. Ez zen heterogeneotasunik aurkitu ozeanoen barnean, ozeanoen arteko konparaketak (ozeano Atlantikoa, Pazifikoa eta Indikoa eta Mediterraneo itsasoa), aldiz, esangarriak ziren. Bestalde, 17 SNPeko panela garatu zen hegalaburrean espezie arteko anplifikazio gurutzatuaren bidez 107 indibiduotan. SNP kopuru mugatu honek hegalaburraren bi errute-gune nagusietako laginak bereizten zituen ($F_{ST} = 0,116$). Ikerlan honetan garatutako SNP markatzaileak indibiduo kopuru handia genotipatzea ahalbidetzen dute, laborategi arteko aleloen estandarizazioaren beharrik gabe.

Hitz-gakoak: *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, Nukleotido Bakarreko Polimorfismoa (SNP), SNP aurkikuntza, populazio genetika, arrantza kudeaketa.

1. Sarrera

Genetika molekularrak kontuan hartzeko aurrerapenak eragin ditu espezie itsastarren ekologia ulertze aldera, batez ere populazio basatien dinamika demografiko eta ebolutiboan inguruan ezagutza berrien ekarpenak eginez (Hauser & Carvalho 2008). Markatzaile genetikoak askotan erabiltzen dira stock-ak identifikatzeko, arrantzategi bateko stock mistoak estimatzeko, populazio barneko aniztasun genetikoaren segimendua egiteko eta populazioen arteko lotura neurtzeko beste

hainbat aplikazioekin batera (adb. Nielsen *et al.* 2009; Waples & Naish 2009). Ikerlan hauek irauli egin dute espezie itsastarren populazio handiak, nahiz eta egokitzapen lokal mugatuak izan, genetikoki homogeneousak direneko ideia (Hauser & Carvalho 2008 berrikuspena). Gainera, egituraketa genetikoen berri eman da eskala espazial txikitan ere (adb. Knutsen *et al.* 2003; Jørgensen *et al.* 2005; Knutsen *et al.* 2007; Knutsen *et al.* 2011). Alabaina, nahiz eta azken hamarkadetan hainbat arrain itsastarren populazio genetikako hainbat ikerlan argitaratu diren, oraindik ere datuak eskasak dira ustiaketa maila altua jasaten duten espezie gehienetan. Ikerlan genetikoak beharrezkoak dira espezieen kudeaketa hobetzeko stock-en egitura eta migrazio-patroiak argi eta garbi ezagutzen ez direnean. Arrantzategi hauen kudeaketa desegokiak stock txiki independenteak desagertzea edo stock handiak gutxiegi ustiatzea eragin dezake.

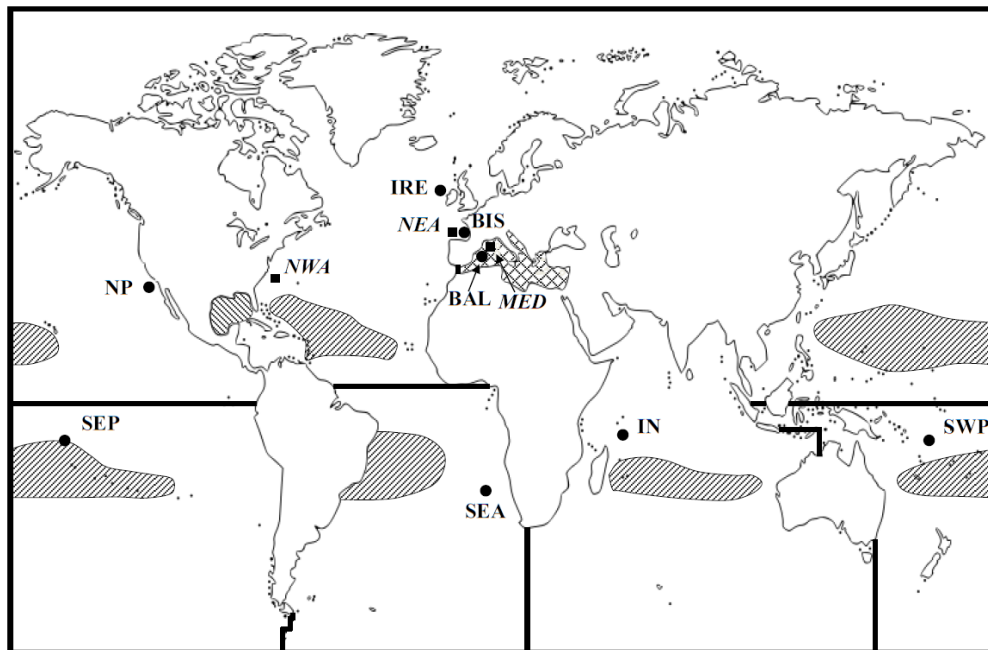
Ikerlan honek banaketa zabaleko bi atun pelagikoetan aztertzen ditu, hegaluzea (*Thunnus alalunga* Bonn., 1978) eta hegalaburra (*T. thynnus* L., 1758). Scombridae familiako atunik txikiena da hegaluzea, hegalaburra, aldiz, handienetarikoa. Hegaluzeak banaketa oso zabala du, temperatura epel eta tropikaletako ozeano guztietako ur eremu pelagikoetan bizi da, hegalaburra aldiz, Ipar Atlantikoan eta Mediterraneoan soilik bizi da (adb. Nakamura 1969; Collette & Nauen 1983; Fromentin & Fonteneau 2001). Espezie hauen harrapaketak ugariak eta balio ekonomiko handikoak dira, hegalaburrean bereziki, zeina arrain-azoka japoniarretan prezio neurrigabeetara iristen den (Magnuson *et al.* 1994). Hegalabur-akuikultura industria garrantzitsua garatu da Mediterraneoan, arrantzatutako hegalaburrak kaiola flotagarrietan gizenaz. Bestalde, atun espezie hauen bizi zikloaren ezaugarriek kolapsoekiko minbera bilakatzen dituzte arrantza gehiegizkoaren etengabeko presiopean, izan ere, populazio-hazkuntza tasa baxuak dituzte (De Roos & Persson 2002). bizi-zikloko ezaugarri kritikoen artean aurkitzen dira errunaldi luzeak, indibiduen tamaina handiak, heldutasun sexual berantiarra (lauzpabost urte hegaluzean, zortzitik gora hegalaburrean), errutegune geografikoki murrizak eta hilabete bakar edo biko errunaldi laburrak (Fromentin & Fonteneau 2001; Fromentin & Powers 2005; Rooker *et al.* 2007; Fromentin 2009; Juan-Jordá *et al.* 2011).

Hegaluzea eta hegalaburra gehiegizko arrantza jasaten ari direnez gero, kontserbazio eta kudeaketa ahaleginak hobetzeko beharizan handia dago, populazioen ebaluaketarako bestelako metodoen garapena barne (Juan-Jordá *et al.* 2011; Collette *et al.* 2011). Espezie hauen kudeaketak populazio mailakoa izan behar du, populazioen egituraren hedadura eta dinamikak arrantzatutako populazioen iraupena eta jasangarritasunaren oinarri baitira. Populazio egituraren inguruko aurreko ikerlanek lau motako markatzaile molekularrak erabili izan dituzte: alozimak, odol taldeak, RFLP mitokondrialak eta mikrosatelitak (Chow & Ushima 1995; Yeh *et al.* 2007; Takagi *et al.* 1999; Takagi *et al.* 2001; Ely *et al.* 2002; Pujolar *et al.* 2003; Arrizabalaga *et al.* 2004; Viñas *et al.* 2004; Nakadate *et al.* 2005; Arrizabalaga *et al.* 2007; Carlsson *et al.* 2007; Boustany *et al.* 2008; Riccioni *et al.* 2010; Davies *et al.* 2011; Viñas *et al.* 2011). Nahiz eta hegaluzean eta hegalaburren populazio egiturak deskribatzeko ahalegin hauek egin diren, espezie hauen populazio egiturek eztabaidagarri izaten jarraitzen dute (Arrizabalaga *et al.* 2004; Walli *et al.* 2009; Galuardi *et al.* 2010). Gaur egun

hegaluze populazioak sei kudeaketa unitateetan banatzen dira (Mediterraneoan, Ipar Atlantikoa, Hego Atlantikoa, Indikoa, Ipar Pazifikoa eta Hego Pazifikoa) eta hegalaburrekoak bi unitatetan (Atlantiko Mendebaldeko stock-a eta Atlantiko Ekialdeko eta Mediterraneoan stock-a). Hala ere, mikrosateliteetan oinarritutako ikerketek plazaratu dute kudeaketa unitate hauek agian ez datozela bat espezieen egitura genetikoekin (Riccioni *et al.* 2010; Davies *et al.* 2011; Viñas *et al.* 2011).

Bi faktorek azaltzen dute egitura genetikoaren inguruko adostasun eza. Lehenik, aurreko ikerlanetatik batek soilik (Montes *et al.* 2012) jasotzen zituen espezieen banaketa guztiko laginak. Bigarrenik, aurreko ikerlanetatik batek ere ez zuen markatzaile molekular kopuru handia erabiltzen, Nukleotido Bakarreko Polimorfismo (SNP) gisakoa, zeina azkar aztertu daitekeen lagin kopuru handian ahalmen estatistiko handia lortzeko populazio mailako hipotesiak testatze aldera (adb. Ogden 2011; Helyar *et al.* 2011).

Ikerlan honen helburuak hegaluzean eta hegalaburrean SNP markatzaileak garatzea da, eta hauekin populazioen arteko aldakortasun genetikoa aztertu espezieen banaketa geografiko guztian zehar (2.1. Taula, 2.1. Irudia). SNPak garatzeak laborategi artean lankidetzak burutzea erraztuko du aleloen estandarizazioa beharrezkoa izan gabe. Gainera, markatzaile kopuru handia garatzeak, fluxu genetiko handia izan dezaketen espezieen (atunak esaterako) populazioen arteko desberdintzapen txikiak antzemateko indarra areagotu diezaieke analisi genetikoari.



2.1. Irudia. Laginketa guneak eta gutxi gorabeherako errute-guneak *Thunnus alalunga* eta *T. thynnus*-ean. Hurrenez hurren, zirkulu beltzak eta eskuinalderako marradurak *T. alalunga*, eta karratu beltzak ezkerreko marradurak *T. thynnus*, bi espezieek Mediterraneoan erruten dute.

2. Material eta metodoak

2.1. Lagin bilketa

460 hegaluzeren muskulu, hegats edo bihotz ehunak batu ziren 8 laginketa gunetan (elikatze guneetako adierazgarri eta indibiduo heldu zein jubenilak tartean) espezieen banaketa osoan zehar (2.1. Taula, 2.1. Irudia). Beste 107 hegalabur lagin batu ziren 3 laginketa gunetan: Atlantiko mendebala, Bizkaiko Golkoa eta Mediterraneo itsasoa (2.1. Taula). Bizkaiko Golkoak indibiduo jubenilak eta helduak batzen dituen elikatze gune bat da, Atlantiko mendebala eta Mediterraneo itsasoa ,aldiz, urteko-gazteak (YOY) deritzen laginak dira. ozeanoan zeharreko migrazioak egiteko gaitasunik gabeko indibiduoak direnez, errute-guneen erreferentziak dira (Rooker *et al.* 2008). Laginak izoztu eta -20°C-tan gorde ziren, edo %96 etanolean mantendu zen 4°C-tan. DNA ehunetik erauzi zen “DNeasy 96 Blood & Tissue” kitaren (Qiagen, Hilden, Alemania) bidez eta kuantifikazioa NanoDrop 1000 espektrofotometroaren (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) bidez egin zen -20°C-tan gorde aurretik.

2.1. Taula. Laginketaren xehetasunak. Lagin kodea, lagin bakoitzeko indibiduo kopurua (*N*), laginketa gunea, egungo kudeaketa stock-a, FAO arrantza gunea nagusia eta koordenada geografikoak harrapaketa urtearekin batera.

Lagina	Kodea	<i>N</i>	Laginketa gunea	Lat.	Long.	Urtea	Stock-a	FAO
Hegaluzea								
1	BAL	50	Balear Itsasoa	40,00	1,58	2005	Mediterranea	37
2	BIS	52	Bizkaiko Golkoa	45,10	-4,35	2009	Ipar Atlantikoa	27
3	IRE	57	Irlanda	54,17	-12,89	2008	Ipar Atlantikoa	27
4	SEA	91	Hego Afrika	-24,25	4,42	2009	Hego Atlantikoa	47
5	IN	24	Seycheleak	-7,11	54,65	2008–2009	Indikoa	51
6	NP	101	Kalifornia	43,50	-127,00	2008	Ipar Pazifikoa	77
7	SWP	30	Kaledonia berria	-18,53	165,97	2003–2008	Hego Pazifikoa	71
8	SEP	55	Polinesia Frantsesa	-19,01	-152,84	2003–2008	Hego Pazifikoa	71
Hegalaburra								
9	NEA	46	Bizkaiko Golkoa	45,10	-4,35	2009	Atlantiko ekialdea	27
10	MED	46	Balear Itsasoa	40,58	1,21	2009	Atlantiko ekialdea	37
11	NWA	15	Mexikoko Golkoa	36,24	74,49	2008	Atlantiko mendebala	21

2.2. SNP aurkikuntza hegaluzean (*Thunnus alalunga*)

Nukleotido Bakarreko Polimorfismo (SNP) aurkikuntza sekuentziazio konparatiboaren bidez egin zen gene ezberdinetako 35 hegaluze erabilita. Hain zuzen, gaur egun definituta dauden sei stock-etatik bosna indibiduo aukeratu ziren, Mediterraneoan, Ozeano Indikoa eta Atlantiko eta Pazifikoko ipar eta hegoaldea, ipar Atlantikoa ezik, bertan hamar indibiduo aukeratu ziren. SNPak DNA nuklearreko 54 zatitik eskuratu ziren (S2.1. Taula) eta Primer3-rekin (Rozen & Skaletsky 2000) diseinatutako hasle bidez amplifikatu ziren. I estrategian, 19 DNA zatirentzat EPIC hasleak (Exon-Priming, Intron-Crossing primers; Slate *et al.* 2009) eskuratu ziren literaturatik (erreferentziak S2.1. Taulan). Gainontzeko 35 DNA zatietarako hasleak datu-baseetan (GenBank eta Ensembl) eskuragarri dauden sekuentzietatik abiatuta diseinatu ziren. II estrategian 17 hasle degeneratu pare diseinatu ziren hainbat teleosteen sekuentzia oinarri hartuta (420 bp-ko batez besteko luzera). III estrategian 18 hasle pare diseinatu ziren *Thunnus* DNA sekuentzietatik abiatuta (486 bp-ko batez besteko luzera).

S2.1. eta S2.2. taulek zatien amplifikazio zehaztapenak batzen dituzte. Laburrean, ohiko polimerasaren erreazio katea (PCR) erabili genuen 54 DNA zatietatik 30 amplifikatzeko, eta touchdown (TD) metodologia gainontzeko zatien amplifikaziorako. Erreakzioak termoziklatzailean (GeneAmpPCR System 2700, GeneAmpPCR System 9700 edo Veriti 96), ziklatzaile termikoan (Applied Biosystems, Foster City, CA), eta iCycler-ean (Biorad Laboratories, Hercules, CA) egin ziren. PCR produktu purifikatuak norantza bakarrean sekuentziatu ziren bai aurrerako zein alderantzizko PCR haslearekin Applied Biosystems (ABI) 3130X elektroforesi kapilarraren analizatzailean, ABI BigDye Terminator version 3.1 Chemistry (Applied Biosystems) bidez. Kromatogrametatik abiatutako base-ertzak SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) bidez burutu zen. BLASTN algoritmoa helburu genuen *locus*-a amplifikatu zela baieztatzeko erabili zen.

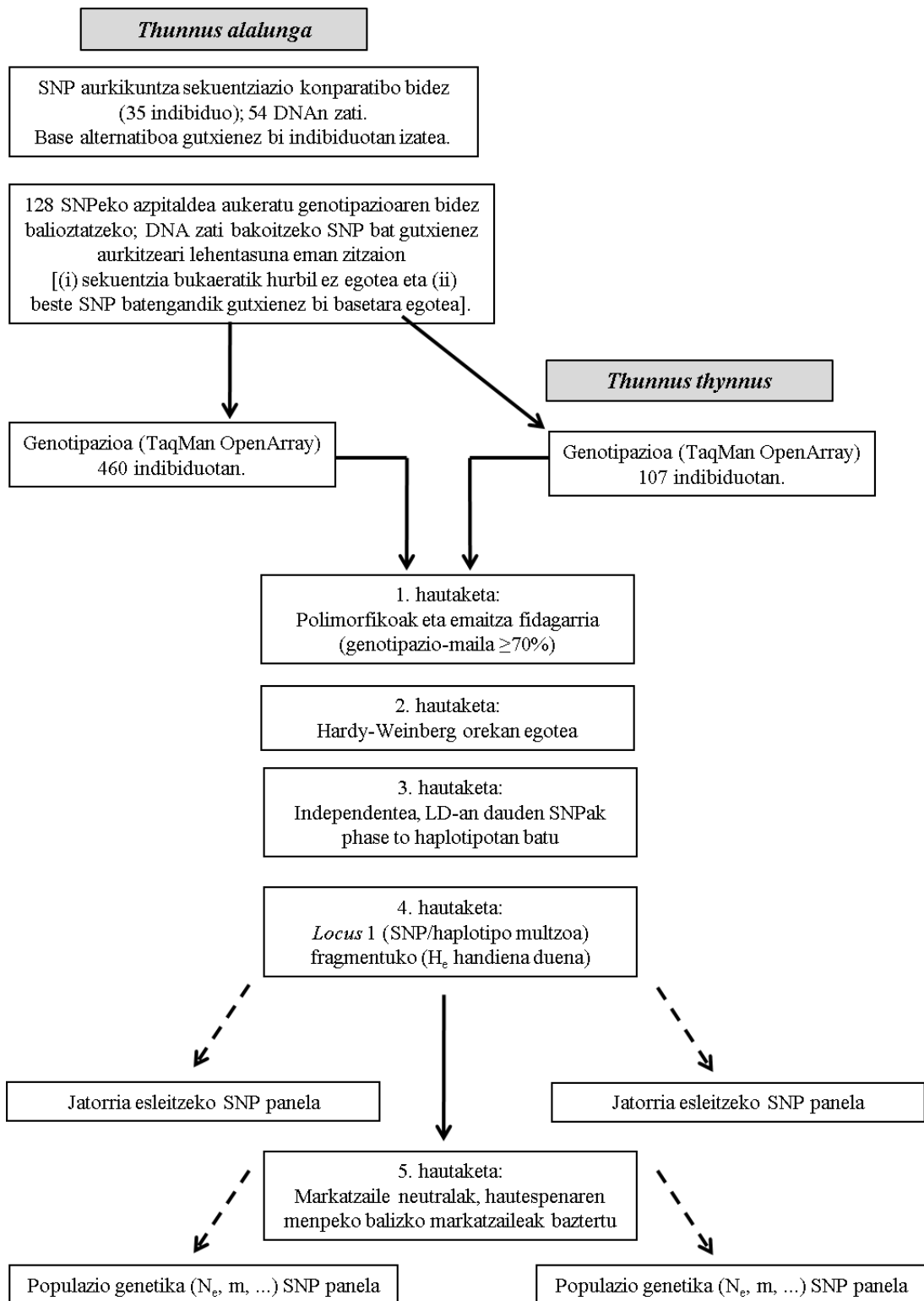
Elkarren aldean jarritako sekuentzien arteko nukleotido desberdintasunak SNPtzat jo ziren, baina soilik alboko sekuentziak kalitate altukoak zirenean eta nukleotido alternatiboa 35etik gutxienez bi indibiduotan presente zegoenean. Hurrengo analisietarako betekizun teknikoak betetzen zituzten SNPak aukeratu ostean lehentasuna eman zitzaion DNA zati bakoitzetik gutxienez SNP bat aukeratzeari. Guztira 128 SNP hautatu ziren TaqMan OpenArray (Applied Biosystems) teknologiaren bidez 460 hegaluze genotipatzeko. Bestalde, SNP bat aukeratua izateko ezin zen sekuentziaren bukaeran egon ezta beste SNP bat bi base edo gutxiagoko distantzian eduki (*Custom TaqMan Genomic Assays* Erabiltzailearen Jarraibidea).

2.3. Espezie arteko amplifikazio gurutzatua hegalaburrean (*Thunnus thynnus*)

Hegaluzeak genotipatzeko aukeratutako 128SNPetatik abiatuta, hegalaburrean espezie arteko amplifikazio gurutzatuaren bidez burutu zen SNP aurkikuntza. 128 SNPak TaqMan OpenArray teknologiaren bidez genotipatu ziren 107 hegalaburretan. Hegaluzean erabilitako irizpide berberak erabili ziren SNPak hegalaburrean balidatzeko.

2.4. Populazio analisia

2.2. Irudiak laburbiltzen ditu ikerlan honetan erabilitako prozedurak, hegaluzean SNP aurkikuntzatik hasi, eta jatorriaren esleipenerako analisiak (hautespenaren menpeko markatzaileak barne) edo analisi demografikoak egiteko SNP azpitaldeen aukeraketa (panela) egin arte. SNP bakoitzarentzat genotipazio-maila eta alelo txikienaren frekuentzia (MAF) kalkulatu dira AutoCaller 1.1 (Applied Biosystems) softwarearen bidez. SNPa balioztatzutzat jo zen polimorfismoa genotipazioaren emaitzetan mantentzen bazen. Genotipo argirik gabeko eta %70 baino genotipazio-maila baxuagokoSNPak baztertu egin ziren. Hardy Weinberg orekarekiko (HWE) desbideratzea *locus* bakoitzerako eta laginketa gune bakoitzerako ebaluatu zen (Fisher-en test zehatza GENEPOP 4.0-en; Rousset 2008). Lotura desorekaren (LD) test zehatza, GENEPOPen egina, DNA zati berean edo DNA zati ezberdinetan kokatutako SNPen arteko desoreka antzemateko erabili zen; $P < 0,001$ ezarri zen LD testean probabilitate kritiko legez. LD esangarria zuten SNPak haplotipo-taldetan batu ziren PHASE 2.1-ko metodo estatistiko Bayesiarra erabilia, lagin bakoitzean modu independentean (Stephens *et al.* 2001).



2.2. Irudia: SNP aukeraketa diseinua. *T. alalunga* eta *T. thynnus* espezieetan esleipen indibidualerako eta populazio genetikarako erabilitako SNP panelen hautaketa pausuen diseinua (ikus Material eta metodoak atalak informazio gehiago lortzeko)

Esperotako heterozigositatea (H_e), F_{IS} eta F_{ST} -a FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) bidez estimatu ziren. HWE-tik desbideraketa esangarria ($P < 0,001$) lagin gune bat edo gehiagotan ageri zuten SNPak populazio egitura estimatzeko desegokitzat jo eta baztertu egin ziren. Bi SNP edo gehiago DNA zati berean aurkitzen zirenean, izan haplotipo-taldeak edo SNPak, H_e garaiena zuen *locus*-a hautatu zen markatzaileen arteko independentzia ziurtatzeko. Heterozigositate handia duen markatzaileak, populazio egitura analisietan ahalmen estatistiko handiagoa izango du heterozigositate txikia ageri duenak baino (Haasl & Payseur 2011; Morin *et al.* 2004; Rosenberg *et al.* 2003; Ryman *et al.* 2006). SNP panelak heterozigositate handiko SNPetaz osatuta daude.

Hautespenaren menpe egon zitezkeen markatzaileak (ezohiko balioa) bilatu genituen gainerako markatzaileen artean probabilitate Bayesiarra erabiltzen duten BAYESCAN 2.0 (Foll & Gaggiotti 2008) eta LOSITAN (Beaumont & Nichols 1996; Antao *et al.* 2008) erabilita. BAYESCAN eta LOSITAN softwareak identifikatutako markatzaileak SNP paneletik ezabatu ziren (Richter-Boix 2011). Laburki, bi modelo alternatibo (hautespenaren efektua kontuan hartzea edo ez hartzea) eta hauen ondorengo probabilitateak (PO) definitzen dira BAYESCAN programan, bi modeloen ondorengo probabilitatearen proportzioa 5000 errepikapeneko 20 froga-saio eta 50 000 errepikapeneko “burn-in” final gehigarriekin kalkulatu ziren, guztira 100 000 errepikapen (5000ko lagin tamaina eta 10eko beheratze tartea). $\log_{10}PO$ balio positibodun markatzaileak kontuan hartu ziren arren, sostengu gogorra izateko, $\log_{10}PO > 1$ ($P < 0,09$; BAYESCAN 2.0 erabiltzailearen gida) zuten markatzaileetara mugatu zen hautaketa. Bestalde, LOSITANek heterozigositatea F_{ST} -aren aurka aurkezten duen grafiko batean ezohiko baliodun markatzaileak identifikatzen ditu. 0,99ko konfiantza-tartetik kanpoko markatzaileak baztertu egin ziren, honela ustezko markatzaile neutralekin batez besteko F_{ST} neutrala kalkulatzeko. Orduan, bigarren saio bat burutu zen markatzaile guztiekin azkeneko batez bestekoa erabiliz.

Hainbat desberdintzapen maila antzemateko SNPeekin behar den ahalmen estatistikoa estimatzeko POWSIM 4.0 (Ryman *et al.* 2006) programa erabili zen, 1000 urratseko “burn-in”-arekin eta jarraian 1000 urratseko 100 sortarekin. X^2 eta Fisher-en probabilitateak erabili ziren F_{ST} baten balioaren esangarritasuna testatzeko erreplika bakoitzean. 1000 erreplikako simulazioen F_{ST} balio esangarrien kopuruak, ahalmen estatistikoaren estimazioa emango du dibergentzia maila jakin baterako, zeinak belaunaldi kopuru zehatz batean zehar frekuentzien jitoa onesten duen. Simulatutako populazioen tamainak (N_e) 2000 arrainekoa ziren. Hegaluzean, 41 markatzaileak (SNPak + 9 haplotipo-taldeak), 9 haplotipo-taldeak eta 32 SNPak aztertu ziren zein bere aldetik haien ahalmen estatistikoa estimatzeko $F_{ST}= 0,005-0,016$ arteko dibergentziekiko.

Populazio egitura, lagin arteko F_{ST} eta STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) softwareko indibiduen taldekapen Bayesiarren bidez estimatu zen. Binakako F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) balioak FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) bidez estimatu ziren. FSTAT-ek locus-en p -balioa hartzen du kontutan eta markatzaile bakoitzaren polimorfismo mailaren arabera pisu gehiago edo gutxiago ematen dio (Petit *et al.* 2001). Populazio taldeak taldeen arteko batez besteko F_{ST} balio ez

esangarrien eta beste populazioekiko F_{ST} balio esangarrien arabera definitu dira (adb. Waples & Gaggiotti 2006). STRUCTURE-k metodo Bayesiarra erabiltzen du erlazionatutako indibiduen talde kopurua (K) identifikatzeko genotipo locus-anitzen artean HWE eta desoreka gametikoa erabiliz. Gurutzaketa modeloa erabili genuen, populazio arteko alelo frekuentzia independenteak eta LOCPRIOR aukera. 1 eta 10 arteko K balioetarako 10 STRUCTURE saiotan log-probabilitate ratioak konparatu dira (Pritchard *et al.* 2000). Saio bakoitza 10 000 “burn-in”-eko 10 000 errepikapenez osatzen da. CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) indibiduen taldekapen hoberena zehazteko erabili zen erreplika desberdinetako genotipo pareen arteko antzekotasuna maximizatuz. Taldekapen hauek DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004) bidez irudikatu ziren. F_{ST} -ak estimatzeko erabili ez ziren ezohiko baliodun markatzaileak STRUCTURE analisisetan gehitu ziren, F_{ST} analisisiek ez bezala, ez dituzte markatzaile neutralak soilik behar.

3. Emaitzak

3.1. SNP aurkikuntza eta hegaluzean balioztatzea

54 DNAn zati sekuentziatu ziren 35 hegaluzetan (S2.1. Taula). 54 DNA zatietatik 35k homologia maila altua agertu zuten arrain ugariaren sekuentziekin (BLASTN; E-value < 10^{-5}), 14 balio altuenak beste *Thunnus* espezieen sekuentzienak ziren (S1.3 Taula). 616 SNP aurkitu ziren guztira, batez beste 11,4 (DE \pm 10) SNP DNA zati bakoitzeko eta 1/36 bp-ko distantzian. DNA zati bakoitzeko SNP bat gutxienez topatu zen, metalotienina (MT) kodetzen zuen zati baterako ezik. EPIC hasleen bidez anplifikatutako zatietan (I estrategia) 195 SNP topatu ziren; 182 SNP degeneratutako teleosteen hasleen bidez anplifikatutako hasleen bidez (II estrategia); eta 239 SNP *Thunnus* espezetan oinarritutako hasleen bidez anplifikatutako DNA zatietan (III estrategia). SNPez gain 1-5 nukleotido luzerako 19 txertaketa-ezabaketa topatu ziren 14 DNA zatitan, hauetatik gehienak (%84,2) mono edo binukelarrak ziren.

Guztira, 128 SNP hautagai aukeratu ziren hegaluze laginak genotipatzeko, hauetatik 32, 47 eta 49 SNP ziren I, II eta III estrategietatik, hurrenez hurren, eratorritakoak. 23 SNPek (%18) huts egin zuten anplifikazio urratsean eta 2 SNPek ez zuten gaintitu %70eko gutxieneko genotipazio-maila. Gainontzeko balioztatutako 79 SNPen (S2.4.) batez besteko genotipazio-maila 91 ± 5 izan zen eta batez besteko MAF-a $0,17 \pm 0,14$ (0,001-0,489 tartean). Balioztatze-arrakasta %72, %66 eta %51ekoa izan zen I, II eta III estrategietan hurrenez hurren.

3.2. Hegaluzearen populazioen azterketa genetikorako SNP panela

Balioztatutako 79 SNPetatik 12k HWEtik desbideratze esangarria ageri zuten laginketa gune batean edo gehiagotan eta baztertu egin ziren. Gainontzeko 67 SNPen artean LDA testatu zen. DNA zatien artean ez zen LDan zegoen SNPik, bai ordea 21 DNA zati berberetan, hauek batu egin ziren 9

haplotipo-talde sortuz (S2.5. taula). DNA zati bakoitzeko locus bakarra hautatu ondoren (ikus Metodoak), markatzaile panel finala 41 markatzailez osatua geratu zen: 32 SNP indibidual, gehi 9 haplotipo-talde (53 SNP guztira; 2.1. Taula). SNP hauek BAYESCAN bidez aztertzean markatzaile bat ere ez zen ageri hautespenaren menpe. Hala ere, LOSITANek 3 SNP, *HIF1A4*, *MTF1* eta *MYC*, antzeman zituen neutraltasunean espero zitekeen baino desberdintzapen maila altuagoa zutenak. Markatzaile hauek hautespen dibergentearen menpeko gene hautagaietan edota hautespenak eragindako geneei lotutako DNA zatietan zeudela asumitu zen. Aitzitik, *PRDX2*aren desberdintzapen maila baxuak aditzera ematen du hautespen orekatuak markatzaile honi edo ondoko gene bati eragin diezaiokeela. Interesgarriki, *MTF1* eta *PRDX2* sekuentziak homologia altuena *Fugu rubripes* eta *Thunnus maccoyii* teleosteo ortologoekin erakutsi zuten hurrenez hurren (S2.3. Taula), baina ez zen homologiarik topatu *HIF1A4* eta *MYC* sekuentzien eta aztertutako teleosteo sekuentzien artean. Oro har, markatzaile bakoitzerako esperotako batez besteko heterozigositatea $H_e = 0,278 \pm 0,201$ eta batez besteko odolkidetasun koefizientea $F_{IS} = 0,032 \pm 0,085$ izan ziren panel finaleko 41 SNPentzat (2.2. Taula).

2.2. Taula. Hegaluzean populazioen genetika aztertzeako hautatutako SNP sorta. SNP kodea (letra lodian), aurkitu zeneko DNA nuklear zatia eta aurkikuntza estrategia (I, II eta III; ikus Metodoak) erakusten dira, 53 SNPeko panelerako, 41 markatzailez osatua: 32 SNP indibidual and 9 haplotipo multzo (ilunduak), alelo edo haplotipo kopurua, eta heterozigositate (H_e) eta odolkidetasun koefizientearen (F_{IS}) batez besteko balioak.

DNA zatia	Estrategia	SNP	Alelo/ haplotipo kopurua	Batez besteko H_e (\pm DE)	Batez besteko F_{IS} (\pm DE)
<i>ADRB2</i>	I	<i>ADRB2-97</i>	2	0,025 \pm 0,016	-0,006 \pm 0,006
<i>ALDOB1</i>	I	<i>ALDOB1-47</i> <i>ALDOB1-95</i>	4	0,373 \pm 0,058	0,150 \pm 0,104
<i>CALM4</i>	I	<i>CALM4-124</i>	2	0,432 \pm 0,040	0,247 \pm 0,165
<i>GNRH3-1</i>	I	<i>GNRH3-1-124</i>	2	0,365 \pm 0,040	0,030 \pm 0,047
<i>GNRH3-3</i>	I	<i>GNRH3-3-219</i>	2	0,077 \pm 0,035	-0,033 \pm 0,018
<i>LDHB</i>	I	<i>LDHB-287</i>	2	0,362 \pm 0,061	0,176 \pm 0,205
<i>LYZ</i>	I	<i>LYZ-128</i> <i>LYZ-138</i> <i>LYZ-340</i>	8	0,579 \pm 0,079	-0,005 \pm 0,155
<i>MLL25a</i>	I	<i>MLL25a-144</i> <i>MLL25a-183</i>	4	0,526 \pm 0,057	0,092 \pm 0,076
<i>MYC</i>	I	<i>MYC-91</i>	2	0,043 \pm 0,082	-0,024 \pm 0,050
<i>MYL3</i>	I	<i>MYL3-97</i>	2	0,024 \pm 0,025	-0,009 \pm 0,009
<i>RHO</i>	I	<i>RHO-111</i>	2	0,033 \pm 0,039	-0,014 \pm 0,017
<i>RPS7-2</i>	I	<i>RPS7-2-69</i>	2	0,270 \pm 0,081	0,180 \pm 0,138
<i>APOE</i>	II	<i>APOE-148</i>	2	0,269 \pm 0,039	0,014 \pm 0,116

<i>CYCS</i>	II	<i>CYCS-132</i> <i>CYCS-218</i>	4	0,468±0,062	-0,050±0,096
<i>DADI</i>	II	<i>DADI-444</i>	2	0,088±0,021	-0,039±0,011
<i>FGB</i>	II	<i>FGB-257</i>	2	0,053±0,036	-0,024±0,020
<i>FOS</i>	II	<i>FOS-107</i>	2	0,154±0,084	-0,089±0,060
<i>HGF</i>	II	<i>HGF-375</i>	2	0,039±0,022	-0,015±0,011
<i>HMOX1</i>	II	<i>HMOX1-416</i>	2	0,316±0,102	0,181±0,214
<i>MMP9</i>	II	<i>MMP9-68</i> <i>MMP9-111</i>	4	0,220±0,107	0,051±0,074
<i>MTF1</i>	II	<i>MTF1-263</i>	2	0,316±0,110	0,077±0,104
<i>PSM</i>	II	<i>PSM-33</i> <i>PSM-117</i> <i>PSM-138</i>	8	0,737±0,037	-0,045±0,102
<i>PTGS2</i>	II	<i>PTGS2-56</i> <i>PTGS2-317</i>	4	0,708±0,022	-0,017±0,154
<i>RASA3</i>	II	<i>RASA3-188</i>	2	0,063±0,048	-0,028±0,022
<i>RHOC</i>	II	<i>RHOC-55</i>	2	0,054±0,056	-0,021±0,027
<i>RPL12</i>	II	<i>RPL12-213</i> <i>RPL12-423</i>	4	0,444±0,169	0,042±0,042
<i>c-mos</i>	III	<i>c-mos-242</i>	2	0,313±0,059	-0,055±0,139
<i>CS1</i>	III	<i>CS1-197</i> <i>CS1-442</i> <i>CS1-512</i>	6	0,533±0,042	-0,030±0,124
<i>CS3</i>	III	<i>CS3-394</i>	2	0,449±0,039	0,006±0,220
<i>CS5</i>	III	<i>CS5-44</i>	2	0,494±0,013	0,209±0,161
<i>ELOVL2</i>	III	<i>ELOVL2-519</i>	2	0,253±0,052	0,095±0,239
<i>ELOVL3</i>	III	<i>ELOVL3-365</i>	2	0,129±0,081	-0,071±0,057
<i>FGG</i>	III	<i>FGG-242</i>	2	0,371±0,102	-0,009±0,148
<i>GPX-458</i>	III	<i>GPX-458</i>	2	0,495±0,009	0,107±0,115
<i>HIF1A2-3</i>	III	<i>HIF1A2-3-350</i>	2	0,449±0,027	0,073±0,083
<i>HIF1A4</i>	III	<i>HIF1A4-219</i>	2	0,145±0,122	-0,022±0,043
<i>MB</i>	III	<i>MB-188</i>	2	0,174±0,068	0,095±0,225
<i>OPC02</i>	III	<i>OPC02-249</i>	2	0,167±0,046	-0,032±0,111
<i>PRDX2</i>	III	<i>PRDX2-452</i>	2	0,013±0,023	-0,004±0,009
<i>RAG2</i>	III	<i>RAG2-114</i>	2	0,312±0,088	0,147±0,195
<i>Tmo-4C4</i>	III	<i>Tmo-4C4-188</i>	2	0,063±0,046	-0,026±0,027

3.3. Hegaluzearen egitura genetikoa

POWSIM simulazioek adierazten dutenez, 41 markatzaile independenteak (32 SNP eta 9 haplotipo multzo) batera gai ziren lagin arteko desberdintasun esangarriak aurkitzeko $F_{ST} = 0,002$ baliorako frogen %84an eta $F_{ST} \geq 0,004$ baliorako frogen %100ean (2.3. Taula). 9 haplotipo-talde

multialelikoek bakarrik, 32 SNP indibidualen adinako ahalmen estatistikoa dute populazio arteko desberdintasunak antzemateko. Markatzaile sorta bakoitza $F_{ST} \geq 0,004$ balioak antzemateko gai zen frogen %97an gutxienez. Populazioen arteko desberdintasun esangarriak antzemateko Fisher-en metodoak X^2 frogak baino ahalmen estatistiko gutxiago erakutsi zuen.

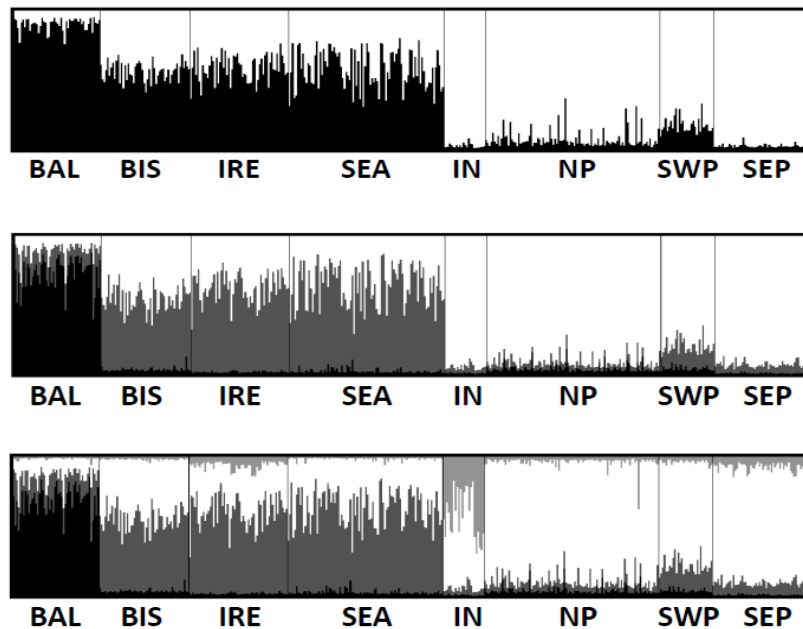
2.3. Taula Hegaluze populazioen artean desberdintasun maila jakin bat (F_{ST}) antzemateko probabilitatea. POWSIM (1000 erreplika) bidez egindako ahalmen analisiak, batez besteko maiztasunak eta hegaluzearen lagin tamaina erabilita.

F_{ST}	41 SNP eta Haplotipo-taldeak		9 Haplotipo-taldeak		32 SNPak	
	$P X^2$	$P Fisher$	$P X^2$	$P Fisher$	$P X^2$	$P Fisher$
0,0005	0,197	0,186	0,125	0,127	0,156	0,150
0,001	0,439	0,404	0,276	0,278	0,286	0,289
0,002	0,886	0,844	0,662	0,638	0,628	0,625
0,004	1,000	0,999	0,981	0,970	0,980	0,976
0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,016	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

32 SNPak eta 9 haplotipo-taldeak batera erabilitako analisiak hegaluzeen zortzi laginen artean $F_{ST} = 0,017 \pm 0,003$ ($P < 0,05$) balio orokorreko emaitza eman zuten. Ozeano barneko laginketa guneen arteko dibergentzia mailak ez ziren esangarriak, bai ordea ozeanoen artekoak (2.4. Taula). IE Atlantikoko laginak (IRE eta BIS) ez ziren haien artean desberdinak, ezta HE Atlantikoko laginarekiko (SEA) ere. Modu berean, ez zen dibergentziarik antzeman Pazifikoko hiru laginen artean (NP, SEP, SWP). Hala ere, ozeano arteko konparazio guztiak esangarriak suertatu ziren, lau entitate genetiko definituz: 1) ozeano Atlantikoa, 2) Mediterraneo itsasoa, 3) ozeano Pazifikoa eta 4) ozeano Indikoa. Mediterraneo mendebaldeko arrainek (BAL) gainontzeko laginketa guneekiko dibergentziarik handiena erakutsi zuten batez besteko $F_{ST} = 0,034$ (0,021–0,050 tartean) balioarekin. Ozeano Indikoko hegaluzeak Atlantikoko eta Mediterraneo laginekiko dibergenteenak ziren (bataz besteko $F_{ST} = 0,030$) baina ozeano Pazifikoko dibergentzia maila baxuagoa zen ($F_{ST} = 0,010$). Indibiduen taldekapen Bayesiarrak (STRUCTURE) populazio egitura probableena $K = 3$ zela adierazi zuen, laginak hiru taldetan banatuz: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa eta Indo-Pazifikoa (2.3. Irudia). $K = 4$ ko analisiak ozeano Indikoko hegaluzeak Pazifikoko hegaluzeekiko desberdinak zirela maila baxuan, laginketa gune hauen arteko F_{ST} banaketak erakusten duen moduan.

2.4. Taula. Binakako F_{ST} balioak hegaluze (*Thunnus alalunga*) laginen artean. F_{ST} balioak diagonaletik behera eta akats estandarrak diagonaletik gora. Laginketa guneak 2.1 Taulan bezala, F_{ST} balioak positiboki esangarriak lodiz markatuak (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$)

	BAL	BIS	IRE	SEA	IN	NP	SEP	SWP
BAL		0,008	0,008	0,008	0,013	0,010	0,011	0,008
BIS	0,026***		0,002	0,005	0,008	0,006	0,007	0,008
IRE	0,030***	0,000		0,002	0,007	0,004	0,005	0,008
SEA	0,033***	0,004	-0,001		0,008	0,005	0,004	0,007
IN	0,050***	0,020***	0,017***	0,020***		0,004	0,005	0,006
NP	0,033***	0,014***	0,019***	0,016***	0,008*		0,002	0,002
SEP	0,043***	0,017***	0,016***	0,012***	0,007*	-0,000		0,003
SWP	0,021***	0,014**	0,011**	0,012**	0,011*	0,001	0,001	



2.3. Irudia. *Thunnus alalunga* STRUCTURE emaitzak. STRUCTURE bidez egindako indibiduen taldekapan analisiak (hurrenez hurren, $K = 2$, $K = 3$ eta $K = 4$) 460 hegaluze indibiduoetan 41 DNA zati independentetan aurkitzen diren 53 SNPetan oinarrituta. Zutabe bertikal bakoitzak indibiduo bat irudikatzen du eta laginketa guneak zutabe beltzez banatuak ageri dira. Zutabe bakoitzeko kolore proportzioak talde bakoitzeko ahaide izateko estimazioa irudikatzen du (talde ahaide koefizientea).

3.4. Hegalaburraren SNP panela

Hegaluzearen 128 SNPentzako hasleak erabilia espezie arteko erreakzio gurutzatuaren bidez garatu ziren SNPak hegalaburrean. 32 SNP arrakastaz amplifikatu baziren ere 9k 70tik beherako genotipazio %-ak, genotipo lausoak, edo polimorfismo eza erakutsi zituzten, eta , beraz, baztertu

egin ziren. Honela, 23 SNP balioztatu ziren (%18) hegalaburrean. 23 SNP hauetatik 18 hegaluzean ere balioztatuak izan ziren, gainontzeko bostak ordea (*GNRH3-1-107*, *LDHB-129*, *CYCS-161*, *CS3-118*, eta *OPC02-45*; S2.6 Taula) genotipazio maila gaintu eta polimorfikoak agertu ziren hegalaburrean bakarrik. Hegaluzean aurkitu ziren SNPen balioztatze arrakasta mailak hegalaburrean %28a (32tik 9) I estrategian, %15a (47tik 7) II estrategian eta %14 (49tik 7) III estrategian izan ziren. Bestalde, SNP bat panel finaletik baztertu zen HWetik kanpo egoteagatik laginketa gune batean gutxienez (S2.6. Taula). Gainontzeko 22 SNPen arteko LD frogak DNA zati berean lotuta ageri ziren bi SNP topatu zituen (S2.5. Taula). Lotutako SNPak 2 hapotipo sortuz batu ziren. 15 markatzaile independenteko sorta finala, 13 SNP indibidual eta 2 haplotipo multzo, hegalaburren populazioen genetikarako aproposa suertatu zen (17 SNP guztira; 2.5. Taula).

2.5. Taula. Hegalaburrean populazioen genetika aztertzeako aukeratutako SNP sorta. SNP kodea (lodian), aurkitu zeneko DNA nuklear zatia (hegaluzean) eta aurkikuntza estrategia (I, II eta III; ikus Metodoak) 17 SNPentzat; 15 markatzaile independente: 13 SNP indibidual eta 2 haplotipo-talde (ilundua), alelo eta haplotipo kopurua eta, laginketa guneak bat eginda, heterozigositate (H_e) eta odolkidetasun koefizientearen (F_{IS}) batez besteko balioak.

DNA zatia	Estrategia	SNP	Alelo/ haplotipo kopurua	Batez besteko H_e (\pm DE)	Batez besteko F_{IS} (\pm DE)
<i>ADRB2</i>	I	<i>ADRB2-97</i>	2	0,046 \pm 0,040	-0,016 \pm 0,014
<i>GNRH3-1</i>	I	<i>GNRH3-1-107</i> <i>GNRH3-1-124</i>	4	0,676 \pm 0,023	-0,056 \pm 0,178
<i>LDHB</i>	I	<i>LDHB-129</i>	2	0,468 \pm 0,068	0,057 \pm 0,268
<i>LYZ</i>	I	<i>LYZ-128</i>	2	0,062 \pm 0,054	0,439 \pm 0,380
<i>RPS7-2-313</i>	I	<i>RPS7-2-313</i>	2	0,084 \pm 0,079	0,083 \pm 0,176
<i>TPMA</i>	I	<i>TPMA-53</i>	2	0,355 \pm 0,100	0,000 \pm 0,351
<i>CYCS</i>	II	<i>CYCS-161</i>	2	0,175 \pm 0,195	0,216 \pm 0,240
<i>HGF</i>	II	<i>HGF-375</i>	2	0,211 \pm 0,090	0,106 \pm 0,140
<i>MTF1-263</i>	II	<i>MTF1-263</i>	2	0,273 \pm 0,055	0,010 \pm 0,162
<i>RPL12</i>	II	<i>RPL12-423</i>	2	0,486 \pm 0,012	0,006 \pm 0,157
<i>CS3</i>	III	<i>CS3-118</i>	2	0,291 \pm 0,253	0,023 \pm 0,070
<i>CS5</i>	III	<i>CS5-395</i> <i>CS5-425</i>	4	0,243 \pm 0,211	0,137 \pm 0,183
<i>FGG</i>	III	<i>FGG-242</i>	2	0,401 \pm 0,108	0,215 \pm 0,198
<i>HIF1A2-3</i>	III	<i>HIF1A2-3-417</i>	2	0,145 \pm 0,041	0,216 \pm 0,500
<i>OPC02</i>	III	<i>OPC02-45</i>	2	0,167 \pm 0,289	0,000 \pm 0,000

15 markatzaileen esperotako heterozigositatearen batez bestekoa $H_e = 0,272 \pm 0,178$ izan zen, eta odolkidetasun koefizientearen batez bestekoa $F_{IS} = 0,096 \pm 0,133$. Hegalaburrean frogatutako SNP kopuru txikia izateak ezohiko balioak antzemateko softwareak erabiltzea eragotzi zuen, izan ere, SNP kopuru handiagoa behar da esperotako neutraltasunaren estimazio fidagarria lortzeko. Hortaz, 15 markatzaileak erabili ziren populazioen egitura aztertzeako F_{ST} balioen eta STRUCTURE-n bidez.

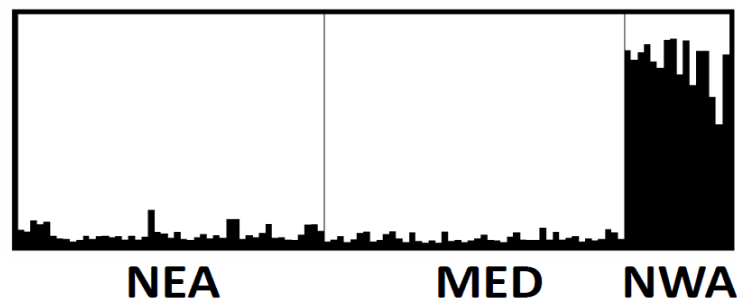
3.5. Hegaluzearen egitura genetikoa

POWSIN simulazioek eta 15 markatzaileen batez besteko frekuentziek erakusten dute ahalmen estatistikoak 0,064 gora egiten duela $F_{ST} = 0,001$ baliorako (Fisher-en metodoa esangarratasuna

neurtzeko), $0,579 F_{ST} = 0,010$ baliorako eta $1,0 F_{ST} = 0,080$ baliorako (2.6. Taula). Hegalaburreko 15 markatzaileek esangarritasuna erakusten dute populazio guztien artean IM Atlantikoan, IE Atlantikoan eta Mediterraneoan ($F_{ST} = 0,029 \pm 0,024$, $P < 0,05$). IE Atlantikoko eta Mediterraneoako populazioak IM Atlantikoko populazioarekiko desberdinak dira (NEA-NWA, $F_{ST} = 0,120 \pm 0,091$, $P < 0,01$; MED-NWA $0,116 \pm 0,078$, $P < 0,01$). Hala ere, IE Atlantikoko eta Mediterraneoako laginak ez dira bata bestearekiko modu esanguratsuan desberdintzen ($F_{ST} = 0,004 \pm 0,007$). STRUCTURE-k erakutsi zuen hiru laginek bi populazio irudikatzen dituztela ($K = 2$), 1) IM Atlantikoa eta 2) Bizkaiko Golkoa eta Balear Itsasoa (2.4. Irudia).

2.6. Taula. Hegalaburrean desberdintzapen maila jakin bat (F_{ST}) antzemateko probabilitatea. Ahalmen analisia POWSIM (1000 erreplika) bidez, hegalaburraren batez besteko frekuentziak eta lagin tamainak erabilia.

F_{ST}	13 SNP eta 2 haplo-talde	
	$P X^2$	P Fisher
0,001	0,091	0,064
0,0025	0,159	0,104
0,005	0,314	0,240
0,010	0,654	0,579
0,020	0,961	0,931
0,040	1,000	0,998
0,080	1,000	1,000



2.4. Irudia. *Thunnus thynnus* STRUCTURE emaitzak. 107 hegalaburren indibiduen taldekopen analisia STRUCTURE bidez ($K = 2$) 15 markatzaile independentetan oinarrituta. Zutabe bertikal bakoitzak indibiduo bat irudikatzen du eta laginketa guneak zutabe beltzez banatuak ageri dira. Zutabe bakoitzeko kolore proportzioak talde bakoitzeko ahaide izateko estimazioa irudikatzen du (talde ahaide koefizientea).

4. Eztabaida

Hegaluze eta hegalaburraren genomak SNPen garapena eta balioztatzea deskribatzen ditu ikerlan honek, espezieen harrapaketa komertzialen kudeaketarako stock diskretuak definitzeko oinarriak ere deskribatzen dira. 53 SNP garatu ziren *de novo* hegaluzean eta 17 hegalaburrean. Ikerlanaren helburua SNP markatzaileen garapena izan arren, laginen banaketak eskala handiko populazio egituraren azterketa baimendu zuen. Hainbat aldagaik baldintzatzen dute markatzaile molekular sorta batek populazio arteko desberdintzapen genetikoak antzemateko duen gaitasuna. Lagin tamainak ahalmen estatistikoan duen efektuaz gain, laginen hedadura geografikoa funtsezkoa da populazioen egitura deskribatzeko.

4.1. SNP aurkikuntza hegaluzean

Nukleotido aldakorren bilaketak 128 SNPeko emaitza eman zuen. Hauetatik, 79 (%62a) balioztatuak izan ziren eta errutinazko genotipaziorako aukeratuak. Hauetatik 41 markatzailetan banatutako 53 SNPeko panel finala aukeratu zen. %62ko balioztapen arrakasta arrainetan burututako beste ikerlanen SNP balioztapen arrakasta tasen antzekoa da, hala nola *Gadus morhua* (%54a) (Moen *et al.* 2008), *Oncorhynchus nerka* (%39a), *O. keta* (%54a) eta *O. tshawytscha* (%64a) (Smith *et al.* 2005) eta *Engraulis encrasicolus* (%59a) (*Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al.* 2012).

Gure emaitzek hegaluzearen genomak polimorfismo mailen ebaluazioa baimentzen dute. Guztira 616 SNP aurkitu ziren, 1/36 base pareko SNP proportzio orokorrean. Balio honek hegaluzean polimorfismo maila garaiak deskribatzen ditu *salmonidae* familiako beste espezie batzuekin alderatuz gero, *Oncorhynchus keta* (1/175 bp), *O. nerka* (1/242 bp) eta *O. tshawytscha* (1/301 bp) (Smith *et al.* 2005), *Salmo salar* (1/586 bp overall, Hayes *et al.* 2004) edo eskualde introniko (1/405 bp) eta exonikoetan (1/1448 bp) (Ryynänen & Primmer 2006). Hegaluzean topatutako balio garaia antxoia europarraren (*Engraulis encrasicolus*) parekoa da (1/54 bp, Zarraonaindia 2011).

4.2. SNP garapena hegalaburrean

Hegaluzean aurkitutako 128 SNPak erabili genituen hegalaburrean SNPak bilatzeko eta %18ko balioztatze arrakasta tasa (23 SNP) lortu zen. Arrakasta tasa honek adierazten duenez, SNP hauen alboko eskualdeak hain kontserbatuak daude ezen SNPen hasleak hegaluzean eta hegalaburrean ere funtzionatzen duten. Arrakastatsu suertatzen direnean, espezie arteko anplifikazio gurutzatuak metodo errentagarriak dira SNP aurkikuntzan (Malhi *et al.* 2011). Espezie arteko anplifikazio gurutzatu arrakastatsuak desbideratzen salbu daudela uste da, bereziki eskualde kodetzaileetatik hurbil edo haien artean dauden sekuentzia kontserbatuetan dauden SNPak badira (Malhi *et al.*

2011). Espezie arteko anplifikazio gurutzatua ez da, orokorrean, SNP markatzaileak garatzeko erabili arrain espezieetan, beste ornodunetan arrakasta maila baxuak lortu direlako batez ere (adb. Seeb *et al.* 2011; Miller *et al.* 2011). Adibidez, etxeko ardian garatutako 50 000 SNPetik soilik %1a izan zen polimorfikoa ahaidetutako bi espezie unglatuetan (Miller *et al.* 2011). Behian garatutako SNP kopuru berdintsuko paneletik, soilik SNPen %2,5a eta %3a anplifikatu zen modu arrakastatsuan bisonte Europarrean eta bi antilope espezieetan hurrenez hurren (Kaminski *et al.* 2012; Ogden *et al.* 2012). Hala ere, espezie arteko anplifikazio gurutzatua erabili dituzten aipatutako ikerlanetako espezieak harreman urruna dute, ez hegaluzea eta hegalaburra bezala, zeintzuk filogenetikoki hurbil dauden (Chow & Kishino 1995; Chow *et al.* 2006) eta hibridatzen direna jakina da (Viñas & Tudela 2009). Gure emaitzak Mahli *et al.*-enaren (2011) antzekoak dira, zeintzuek %30eko anplifikazio gurutzaketa arrakasta lortzen duten mundu zaharreko tximino espezieen artean.

4.3. Stock egitura

SNPen ahalmen estatistikoa faktore desberdinek baldintzatzen dute. Lehenik, populazioen egitura antzemateko markatzaileen ahalmena hasi egiten da markatzaileen heterozigositatea $H_e \geq 0,2$ denean (Haasl & Payseur 2011). Gure ikerlanean, SNPen %60 inguru $H_e > 0,2$ zuten. Bigarrenik, SNP indibidualek mikrosatelite multi-alelikoek baino ahalmen gutxiago dutenez (Ryman *et al.* 2006; Haasl & Payseur 2011), fisikoki lotuta dauden SNPak haplotipo-taldetan batzeak ahalmen estatistikoa handitzen du (Gattepaille & Jakobsson 2012). Adibidez, Mesnick *et al.*-ek (2011) populazio egitura bera eskuratu zuen kaxalotean (*Physeter macrocephalus*) 6 mikrosateliterekin edo 36 SNPekin, 24 markatzaile independente ordezkatzuz, 8 haplotipo-talde barne. Gure ikerlanean, POWSIM simulazioek erakusten dute hegaluzean lotutako SNPen 9 haplotipo-taldeek 32 SNP indibidualen ahalmen estatistiko bera dutela. Edozein kasutan ere, haplotipo-taldeek eta SNP indibidualek batera, %0ko II motako akats tasa (benetako desberdintasunak antzematen hutsegitea) erakusten dute $F_{ST} = 0,004$ edo altuagoetarako.

4.4. Stock egitura hegalaburrean

Gaur egun, Atlantiar Atunak Zaintzeko Nazioarteko Batzordeak (ICCAT) 45°W meridianoak banatutako bi stock-etan banatuta kudeatzen du hegalaburra (Fromentin & Powers 2005). Geografikoki definitutako stock kontzeptu hau espazialki banatutako bi errute-guneek babesten dute, bata Mediterraneoan eta beste Mexikoko Golkoan (Rooker *et al.* 2007). Hala ere, markaketa eta mikrokimika ikerketek stock banaketa eredu konplexuagoa iradokitzen dute (Rooker *et al.* 2008; Walli *et al.* 2009; Galuardi *et al.* 2010). bazka-taldekatzeak IE Atlantikoan eta edonon potentzialki bi errute-guneetan sortutako arrainez osatuak daude, izan ere bi noranzkotako Atlantikoan zeharreko migrazioak dokumentatu dira (Magnuson *et al.* 1994; Mather *et al.* 1995; Lutcavage *et al.* 1999; Block *et al.* 2001; Block *et al.* 2005; Rooker *et al.* 2006). Hala ere, badirudi jaiotzako errute-

gunera itzultzea (Boustany *et al.* 2008; Block *et al.* 2005; Teo *et al.* 2007; Dickhut *et al.* 2009) bi talde nagusiak isolatzen dituela. Berriki argitaraturiko mtDNA eta mikrosateliteetan oinarritutako ikerlanek aditzera ematen dute Mediterraneoko populazioak partzialki isolatutako subpopulaziotan egituratuak egon daitezkeela (Riccioni *et al.* 2010; Viñas *et al.* 2011).

Ikerketa honetako hegalaburraren SNP panela, nahiz eta kopuruan mugatua SNP aurkikuntza estrategia dela eta, gehiegi ustiatutako espezie honen kudeaketa hobetzeko lanabes baliotsu baten hasiera da. Roche-ren 454 edo Illumina-ren HiSeq plataformaren (ikus Garvin *et al.* 2010 eta Seeb *et al.* 2011) moduko hirugarren belaunaldiko sekuentziazio (NGS) teknologien sorrerak ehundaka-milaka SNPen aurkikuntza ahalbidetzen ari da organismo ez-ereduetan, teknika hauek hegalaburrean (eta hegaluzean ere) aplikatzea ikerlan honetan azaldutako lanabesari esangarritasuna emango lioke. Ikerlan honetako aurretiazko azterketak Atlantikoko mendebaldeko eta ekialdeko mugetako bi errute-gune handien arteko desberdintzapen genetikoak baieztatzen du (bai F_{ST} eta bai STRUCTURE emaitzak) eta ICCAT-en kudeaketa palanarekin bat dator. Markaketen bidez ozeano zeharreko helduen migrazioak dokumentatu dira, hala ere, eskala txikiagoko populazio egiturak egon daitezke. Gure SNP azterketak erakutsi du Bizkaiko Golkoko bazka guneko laginak Mediterraneoko laginekin taldekatzen direla, hortaz, Mediterranean jatorria ezartzen zaiei arrain hauei. Guk dakigula, honako hau da lehendabiziko lana zeinetan IE Atlantikoko adin klase desberdineko hegalabur nahasketa bati errute-gunea egokitu zaion DNA datuetan oinarrituta. Aurretiko ezagutzak markaketa lan garesti eta neketsuetan (Rooker *et al.* 2007) eta Azoreseko (Atlantiko erdian) eta Mediterraneoko laginak konparatzen zituen alozimetan oinarritutako ikerlan batean (Pujolar *et al.* 2003) oinarritu ziren.

Neutralitatean espero zitekeena baino desberdintasun maila altuagoak lortu izanak, SNP batzuk hautespenaren menpe dauden geneei lotuta egon daitezkeela adieraz dezake. Hegalaburrean SNP kopurua txikiak neutraltasun froga egitea eragozten duen arren, $F_{ST} = 0,116$ balio altuak, hau da, hegalabur populazioen arteko desberdintasun maila altua zenbait SNPetan hautespen direkzionalaren ondorioaren adierazle izan daiteke. Hautespen direkzionalak eragindako markatzaileak sarri markatzaile neutralek baino F_{ST} balio altuagoak erakutsi ohi dituzte populazioen artean (adb. André *et al.* 2011; Ackerman *et al.* 2011; Poulsen *et al.* 2011). SNP markatzaile gehiago behar dira hegalaburrean hautespenaren hipotesia testatzeko, populazio egitura estimatzeko eta stock-nahasketako kideak identifikatzeko arrantza guneetan.

4.5. Stock egitura hegaluzean

ICCAT-ek, Indiar Ozeanoko Atunaren Batzordeak (IOTC), Pazifiko Mendebalde eta Zentraleko Arrantza Batzordeak (WCPFC), eta Atun Tropikalaren Batzorde Interramerikarrak (IATTC) hegaluzea sei stock-eko modeloan oinarrituta kudeatzen dute: 1) Mediterraneo itsasoa, 2) ipar Atlantikoa, 3) hego Atlantikoa, 4) Indikoa, 5) ipar Pazifikoa eta 6) hego Pazifikoa. Stock hauen

definizioa errute-guneen ezagutza partzialean, arrantzategien banaketa geografikoan, bizitza zikloko aldagaietan eta markaketa ikerlanetan (Arrizabalaga *et al.* 2004) oinarritzen da.

Ikerlan honetako analisiak populazio ozeanikoen arteko harreman genetikoak ebatzen ditu. Binakako F_{ST} balioek lau hegaluze talde desberdintzatzen ditu, 1) Mediterraneo itsasoa, 2) ozeano Atlantikoa, 3) ozeano Pazifikoa eta 4) ozeano Indikoa, ozeano barneko heterogeneitate gabe (2.1 Taula, 2.1 Irudia). Heterogeneotasun frogak ez zuten desberdintasunik antzeman ipar eta hegoko populazioen artean ez Pazifiko ezta Atlantiko barruan ere. Mediterraneo taldea guztien artetik desberdinen izan zen, hau bat dator mikrosateliten bidez aurretik lortutako emaitzekin (Davies *et al.* 2011). Bai SNPek eta bai mikrosateliteek Mediterraneo eta ipar Atlantikoko populazioen isolamendu partziala nabarmendu dute, banaketa genetiko hau bat dator markatze-berrazemate analisiarekin, emaitzek ipar Atlantiko eta Mediterraneo artean mugimendu mugatuak direla diote (Arrizabalaga *et al.* 2004). SNPen emaitzek ozeano Indikoa genetikoki Pazifikoarengandik hurbilago kokatzen dute Atlantikoarengandik baino. Aldiz, Indiko eta Atlantiko arteko harreman hurbilagoak aurkeztu ziren odol-taldeen frekuentzietan oinarrituta (Arrizabalaga *et al.* 2004).

Oro har, emaitza genetikoek gutxienezko 4 entitate genetiko daudela babesten dute, Mediterraneo itsasoa, Atlantiko, Pazifiko eta Indiko ozeanoak bata bestearekiko isolatuta daudelarik nolabait. Emaitza hauek populazio ozeanikoak, Mediterraneo barne, banatuta kudeatzen diren kudeaketa planak babesten ditu baina ez dator bat gaur egungo sei kudeaketa unitateen (stock) definizioarekin. Hala ere, gure ikerlaneko ozeanoen barneko laginketa gune kopuru eta indibiduo laginketa mugatua kontuan izanda, gaur egungo sei stock-eko kudeaketa modeloak hurbilketa kontserbakorra suposatzen du, honek ustekabeen populazio batzuen gehiegizko arrantza gertatzeko arriskua murriztea dakar.

5. Ondorioak

128 SNP markatzaile *de novo* garatu genituen hegaluzean eta 53 SNPeko panel finala (41 markatzaile, hots, 32 SNP indibidual eta 9 haplotipo-talde) erabili genuen espeziearen banaketa guztia barnean hartzen zuten 400 indibiduotik gora genotipatzeko. Laginketaren eskala latzak populazio egituraren inguruko ondorioak mugatzen dituen arren, hegaluzearen inguruko emaitzak bat dator aurreko ikerlan molekularrekin gutxienez lau hegaluze populazio daudela adieraztean: Mediterraneo itsasoa, Atlantiko, Pazifiko eta Indiko ozeanoak. Ondoren, hegaluzean garatutako SNP lanabesetatik 17 SNP balioztatu ziren hegalaburrean (15 markatzaile, hots, 13 SNP indibidual eta 2 haplotipo-talde). SNP kopuru txiki honek errute-gune nagusiak desberdintzatzen ditu Mexikoko Golkoan eta Mediterraneo itsasoan eta Bizkaiko Golkoan elikatzen diren jubenilen jatorri mediterranearra identifikatzen du. SNP berrien garapenak bi espezieen populazioen egitura ebazteko beharrezko ahalmen estatistikoa handituko du.

Beste markatzaile mota batzuekin alderatuz gero, alozima eta mikrosateliteak esate baterako, SNPek bi abantaila dituzte mundu mailako atunen kudeaketari begira. Lehenik, SNP kopuru handiak, indibidualki edo haplotipo-taldetan, ahalmen estatistiko nahikoa dute biologikoki adierazgarriak diren stock arteko desberdintasun genetikoak antzemateko atunetan. Atunen mugikortasun handiak stock artean desberdintasun txikiak sortzea espero da. Bigarrenik, eta garrantzitsuena, SNP lanabesak edozein laborategian erabil daitezke ikerketa talde edo kudeatzaileen arten aldagai alelikoak estandarizatzeko beharrik gabe. Datu-base unibertuala finkatzeko mundu mailako kooperazioa beharrezkoa da nazioarteko mugak gainditzen dituzten espezie kaltebera hauek kontserbatu eta kudeatzeko. Espezie bietarako garatutako SNPak lanabes baliagarriak suerta litezke populazioen kudeaketan eta arrantza produktuen trazabilitatean.

Esker onak

I. Miguel eta F. Rendo (UPV/EHUko Sekuentziazio eta Genotipazio Zerbitzua, SGIker) laguntza teknikoarengatik, C. Manzano (UPV/EHU), M. A. Pardo (AZTI), I. Cancio (UPV/EHU) eta G. Heinisch (University of New Hampshire) kolaborazioagatik. J. Areso, D. Fuller, K. Schaefer, V. Allain, S.Y. Yeh, I. Fraile eta I. Arregi laginengatik. Ikerlan hau Eusko Jaurlaritzaren ATM2010Hegaluze (351BI20090047) ATM2009Hegalabur (351BI20090034) eta ATM2008Bonorte (ACM2008BONORTE) eta Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren ACEITUNA (CTM2011-27505) proiektuek babestu dute. Urtzi Laconcharen lana *Iñaki Goenaga - Zentro Teknologikoen Fundazioaren (IG-ZTF)* doktoretza bekak lagundu du. Sekuentziazioa eta genotipazioa Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretan (SGIker), UPV/EHU, burutu ziren.

Material gehigarria

S2.1. Taula. *Thunnus alalunga* espeziean SNPak aurkitzeko aukeratutako 54 DNA nuklear zatien informazioa (ikus Metodoak): DNA zatiaren izena, gene eskualdea, SNP aurkikuntza estrategia (I, II eta III; ikus Metodoak), sorburua, zentzuzko and alderantzizko hasle sekuentziak, PCR lotura tenperaturak, sekuentziatutakozatien luzera eta lortutako SNP kopurua and txertaketa-ezabaketak. EPIC hasleak (Exon-Priming, Intron-Crossing hasleak; SNP aurkikuntzarako I estrategia) literaturatik eskuratu ziren, gainontzeko DNA zatietarako hasleak eskuragarri dauden datu-baseetako (GenBank and Ensembl) sekuentzia publikoen lerrotakzearen bidez eskuratu ziren, hurrenez hurren, hainbat teleosteen sekuentzien 17 hasle pare degeneratuak (II estrategia) eta 18 hasle pare *Thunnus* generoko DNA sekuentzien bidez (III estrategia).

DNA zatiaren izena	Gene eskualdea	Estrategia	Sorburua	Zentzuzko haslea (5'→3')	Alderantzizko haslea (5'→3')	TD tenperatura	Temperatura finkoa	DNA zatiaren luzera	SNP #	txertaketa-ezabaketak
<i>ADRB2</i>	<i>beta 2 hartzaile adrenergikoa</i> Introna	I	Lyons <i>et al.</i> 1997	F: TTAACTTCCAGAGCCTGCTGACA	R: TCAGCCAGCCATTACCAACA	52°C	40°C	146	2	-
<i>ALDOB1</i>	<i>aldolasa B 1</i> Introna	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: GCTCCAGGAAAGGGAATCCCTGGC	R: CTCGTGGAAGAAGATGATCCCGCC	72°C	62°C	216	5	-
<i>ALDOB4</i>	<i>aldolasa B 4</i> Introna	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: GCCAGATATGCCAGCATCTGCCC	R: GGGTTCCATCAGGCAGGATCTCTGGC	62°C	50°C	123	1	-
<i>ALDOC1</i>	<i>aldolasa C 1</i> Introna	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: CCTGGCTGCGGACGAGTCTGTGGG	R: GGCGGTACTGTCTGCGGTTCTCC	80°C	70°C	187	11	-
<i>AMY2B3</i>	<i>Alpha2B amylasa 3</i> Intron	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: TGGAACCGAAACATTGTGAAC	R: CCCATCCAGTCATTCTGATCC	60°C	48°C	113	6	-
<i>CALM4</i>	<i>kalmomodulina 4</i> Introna	I	Chow 1998	F: CTGACCATGATGGCCAGAAA	R: GTTAGCTTCTCCCCAGGTT	62°C	52°C	423	8	-
<i>G6PD4</i>	<i>glukosa-6-fosfato deshidrogenasa 4</i> Introna	I	Chow & Nakadate 2004	F: GAGCAGACGTATTTGTGGG	R: GCCAGGTAGAAGAGGCGGTT	-	62°C	308	7	1 (1bp)
<i>GNRH3-1</i>	<i>hormona gonadotropina-askatzailea 3 1</i> Introna	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: AATGCACCACATGCTAACAAGGC	R: CGCACCATCACTCTGCTGTTCGC	62°C	52°C	197	3	-
<i>GNRH3-3</i>	<i>hormona gonadotropina-askatzailea 3 3</i> Introna	I	Hassan <i>et al.</i> 2002	F: GCCCAAACCCAAGAGAGACTTAGACC	R: TTCGGTTGAAATGACTGGAATCATC	58°C	46°C	327	2	-
<i>LDHB</i>	<i>laktato deshidrogenasa B</i> Introna	I	Friesen <i>et al.</i> 1999	F: TCAAACGTAAGGGGAGATGATGGA	R: TTCCTCTGGACCAGGTTGACCTGCTCTC	-	62°C	368	20	-
<i>MLL25a</i>	<i>lukemia leinu mistoa 25a</i> Introna	I	Venkatesh <i>et al.</i> 1999	F: GCNCGNTCNAAYATGTTYTYGG	R: ATRTNTCCRCARTCRTRTRTT	58°C	46°C	552	14	-
<i>LYZ</i>	<i>lizozima 2</i> Introna	I	Mitra <i>et al.</i> 2003	F: CCCGGGGGCTAAGAACG	R: ATGCCTGAAAATATGAAGAGTGG	58°C	48°C	591	20	-
<i>MT</i>	<i>metalotionina</i>	I	Rolland <i>et al.</i> 2007	F: ATGACCCCTGCGAATGCTC	R: GCAGGAGCCTCCGCAGTTGC	58°C	46°C	112	0	-
<i>MYC</i>	<i>C-Myc 3'UTR</i>	I	Panno & McKeown 1995	F: CCGGAGGTGGCTAACAATG	R: TGCCTGAACCTCCTGACAAT	58°C	46°C	168	11	2 (2bp&1bp)

MYL3	<i>miosina kate arina 3</i> Introna	I	Touriya <i>et al.</i> 2003	F: AGTAATGACGTGCGCAGATGTCT	R: CGACAGGTTCACTCTCGAGGAG	55°C	42°C	135	2	-
RHO	<i>rodopsin</i>	I	Venkatesh <i>et al.</i> 1999	F: CCNTAYGAYTAYCCNCARTAYTA	R: TTNCCRCARCAYAANGTNGT	58°C	46°C	525	2	-
RPS7-1	<i>S7 proteina erribosomikoa 1</i> Introna	I	Chow & Hazama 1998	F: TGGCCTCTTCCTTGCCCGTC	R: AACTCGTCTGGCTTTTCGCC	58°C	46°C	613	42	-
RPS7-2	<i>S7 proteina erribosomikoa 2</i> Introna	I	Chow & Hazama 1998	F: AGCCCAAATAGTGAAGCC	R: GCCTTCAGGTCAGAGTTCAT	-	60°C	605	34	-
TPMA	<i>alpha tropomiosina</i> Introna	I	Friesen <i>et al.</i> 1999	F: GAGTTGGATCGCGCTCAGGAGCG	R: TCAGCCTCCTCAGCGATGTGCTT	64°C	52°C	341	5	-
A2M	<i>alpha-2-makroglobulina</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CRGGGAACACTTGGYTRACWGC	R: AGAGCCTGAAGAGCCACCACYGTGCCTG	-	62°C	128	6	2 (5bp&1bp)
APOE	<i>E apolipoproteina</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: AAGCTGAAGAARCGCCTBAACAAGGAC	R: AGCTCRTCSATCTTGCCYTCAGGGAGGT	-	66°C	326	3	-
CYCS	<i>c citochromoa</i> , somatikoa, gene nuklearra proteina mitokondriala kodetzen	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: TTYGTCCAGAAGTGTGCCAGTG	R: TTCTTYTTGATGCCRGC GAAGATCAT	-	58°C	264	9	-
DAD1	<i>heriotza zelularren aurkako babestzailea 1</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: AARGTGGTGGACGCNTATYTGCTGTACATC	R: GGACGGTGTGAGCGAAYAGRAAGTC	-	64°C	549	21	-
F2	<i>protrombina (II koagulazio faktorea)</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CCATGGCAGGTGATGYTSTACAA	R: GTCMCGGTTCAGRTTYCTCTCCAG	-	56°C	268	11	-
FGB	<i>beta fibrinogenea</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: GGAGGNTGGSTBCTCATCCAGA	R: TCCAGTCCTSCATCTCVATG	-	58°C	312	6	-
FOS	<i>fos</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: ARCCCATCTGCAARATCCC	R: AGBGAYTGGTCGTTGCTGBTGCT	-	60°C	442	9	-
GPX	<i>glutation peroxidasa</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CCCTGCAAYCAGTTYGGMCATCAGGAGAAC	R: TGGTVAGGAAMYTYCTGCTGTAVCGCTT	-	60°C	572	6	1 (1bp)
HGF	<i>hepatozito hazkuntza faktorearen modukoa</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: GARTCYCAVCTGGTCATGCTDCA	R: GTGCACATCTCATTCTCRG	-	64°C	554	4	-
HMOX1	<i>heme-oxigenasa 1</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CAGGGAYYTGTCNGARCARATCAA	R: GACAGRTCNCBAGGTAVCGGGTGAAGC	-	56°C	499	11	-
MMP9	<i>metalopeptidasa 9</i> matrizea	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: TTTGADGGAGACCTCAAATGGGA	R: TGTACATDGGGTACATGAGHGCMCTC	-	58°C	521	5	2 (1bp)
MTF1	<i>1 metal-erregulatzailerako transkripzio faktorea</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: TACAGCACRGRGAAACCTGCG	R: GTACTTKGTGCATCCCTCKGATTCACAG	-	66°C	636	10	-
PSM	<i>proteasoma azpiunitatea N3</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: AACATCTCYCGCTCATGAA	R: GCTGCGGCGGTTGTACATKAC	-	60°C	389	8	1 (1bp)

PTGS2	<i>prostaglandin-endoperoxido sintasa 2 (prostaglandin G/H synthasa eta ziklooxigenasa)</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CACCAGTTCTTCAARTCHGA	R: TGATGTAYGCYACYATYTTGGCT	-	56°C	626	23	-
RASA3	<i>RAS proteina aktibatzailea 3</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: CTGYTGGACATYCTGGACACKGCAGG	R: AGDCCCTGTCTGGTTTTGGCWGA	-	62°C	265	5	-
RHOC	<i>ras homolog familia homologoaren C kidea</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: AAGCTGGTGATHGTBGGVGAT	R: GAGAAGCACATGAGGATGACRTC	-	62°C	255	15	-
RPL12	<i>proteina erribosomikoa L12</i>	II	Ikerlan honetan diseinatutako hasleak	F: GACTGGAAGGGYCTGAGGATCAC	R: CTGTYGATGTCMTCGATGAYRTC	-	56°C	541	30	1 (4bp)
<i>c-mos</i>	<i>ooziteheltzearen faktorea (c-mos) genea</i>	III	DQ874861.1	F: AACATCGTTCGCGTCATC	R: CAGACACCCCTTCTCCTTTC	60°C	48°C	340	6	-
CS1	<i>zitrato sintasa 1</i> Introna	III	AY461849.1	F: ATGGCAAAACCAACATAGGAC	R: CCTTCATCCCCCTCATAACC	-	60°C	653	11	-
CS2	<i>zittrato sintasa 2</i> Introna	III	AY461849.1	F: AGGTATGAGGGGGATGAAGG	R: GTGACCAGCAGCCAGAAGAG	-	58°C	326	24	-
CS3	<i>zittrato sintasa 3</i> Introna	III	AY461849.1	F: ATCCGTTTCCGGGGCTAC	R: CAAAGCTGCTCTCGCTGTT	-	58°C	645	32	2 (3bp&1bp)
CS5	<i>zittrato sintasa 5</i> Introna	III	AY461849.1	F: CATGGACTTGATTGCCAAG	R: CGCTGAAGGACAGATAGGG	-	60°C	551	27	1 (1bp)
ELOVL2	<i>ELOVL azido koipetsuaren elongasa 2</i> Introna	III	FJ156735.1	F: TCTACTGCCAGGACACTACA	R: CGAACCACCAGATATTCAGCA	62°C	52°C	621	7	-
ELOVL3	<i>ELOVL azido koipetsuaren elongasa 3</i> Introna	III	FJ156735.1	F: CATTCTTCACATCTACCACCAC	R: CCTATTTGGAAGTACAGCCATCC	64°C	54°C	611	9	1 (1bp)
FGG	<i>fibrinogen gamma katea</i> Intron	III	CA352559, BX510913.9	F: AGACGGACTATCTGTTGGATTTG	R: TCCTTTCCTTTTCCACATTTG	-	50°C	307	4	-
GPX	<i>glutation peroxidasa</i>	III	IEF452498.3	F: GGC AAAACCC CAGTAAACTAC	R: GGAAGATCCTTCTCCACCAC	64°C	52°C	637	23	1 (1bp)
HBB	<i>B hemoglobina katea</i>	III	AB093568.1	F: AGCATCATCGCTGGCATC	R: TTTCATTGAGGAGACAAACCAC	60°C	50°C	478	4	-
HIF1A2-3	<i>hipoxiak eragindako 1 faktorea, alpha azpiunitatea 2 & 3</i> Intronak	III	EU300942.1	F: GCGTGGAAAGGAGTCGGAG	R: GGTCGCAGGGATGTATGAAG	-	62°C	573	21	2 (2bp&1bp)
HIF1A4	<i>hipoxiak eragindako 1 faktorea, alpha azpiunitatea 4</i> Intronak	III	EU300942.1	F: GGAGATGCTGGTCCACAAAAC	R: TTCATTGCGAGGAAGAAGCTG	-	62°C	627	5	-
MB	<i>mioglobina</i>	III	AF291832, AF291838, AB104433.1, AF291836	F: ATGGAGGCCTGGTTCTGAC	R: TCTCTGATATACACCGATCTCACC	-	62°C	455	8	-
Mhc1	<i>MHC II mota 1</i> Introna	III	AF134968	F: ACTCCCGCCTGGAGTACAcGC	R: CAGGAGATCTTCTCTCCAGAC	58°C	46°C	172	1	-
OPC02	RAPD OPC-02 Markatzailea	III	AF243431	F: CCCTGGAACACAGAAAATG	R: GCAGAAACTTGAGCAGGAAG	-	54°C	306	12	-
PRDX2	<i>2 peroxierredoxina</i> Introna	III	EU093980.1	F: TCTCCAGAGACTACGGTGTACTG	R: GACGTCAGGGATGATGGTG	62°C	48°C	563	33	1 (1bp)
RAG2	<i>errekombinazioaren gene aktibatzailea 2</i>	III	DQ874771.1	F: CGCTGCAAAGAGAAAGAAGCTG	R: GTCCACCTGACAACCAAGG	56°C	44°C	640	11	1 (1bp)

<i>Tmo-4C4</i>	<i>titin (TTN)</i> moduko proteina	III	DQ388108.1	F: GTTTTACGCCGAGGTGTTTG	R: GAGGGGATGGAGAACGAGAG	-	60°C	253	1	-
----------------	------------------------------------	-----	------------	-------------------------	-------------------------	---	------	-----	---	---

-Chow S. (1998) Universal PCR primer for calmodulin gene intron in fish. Fisheries Science 64, 999-1000.

-Chow S. & Hazama K. (1998) Universal primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. Molecular Ecology 7, 1255-6.

-Chow S. & Nakadate M. (2004) PCR primers for fish G6PD gene intron and characterization of intron length variation in the albacore *Thunnus alalunga*. Molecular Ecology Notes 4, 391-3.

-Friesen V.L., Congdon B.C., Kidd M.G. & Birt T.P. (1999) Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. Molecular Ecology 8, 2147-9.

-Hassan M., Lemaire C., Fauvelot C. & Bonhomme F. (2002) Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. Molecular Ecology Notes 2, 334-40.

-Lyons L.A., Laughlin T.F., Copeland N.G., Jenkins N.A., Womack J.E. & O'Brien S.J. (1997) Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. Nature Genetics 15, 47-56.

-Mitra A., Foster-Frey J., Rexroad C.E. III, Wells K.D. & Wall R.J. (2003) Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication. Animal Biotechnology 14, 7-12.

-Panno J.P. & McKeown B.A. (1995) Cloning and expression of a myc family member from the pituitary gland of the Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Biochimica et Biophysica Acta 1264, 7-11.

-Rolland J.-L., Bonhomme F., Lagardere F., Hassan M. & Guinand B. (2007) Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the Northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: revisiting the divide with EPIC markers. Marine Biology 151, 327-41.

-Touriya A., Rami M., Cattaneo-Berberi G., Ibanez C., Augros S., Boissin E., Dakkak A. & Berberi P. (2003) New primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. BioTechniques 35, 676-82.

-Venkatesh B., Ning Y. & Brenner S. (1999) Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 10267-71.

S2.2. Taula. T. alalunga-n SNP bilaketa burutzeko 54 DNA nuklear zatien amplifikatzeko polimerasaren erreakzio katearako (PCR) informazioa eta baldintza ziklikoak. 30 zati ohiko PCR-aren bidez amplifikatu ziren, gainontzeko TD metodologia bidez, lotura tenperatuta beherakada barne hartzen duena. (1) Lotura tenperatura S2.1. Taulan erregistratutako tenperaturan hasten da lehendabiziko zikloan ("TD tenperatura" zutabea) zati bakoitzerako. Ondoren, lotura tenperatura 0,5°C behera egiten du ondorengo ziklo bakoitzean. (2) DNA zati bakoitzerako lotura tenperatura finkoa. Ikus "Tenperatura finkoa" zutabea S2.1 Taulan.

PCR erreakzioa	TD PCRa	Ohiko PCRa
5X GoTaq Flexi Buffera (Promega) (µl)	5,0	-
10X AmpliTaq Gold Buffera II (Applied Biosystems) (µl)	-	2,5
MgCl ₂ (Promega) [mM]	2,0	-
MgCl ₂ (Applied Biosystems) [mM]	-	2,5
GeneAmp dNTP Mix (Applied Biosystems) [mM]	0,8	0,8
Hasleak (Thermo Fisher Scientific) [µM each]	0,7	0,7
Albumina (Roche Diagnostics) (mg/ml)	0,32	-
GoTaq DNAPolimerasa (Promega) (U)	1,5	-
AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems) (U)	-	1,5
DNA (ng)	40-80	40-80
Bukaerako Bolumena (µl)	25	25
Baldintza ziklikoak		
Hasierako desnaturalizazioa	95°C - 10 min	95°C-10'
Zikloak	20	40
Desnaturalizazioa	95°C - 30 s	95°C - 30 s
Lotura	T ⁽¹⁾ beherak. - 45 s	T ⁽²⁾ finkoa - 45 s
Luzapena	72°C - 30 s	72°C - 2 min
Zikloak	20	
Desnaturalizazioa	95°C - 30 s	
Lotura	T ⁽²⁾ finkoa - 30 s	
Luzapena	72°C - 30 s	
Bukaerako luzapena	72°C - 10 min	72°C - 10 min

S2.3. Taula. BLASTN homologia bilaketaren emaitzak *T. alalunga* espeziarentzat sekuentziatutako zatiak. *Emaitza onenak* soilik erakusten dira identitatea \geq 70% eta E-balioa $< 10e^{-5}$ kontuan izanda. *T. alalunga*-n sekuentziatutako 54 DNA zatietatik, 35k bete zituzten eskatutako baldintzak.

DNA zatia	Estrategia	Balioa	Identitatea %	E balioa	Lerrokatze onena
<i>ALDOB1</i>	I	220	94	2 E-54	emb FN257466.1 Thunnus albacares mRNA for aldolase A (aldA gene), isolated from muscle
<i>ALDOB4</i>	I	89.8	98	3 E-15	gb FJ826521.1 Perca flavescens aldolase B mRNA, complete cds
<i>CALM4</i>	I	309	90	4 E-81	dbj AB291547.1 Thunnus thynnus CAM gene for calmodulin, partial cds
<i>G6PD4</i>	I	342	94	4,00E-91	dbj AB159515.1 Thunnus alalunga G6PDH gene for glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, partial cds, allele:A
<i>GNRH3-1</i>	I	149	76	6,00E-33	gb EU180153.1 Sciaenops ocellatus growth hormone 3 gene, partial sequence
<i>GNRH3-3</i>	I	352	81	5,00E-94	gb EU180149.1 Cynoscion arenarius growth hormone 3 gene, partial sequence
<i>LDHB</i>	I	102	84	2,00E-18	emb BX649476.3 Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-13I19 in linkage group 4
<i>RPS7-1</i>	I	159	70	9,00E-36	gb AY517759.1 Ambloplites cavifrons isolate AcavA S7 ribosomal protein gene, intron 1
<i>RPS7-2</i>	I	538	87	7,00E-150	dbj AB291549.1 Thunnus thynnus S7RP gene for S7 ribosomal protein, partial cds
<i>TPMA</i>	I	283	93	2 E-73	dbj AB300376.1 Thunnus thynnus TROP gene for tropomyosin, partial cds
<i>A2M</i>	II	73.4	91	2,00E-10	gb AY358020.1 Sparus aurata alpha-2-macroglobulin mRNA, partial cds
<i>APOE</i>	II	287	87	3 E-74	gb EU812517.1 Oplegnathus fasciatus apolipoprotein E (apoE) mRNA, complete cds
<i>CYCS</i>	II	117	91	3 E-23	gb BT083124.1 Anoplopoma fimbria clone afim-evh-521-351 Cytochrome c-b putative mRNA, complete cds
<i>DAD1</i>	II	96.9	84	1 E-16	gb BT083362.1 Anoplopoma fimbria clone afim-evh-529-023 Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit DAD1 putative mRNA, complete cds
<i>F2</i>	II	100	82	4,00E-18	ref NM_213390.1 Danio rerio coagulation factor II (thrombin) (f2), mRNA
<i>FGB</i>	II	96.9	88	6,00E-17	gb EF581895.1 Paralichthys olivaceus fibrinogen beta chain precursor, mRNA, complete cds
<i>FOS</i>	II	462	87	6,00E-127	gb DQ838581.1 Dicentrarchus labrax proto-oncogene protein c-Fos (c-Fos) mRNA, complete cds
<i>GPX</i>	II	396	95	4,00E-107	gb EF452497.1 Thunnus maccoyii glutathione peroxidase mRNA, complete cds
<i>HGF</i>	II	154	91	5,00E-34	gb GU117701.1 Paralichthys olivaceus macrophage stimulating-1 protein mRNA, complete cds

<i>MMP9</i>	II	210	85	7,00E-51	gb BT026665.1 Gasterosteus aculeatus clone CEC36-D03 mRNA sequence
<i>MTF1</i>	II	147	83	8,00E-32	emb AJ131394.1 Fugu rubripes MTF-1 gene and partial INPP5P gene
<i>PSM</i>	II	59	94	9,00E-06	gb BT028445.1 Gasterosteus aculeatus clone CNB218-A02 mRNA sequence
<i>PTGS2</i>	II	60,8	70	8 E-06	emb AM232702.1 Dicentrarchus labrax amh gene for anti-Mullerian hormone, promoter region
<i>RASA3</i>	II	134	93	3,00E-28	gb FJ529376.1 Dicentrarchus labrax Ki-ras-1 mRNA, complete cds
<i>RHOC</i>	II	71.6	88	2,00E-09	gb EU411810.1 TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.762.C1 mRNA sequence
<i>RPL12</i>	II	135	97	2,00E-28	gb AY190964.1 Pagrus major ribosomal protein L12 mRNA, partial cds
<i>c-mos</i>	III	529	93	4 E-147	gb DQ874861.1 Thunnus albacares isolate JJ7:18 oocyte maturation factor (c-mos) gene, partial cds
<i>CS3</i>	III	102	93	2 E-18	gb AY461849.1 Thunnus obesus mitochondrial citrate synthase precursor (CS) mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product
<i>GPX</i>	III	116	100	1,00E-22	gb EF452498.3 Thunnus maccoyii phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA, complete cds
<i>HBB</i>	III	378	96	2,00E-101	dbj AB093568.1 Thunnus thynnus mRNA for hemoglobin beta chain, complete cds
<i>HIF1A2-3</i>	III	273	87	6,00E-70	gb EF139130.1 Dicentrarchus labrax heme oxygenase 1 mRNA, complete cds
<i>MB</i>	III	407	99	3,00E-110	gb AF291832.1 AF291832 Thunnus alalunga myoglobin mRNA, complete cds
<i>Mhc1</i>	III	221	87	9,00E-55	gb AF134968.1 AF134968 Thunnus sp. MHC class II antigen gene, partial cds
<i>PRDX2</i>	III	226	95	9,00E-56	gb EU093980.1 Thunnus maccoyii 2-Cys peroxiredoxin (PRDX) mRNA, complete cds
<i>Tmo-4C4</i>	III	449	98	3,00E-123	gb DQ874835.1 Thunnus albacares isolate JJ7:18 Tmo4c4 (Tmo4c4) gene, partial cds

S2.4. Taula Balioztatutako 79 SNPen ezaugarriak, baliagarriak eta polimorfikoak *Thunnus alalunga* espeziean. Markatzaile izena, SNP aurkikuntza estrategia (I, II eta III; see Methods), genotipazio tasa (%), aleloak eta lelo txikienaren frekuentzia (MAF) balioak, Hardy-Weinberg orekarekiko (HWE) desbideraketa orokorra eta lagin bakoitzeko (*P*). “ESANG:” markatzaile hori laginketa gune batean gutxienez HWEtik kanpo dagoela esan nahi (E.E. ez esangarri esan nahi du); askotariko konparazioak egin direnez $P < 0,001$ -eko probabilitateak esangarritzat jo dira. Azken zutabeak SNP bakoitzaren “NCBI Id” zenbakiari dagokio.

SNPa	Estrategia	Genotip.%	Aleloak	MAF	HWE orokorra	HWE lagin bakoitz	NCBI Id
<i>ADRB2-97</i>	1	97,8	C:T	0,014	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631113
<i>ALDOB1-47</i>	1	94,9	C:T	0,193	0,0004±0,0000	E.E.	rs193631114
<i>ALDOB1-95</i>	1	92,1	G:A	0,136	0,0577±0,0004	E.E.	rs193631115
<i>ALDOB1-125</i>	1	91,0	C:T	0,027	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631116
<i>CALM4-124</i>	1	85,9	C:A	0,311	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631119
<i>GNRH3-1-124</i>	1	88,3	G:A	0,254	0,8947±0,0003	E.E.	rs193631144
<i>GNRH3-3-219</i>	1	98,5	T:C	0,034	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631145
<i>LDHB-96</i>	1	84,5	A:C	0,101	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631153
<i>LDHB-287</i>	1	87,9	G:C	0,222	0,0036±0,0001	E.E.	rs193631154
<i>LYZ-128</i>	1	80,3	T:G	0,332	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631155
<i>LYZ-138</i>	1	89,8	C:T	0,288	0,5314±0,0009	E.E.	rs193631156
<i>LYZ-320</i>	1	81,9	A:G	0,160	0,2323±0,0007	ESANG.	rs193631157
<i>LYZ-340</i>	1	88,3	G:C	0,194	0,3027±0,0009	E.E.	rs193631158
<i>MLL25a-144</i>	1	91,2	T:A	0,468	0,0187±0,0004	E.E.	rs193631160
<i>MLL25a-183</i>	1	90,9	T:A	0,032	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631161
<i>MYC-91</i>	1	95,2	A:G	0,031	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631171
<i>MYL3-73</i>	1	96,5	G:A	0,007	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631162
<i>MYL3-97</i>	1	95,6	A:G	0,015	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631163
<i>RHO-111</i>	1	94,9	T:G	0,022	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631181
<i>RPS7-2-69</i>	1	85,4	A:G	0,145	0,0051±0,0001	E.E.	rs193631185
<i>RPS7-2-278</i>	1	77,7	T:A	0,095	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631186
<i>RPS7-2-313</i>	1	87,2	T:A	0,121	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631187
<i>TPMA-53</i>	1	92,5	G:T	0,489	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631118
<i>APOE-148</i>	2	94,5	C:T	0,161	0,5838±0,0006	E.E.	rs193631117
<i>CYCS-32</i>	2	94,3	C:T	0,057	0,2384±0,0003	E.E.	rs193631133
<i>CYCS-56</i>	2	73,3	C:T	0,001	0,0001±0,0000	ESANG.	rs193631134
<i>CYCS-132</i>	2	94,9	C:T	0,262	0,8860±0,0003	E.E.	rs193631135
<i>CYCS-218</i>	2	89,9	T:C	0,076	0,0313±0,0002	E.E.	rs193631136
<i>DAD1-444</i>	2	93,8	C:T	0,049	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631137
<i>DAD1-483</i>	2	97,8	G:T	0,029	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631138
<i>FGF-257</i>	2	96,0	C:T	0,030	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631141
<i>FOS-107</i>	2	96,3	C:T	0,069	0,0965±0,0003	E.E.	rs193631143
<i>HGF-375</i>	2	95,4	C:T	0,022	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631146
<i>HMOX1-269</i>	2	90,7	T:A	0,104	0,0636±0,0003	E.E.	rs193631151
<i>HMOX1-416</i>	2	86,3	C:A	0,168	0,0975±0,0005	E.E.	rs193631152
<i>MMP9-68</i>	2	96,2	G:C	0,102	0,0301±0,0002	E.E.	rs193631164

<i>MMP9-111</i>	2	94,1	G:A	0,025	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631165
<i>MMP9-306</i>	2	96,3	G:A	0,033	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631166
<i>MMP9-385</i>	2	92,9	C:T	0,010	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631167
<i>MTF1-152</i>	2	94,1	G:T	0,060	0,1745±0,0004	E.E.	rs193631168
<i>MTF1-176</i>	2	94,3	C:T	0,158	0,0089±0,0002	E.E.	rs193631169
<i>MTF1-263</i>	2	91,4	C:A	0,262	0,0076±0,0002	E.E.	rs193631170
<i>PSM-33</i>	2	90,5	G:A	0,413	0,6851±0,0009	E.E.	rs193631176
<i>PSM-117</i>	2	88,3	A:C	0,473	0,0081±0,0002	E.E.	rs193631177
<i>PSM-138</i>	2	84,6	A:C	0,265	0,6382±0,0009	E.E.	rs193631178
<i>PTGS2-56</i>	2	91,2	T:C	0,452	0,2164±0,0011	E.E.	rs193631189
<i>PTGS2-115</i>	2	85,0	A:G	0,337	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631130
<i>PTGS2-154</i>	2	80,1	G:A	0,260	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631131
<i>PTGS2-317</i>	2	87,6	A:G	0,422	0,6905±0,0009	E.E.	rs193631132
<i>RASA3-188</i>	2	96,2	A:G	0,028	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631179
<i>RHOC-55</i>	2	95,2	G:A	0,022	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631180
<i>RPL12-213</i>	2	86,3	G:T	0,208	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631182
<i>RPL12-364</i>	2	90,5	G:T	0,147	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631183
<i>RPL12-423</i>	2	90,5	A:G	0,275	0,7945±0,0005	E.E.	rs193631184
<i>c-mos-242</i>	3	94,1	C:T	0,201	0,2308±0,0008	E.E.	rs193631128
<i>c-mos-278</i>	3	93,4	G:C	0,099	0,8246±0,0003	E.E.	rs193631129
<i>CS1-197</i>	3	95,6	A:G	0,342	0,7523±0,0007	E.E.	rs193631120
<i>CS1-442</i>	3	94,5	C:G	0,055	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631121
<i>CS1-512</i>	3	96,3	T:A	0,049	0,6139±0,0002	E.E.	rs193631122
<i>CS3-137</i>	3	90,3	A:T	0,130	0,0133±0,0002	ESANG.	rs193631123
<i>CS3-394</i>	3	86,1	C:T	0,379	0,2706±0,0011	E.E.	rs193631124
<i>CS5-44</i>	3	91,0	T:C	0,414	<0,0000±0,0000	E.E.	rs193631125
<i>CS5-395</i>	3	78,2	T:A	0,185	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631126
<i>CS5-425</i>	3	86,3	G:T	0,151	<0,0000±0,0000	ESANG.	rs193631127
<i>ELOVL2-519</i>	3	92,0	C:G	0,167	0,0530±0,0004	E.E.	rs193631190
<i>ELOVL3-205</i>	3	87,0	G:A	0,003	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631139
<i>ELOVL3-365</i>	3	95,1	C:T	0,064	0,3848±0,0003	E.E.	rs193631140
<i>FGG-242</i>	3	92,7	C:T	0,268	0,2180±0,0008	E.E.	rs193631142
<i>GPX-273</i>	3	95,6	T:C	0,075	0,1383±0,0005	E.E.	rs193631173
<i>GPX-458</i>	3	85,9	A:T	0,486	0,0201±0,0004	E.E.	rs193631174
<i>HIF1A2-3-350</i>	3	91,4	A:G	0,352	0,3324±0,0012	E.E.	rs193631147
<i>HIF1A2-3-409</i>	3	85,2	T:C	0,198	0,0106±0,0002	E.E.	rs193631148
<i>HIF1A2-3-417</i>	3	89,2	C:T	0,295	1,0000±0,0000	ESANG.	rs193631149
<i>HIF1A4-219</i>	3	94,7	C:T	0,101	0,5148±0,0004	E.E.	rs193631150
<i>MB-188</i>	3	91,2	G:A	0,089	0,0040±0,0001	E.E.	rs193631159
<i>OPC02-249</i>	3	94,5	C:T	0,086	0,7560±0,0003	E.E.	rs193631172
<i>PRDX2-452</i>	3	91,6	G:A	0,006	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631175
<i>RAG2-114</i>	3	87,8	C:T	0,171	0,0011±0,0000	E.E.	rs193631191
<i>Tmo-4C4-188</i>	3	96,7	G:A	0,036	1,0000±0,0000	E.E.	rs193631188

S2.5. Taula. Lotura desoreka (LD) frogaren emaitzak SNP pare guztien artean (balioztatutakoak soilik) DNA zati bakoitzaren barnean, *T. alalunga* and *T. thynnus* espezieentzat (* $P < 0,001$). Ez da SNPik topatu LD egoeran DNA zati desberdinak konparatzean. PHASE softwarea erabiltzean genotipo hutsak genotipo baliogabetzat jo ziren haplotipoak eraikitzerako orduan akatsak ekiditeko.

1. SNPa	2. SNPa	P-Balioa±A.E.
<i>Thunnus alalunga</i>		
ALDOB1-47	ALDOB1-95	<0,0000±0,0000 *
ALDOB1-47	ALDOB1-125	0,1366±0,0018
ALDOB1-95	ALDOB1-125	0,2523±0,0023
LDHB-96	LDHB-287	0,0201±0,0009
LYZ-128	LYZ-138	<0,0000±0,0000 *
LYZ-128	LYZ-340	<0,0000±0,0000 *
LYZ-138	LYZ-340	0,0004±0,0002 *
MLL25a-144	MLL25a-183	0,0001±0,0000 *
MYL3-73	MYL3-97	1,0000±0,0000
CYCS-32	CYCS-132	0,0039±0,0004
CYCS-32	CYCS-218	0,8505±0,0019
CYCS-132	CYCS-218	0,0003±0,0001 *
DAD1-444	DAD1-483	0,3434±0,0013
GPX-273	GPX-458	0,0141±0,0009
HMOX1-269	HMOX1-416	0,6627±0,0029
MMP9-68	MMP9-111	<0,0000±0,0000 *
MMP9-68	MMP9-306	0,1361±0,0019
MMP9-68	MMP9-385	0,2668±0,0021
MMP9-111	MMP9-306	0,7182±0,0007
MMP9-111	MMP9-385	0,6325±0,0007
MMP9-306	MMP9-385	0,4751±0,0010
MTF1-152	MTF1-176	0,0159±0,0007
MTF1-152	MTF1-263	0,1229±0,0020
MTF1-176	MTF1-263	0,0213±0,0010
PSM-33	PSM-117	<0,0000±0,0000 *
PSM-33	PSM-138	<0,0000±0,0000 *
PSM-117	PSM-138	<0,0000±0,0000 *
PTGS2-56	PTGS2-317	<0,0000±0,0000 *
RPL12-213	RPL12-423	<0,0000±0,0000 *
c-mos-242	c-mos-278	0,0033±0,0001
CS1-197	CS1-442	0,0005±0,0001 *
CS1-197	CS1-512	0,0009±0,0001 *
CS1-442	CS1-512	<0,0000±0,0000 *
ELOVL3-205	ELOVL3-365	0,6814±0,0008
HIF1A2-3-350	HIF1A2-3-409	0,0115±0,0008

<i>Thunnus thynnus</i>		
<i>GNRH3-1-107</i>	<i>GNRH3-1-124</i>	0,0001±0,0000 *
<i>LDHB-129</i>	<i>LDHB-287</i>	0,5005±0,0026
<i>RPS7-2-278</i>	<i>RPS7-2-313</i>	0,0276±0,0001
<i>CYCS-132</i>	<i>CYCS-161</i>	0,5807±0,0013
<i>MTF1-176</i>	<i>MTF1-263</i>	0,6764±0,0013
<i>CS3-118</i>	<i>CS3-394</i>	1,0000±0,0000
<i>CS5-395</i>	<i>CS5-425</i>	<0,0000±0,0000 *

S2.6. Taula. *Thunnus thynnus*-ean balioztutako 23 SNPen ezaugarriak. Markatzaile izena, SNP aurkikuntza estrategia (I, II eta III; see Methods), genotipazio tasa (%), aleloak eta lelo txikiaren frekuentzia (MAF) balioak, Hardy-Weinberg orekarekiko (HWE) desbideraketa orokorra eta lagin bakoitzeko (*P*). “ESANG:.” markatzaile hori laginketa gune batean gutxienez HWEtik kanpo dagoela esan nahi (E.E. ez esangarri esan nahi du); askotariko konparazioak egin direnez *P* < 0,001-eko probabilitateak esangarritzat jo dira. Azken zutabeak “NCBI Id” zenbakiari dagokio SNP guztientzat (NCBIko dbSNP datu-basea).

SNP	Method	Call rate	Alleles	MAF	Global HWE	HWE per sample	NCBI Id
<i>ADRB2-97</i>	1	94,90	G:C	0,040	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>GNRH3-1-107</i>	1	97,50	T:A	0,305	0,1040	N.S.	ss550227148
<i>GNRH3-1-124</i>	1	92,40	T:A	0,384	0,6299	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>LDHB-129</i>	1	71,00	A:C	0,336	1,0000	N.S.	ss550227246
<i>LDHB-287</i>	1	74,70	T:G	0,068	0,2215	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>LYZ-128</i>	1	84,80	T:C	0,045	0,0020	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>RPS7-2-278</i>	1	74,70	C:A	0,051	0,2253	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>RPS7-2-313</i>	1	77,20	A:C	0,236	0,0022	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>TPMA-53</i>	1	79,70	C:T	0,206	0,3046	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>CYCS-132</i>	2	89,90	C:G	0,035	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>CYCS-161</i>	2	72,10	T:A	0,139	0,0382	N.S.	ss550227317
<i>HGF-375</i>	2	98,70	G:C	0,122	0,0789	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>MTF1-176</i>	2	87,30	G:C	0,123	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>MTF1-263</i>	2	82,30	G:A	0,185	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>RHOC-55</i>	2	83,50	T:A	0,053	1,0000	SIGN.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>RPL12-423</i>	2	88,60	A:T	0,393	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>CS3-118</i>	3	78,50	T:A	0,315	0,5711	N.S.	ss550227367
<i>CS3-394</i>	3	84,80	G:C	0,015	1,0000	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>CS5-395</i>	3	83,50	C:A	0,189	0,0358	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>CS5-425</i>	3	91,10	C:T	0,208	0,0607	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>FGG-242</i>	3	98,70	G:C	0,359	0,2577	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>HIF1A2-3-417</i>	3	97,50	G:C	0,084	0,1010	N.S.	<i>ikus S2.4. Taula</i>
<i>OPC02-45</i>	3	92,40	C:T	0,048	1,0000	N.S.	ss550227450

III. Kapitulua



SNP markatzaile berriek hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) egitura genetikoa eta populazioaren tamaina efektiboa argitzen dituzte.

SNP markatzaile berriek hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) egitura genetikoa eta populazioaren tamaina efektiboa argitzen dituzte.

Urtzi Laconcha, Mikel Iriondo, Haritz Arrizabalaga, Carmen Manzano, Pablo Markaide, Iratxe Montes, Iratxe Zarraonaindia, Igor Velado, Eider Bilbao, Nicolas Goñi, Josu Santiago, Andrés Domingo, Saadet Karakulak, Işık K. Oray, Andone Estonba

Laburpena

Ikerlan honetan hegaluze (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) populazioen egitura genetikoa ikertu eta ipar Atlantikoko populazioaren aniztasun genetikoaren galera, gehiegizko arrantzagatik ziur aski, neurtu dugu. Helburu hauek lortzeko, mundu osoko 26 laginketa gunetako 1.331 indibiduo analizatu ziren 75 SNP nuklear berri genotipatuz. Gure emaitzek genetikoki homogeenak diren lau populazio identifikatzen dituzte eta hauen mugak Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, ozeano Indikoa eta ozeano Pazifikoa dira. Gaur egungo stock-en definizioak kudeaketa jasangarria ahalbidetzen du stock batek ere ez duelako entitate genetikoa bat baino gehiago barnean hartzen. Gainera, populazioaren tamaina efektibo garaikidea eta historikoa estimatu ziren ipar Atlantikoko hegaluze populazioan, hauen emaitzek erakutsi zuten ez dela gainbehera historikorik egon populazio honetan. Beraz, gehiegizko arrantzak ez dio populazio honen aniztasun genetikoari eta, ondorioz, moldagarritasun ahalmenari eragin.

Hitz-gakoak: Stock definizioa, kudeaketa jasangarria, kontserbazio genetikoa, arrantzategiak.

1. Sarrera

Hegaluzea (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) ozeano Atlantiko, Pazifiko eta Indikoan, eta Mediterraneo itsasoan barrena bizi da, espeziearen banaketa 50-55°I-tik hasi 40-45°H-ra hedatzen da (Arrizabalaga *et al.* 2014). Harrapaketei dagokionez *Thunnus* generoko laugarren espezierik garrantzitsuenak da hegaluzea (FAO 2014). Honek agerian uzten du hegaluzearen eta produktu eratorrien balio komertzial altua, balio altu honek espeziea gehienezko errendimendu jasangarritik gora ustiatua izatera bultzatzen du (Arrizabalaga *et al.* 2014). Espeziearen migrazioak hamarkadetan zehar ikertu dira markatze-berrantzemate esperimenteren bidez, hauek hemisferio arteko migrazio baxuak (Arrizabalaga *et al.* 2002) eta ozeanoan zeharreko (Childers *et al.* 2011; Farley *et al.* 2013; Arrizabalaga *et al.* 2014) eta Atlantiko-Mediterraneo arteko migrazio eza deskribatu zituzten (Arrizabalaga *et al.* 2004). Oso ikerlan gutxi daude espeziearen errute-guneen

gainean, izan ere espeziearen larba eta urteko gazte (erreferentzia laginak) harrapaketak ez dira oso ohikoak. Mediterraneo mendebaldean errute-gune bat definitu da (Duclerc *et al.* 1973; Lalami *et al.* 1973; Dicenta *et al.* 1975), bi errute-gune ipar Atlantikoan (Beardsley 1969; Carlsson 2007), bakarra hego Atlantikoan (Beardsley 1969), bakarra ozeano Indikoan (Koto 1969; Shiohama 1985) eta bi errute-gune Pazifikoan: iparraldean eta hegoaldean (Nakamura 1969; Ueyanagi 1969; Sund *et al.* 1981). Populazioen dinamikaren gaineko ezagutza hauekin bat, arrantza antolaketarako erakunde erregionalek (RFMO) sei stock edo kudeaketa unitate definitu dituzte: (i) Mediterraneo itsasoa, (ii) ipar Atlantikoa, (iii) hego Atlantikoa, (iv) ozeano Indikoa, (v) ipar Pazifikoa eta (vi) hego Pazifikoa. Arrantzategi asko antolaketa espazialaren arabera kudeatzen dira. Hala ere, migrazioaren gaineko jakintzan soilik oinarritutako kudeaketa unitateek ez dute zertan populazioen egitura biologikoarekin bat etorri behar (Ward 2000; Waples & Gaggiotti 2006). Kasu hauetan, arrantza kudeaketa ez denean egitura biologikoan oinarritzen, espezie ustiatuen ezaugarri biologikoetan, produktibitatean eta aniztasun genetikoan aldaketak gerta daitezke (Ricker 1981). Hortaz, espezie komertzialetan populazioen muga zehatzak ezartzeko jakintza-alor anitzeko hurbilketa beharrezkoa da, zentzu honetan, ikerlan genetikoek oso informazio baliagarria eman dezakete (Pawson & Jennings 1996; Waldman 1999). Modu honetan, populazioen egitura genetikoaren ebaluazioa bestelako populazioen identifikazio metodoekin batera, adibidez markatze-berrantzemate (Arrizabalaga *et al.* 2004) edo otolitoetako markatzaile kimikoak (Miller *et al.* 2010), erabiltzen dituzten ikerlanak arruntak bilakatu dira azken hamarkadan. Jakintza-alor anitzeko ikerlan hauek populazio egitura zehatzagoa, eta ondorioz, arrantzategi kudeaketa politika jasangarriagoak, lortzea ahalbidetzen dute.

Hainbat ikerlanek ebaluatu dute hegaluzearen populazio egitura askotariko hurbilketen bidez: otolitoen mikroegitura (García *et al.* 2006; Macdonald *et al.* 2013), markatze-berrantzematea (Arrizabalaga *et al.* 2004), morfometria (Bard 1981) eta teknika genetikoak (Suzuki 1962; Graves & Dizon 1989; Chow S & Ushiyama 1995, Takagi *et al.* 2001; Viñas *et al.* 2004; Nakadate *et al.* 2005; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012; Albaina *et al.* 2013). Hegaluzearen populazio egiturak barreiarpen gaitasun handia duela nabarmena da (adb. Fontaine *et al.* 2007), beste espezie itsastar batzuen parekoa, hegalaburra (*Thunnus thynnus*) (Albaina *et al.* 2013; Riccioni *et al.* 2010) edo berdela (*Scomber scombrus*) (Jansen & Gislason 2013) adibidez. Hala ere, azken hamarkadan ikerlanak burutu badira ere, hegaluzearen egitura ez dago argi, hegaluze populazio kopuruaren eta mugen gaineko informazio kontrajarria argitaratu baita. Honen harira, Albaina *et al.*-ek (2013) lau hegaluze populazio proposatu zituen (ozeano bakoitzeko bat eta beste bat Mediterraneo itsasoan), Pujolar *et al.*-ek (2003) eta Graves & Dizon-ek (1989) ozeano Atlantikoaren eta Mediterraneo itsasoaren, eta Atlantiko eta Pazifiko ozeanoen artean, hurrenez hurren, homogeneousuna topatu zuten Montes *et al.*-ek (2012) ere ozeano Atlantiko eta Indikoaren artean. Gainera, ozeanoen barruan ere egitura genetikoak ez dago argi, izan ere, ozeanoen barruan edo Mediterraneo itsasoaren barruan heterogeneotasuna badela proposatu dute hainbat ikerlanek (Suzuki 1962; Marano *et al.* 1999; Takagi *et al.* 2001; Arrizabalaga *et al.* 2004; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012). Zaila da ikerlanen arteko konparaketa markatzaile desberdinak erabili direlako eta eremu geografiko

desberdinak lagindu direlako, oso modu mugatuan hainbat ikerlanetan. Berez, ikerlan gutxi batzuek lortu dute espeziearen mundu mailako banaketa barnean hartuz populazioa egitura deskribatzea (Arrizabalaga *et al.* 2014; Montes *et al.* 2012; Albaina *et al.* 2013).

Ipar Atlantikoko hegaluze stock-ak gehiegizko arrantza jasan du 1960ko hamarkada erditik 2000ko hamarkada erdira arte. Ondorioz, ugaltzaileen biomasa gehiegi ustiatu da (gehienezko errendimendu jasangarriari lotutako mailetatik bera) 1980ko hamarkadetatik, baina azken hamarkadan hasi da suspertzen (ICCAT 2014). Espezie baten egitura genetiko definitu ostean, kudeaketa jasangarriaren eta ustiatutako espeziearen kontserbazioari buruz berri ematen duen funtsezko parametroa da populazioaren tamaina efektiboa (N_e) (Hauser & Carvalho 2008). Populazio egitura genetikoak populazioak definitzeko aukera ematen du, N_e -k, aldiz, jito genetikoaren eraginez populazio batek aniztasun genetiko galtzeko duen kalteberatasun maila zehazten du (O'Leary *et al.* 2013), eta ondorioz, populazioen erantzuteko eta egokitzapen gaitasunak neurtzen ditu. Parametro hau populazioen kontserbaziorako garrantzitsua izanik ere, gutxi dira atunetan N_e estimatzen duten ikerlanak (Riccioni *et al.* 2010; Qiu & Miyamoto 2011; Qiu *et al.* 2013; Bravington *et al.* 2014; Nomura *et al.* 2014).

Laburbilduz, hegaluzearen kudeaketa jasangarrian zuzeneko ondorioak dituzten konpondu gabeko hainbat gai daude. Erantzuteke daude gai nagusien artean (1) mundu mailako banaketa duen espezie honen populazioen egituraren gaineko kontsentsu eza, eta (2) arrantzak populazioaren tamaina efektiboan (N_e), eta ondorioz, hegaluze populazioen aniztasun genetikoan, izan duen eragina. Ikerlan honen helburua hegaluze populazioen egitura genetikoaren definizio argia lortzea eta, ipar Atlantikoaren N_e -aren ebaluazioaren bidez, bideragarritasun genetiko argitzea da, arrantza kudeaketa jasangarriko zentzuzko oinarriak ezartze aldera. Helburu hau buruan izanda, hegaluzean oraindaino egin den laginketa zabalena burutu dugu espeziearen mundu mailako banaketa osoan zehar (mundu osoko 26 laginketa gunetako 1,331 lagin). Erabilitako markatzaile kopurua ere gaurdaino plazaratutako handiena izan da, 115 SNP nuklear argitaratu dira hegaluzean espezie arteko transkriptomaren anplifikazioaren eta sekuentziazioaren bidez.

2. Material eta Metodoak

2.1. Laginak eta DNA erauzketa

Espeziearen banaketa geografiko osoa biltzen zuen 26 laginketa gunetako 1.331 indibiduoren laginketa espazio-temporal sakona lortu zen (3.1. Irudia, 3.1. Taula). Laginketa osoak ozeano Atlantikoko 774 indibiduo (12 laginketa gune eta 24 urteko aldea), Mediterraneo itsasoko 254 indibiduo (7 laginketa gune eta 12 urteko aldea), ozeano Indikoko 136 indibiduo (4 laginketa gune eta 4 urteko aldea) eta ozeano Pazifikoko 167 indibiduo (3 laginketa gune eta 5 urteko aldea). Indibiduoak nagusiki 2008 eta 2012 urteen artean lagindu ziren, nahiz eta indibiduo asko aurreko urteetan lagindu ziren, 1988ean zaharrenak. Lagindutako aleak arrantza-ontzi edo aisialdiko

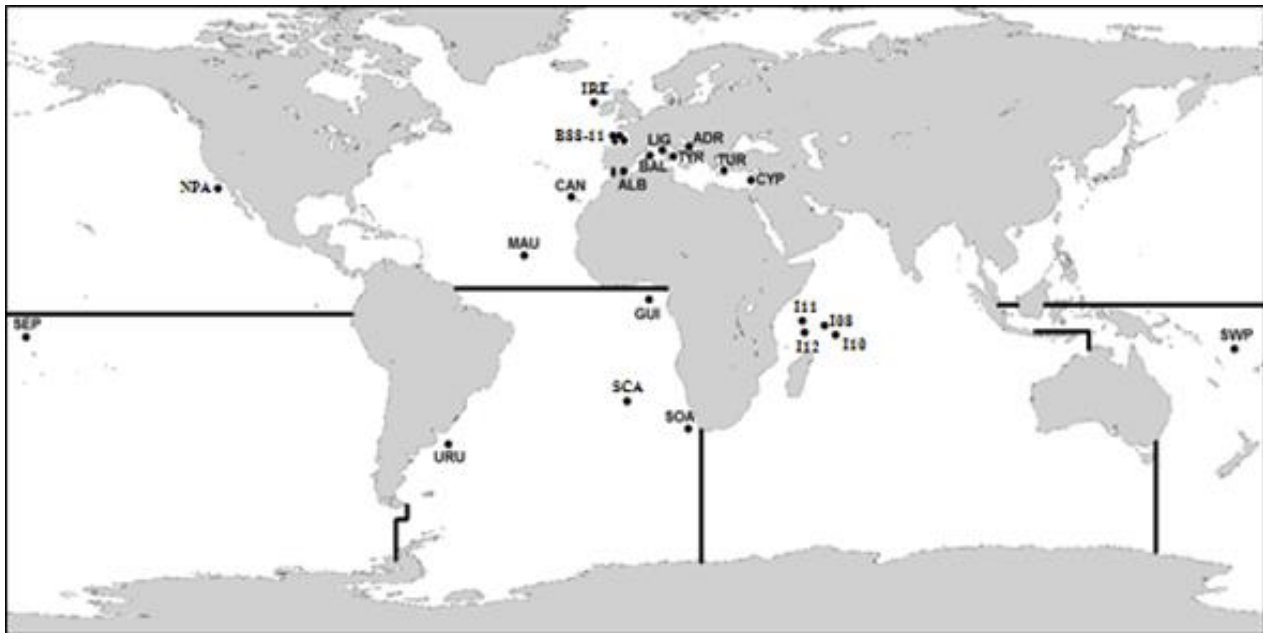
itsasontziek arrantzatutakoak edo institutu ozeanografikoek ikerketa zientifikoak burutzean harrapatutakoak dira. Arrain guztiak baimendutako ohiko arrantza prozeduran eskuratutakoak dira, eta beraz, ez da beharrezkoa izan inongo baimen berezirik. Lagin batzuk aurreko ikerlanetan erabiliak izan dira (Arrizabalaga *et al.* 2004; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012; Albaina *et al.* 2013; Santiago & Arrizabalaga 2005)(3.1. Taula). Lagindutako ehunak nagusiki muskulua, hegatza edo bihotza izan ziren eta -20°C-tan izoztuta edo %96 etanoletan 4°C-tan gorde ziren. Gainera, Eukitt-an (O. Kindler GmbH) ezarritako hezur ebakiak, eta lehortu eta tindatutako odol laginak ere bildu ziren (3.1. Taula). Muskulu, hegatz eta bihotzeko laginetako DNA NucleoSpin 96 Tissue Kit-aren (Macherey-Nagel) bidez erauzi zen. Hezur eta odoleko laginak lehendabizi xylol-ean murgildu eta hezur laginak ondoren eskuz txikitu ziren; lagin hauetako DNA mintz zehatz baten bidez erauzi zen QIAmp DNA Investigator Kit-a (Qiagen) erabilia. Lagin guztien DNA NanoDrop 1000 espektrofotometroa (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) eta Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies) fluorometroaren bidez kuantifikatu zen. DNA lagin guztiak -20°C-tan gorde ziren ondorengo analisietarako.

3.1. Taula. Lagin zenbakia (#), izena, tokia, harrapaketa urtea, indibiduo kopurua (N), stock-a, koordenatu geografikoak eta lagin mota (T, muskulua, hegatza edo bihotz ehuna; B, odola; S, hezurra)

#	Izena	Tokia	Urtea	N	Stock-a	Lat,	Long,	Lagin mota
1 ^A	ADR	Itsaso Adriatikoa	2006	48	Mediterranea	41,29	17,52	T
2 ^{A,B,C}	BAL	Itsaso Balearra	2005	31	Mediterranea	40,00	1,58	T
3	CYP	Txipre	2011	10	Mediterranea	36,08	33,68	T
4	TUR	Turkia	2011	53	Mediterranea	35,04	26,80	T
5 ^A	TYR	Tirreniar itsasoa	2008	48	Mediterranea	38,88	11,74	T
6	LIG	Liguriako itsasoa	2011	27	Mediterranea	43,38	9,05	T
7 ^D	ALB	Alboran itsasoa	1999	37	Mediterranea	36,23	-2,00	B
8 ^E	B88	Bizkaiko Golkoa	1988	34	Ipar Atlantikoa	45,10	-4,35	S
9 ^E	B89	Bizkaiko Golkoa	1989	30	Ipar Atlantikoa	45,64	-4,76	S
10 ^{A,B}	B09	Bizkaiko Golkoa	2009	42	Ipar Atlantikoa	45,05	-5,28	T
11	B10	Bizkaiko Golkoa	2010	240	Ipar Atlantikoa	45,71	-5,53	T
12	B11	Bizkaiko Golkoa	2011	31	Ipar Atlantikoa	44,92	-4,16	T
13	CAN	Kanariar uhartea	2012	41	Ipar Atlantikoa	27,73	-17,25	T
14 ^{A,B}	IRE	Irlanda	2008	57	Ipar Atlantikoa	54,17	-12,89	T
15	MAU	Mauritania	2010	48	Ipar Atlantikoa	9,79	-32,16	T
16	GUI	Gineako Golkoa	1999-2000	32	Hego Atlantikoa	1,98	-16,58	B
17	URU	Uruguai	2005, 2007-2012	84	Hego Atlantikoa	-36,19	-53,16	T
18 ^{A,B}	SCA	Hego Afrika	2009	98	Hego Atlantikoa	-24,56	4,42	T
19	SOA	Hego Afrika	2011	37	Hego Atlantikoa	-34,34	18,00	T
20 ^{A,B}	I08	Seychelleak	2008-2009	23	Indikoa	-7,11	54,65	T
21	I10	Seychelleak	2010	38	Indikoa	-7,27	56,32	T
22	I11	Seychelleak	2011	42	Indikoa	-7,28	49,06	T

23	I12	Seychelleak	2012	33	Indikoa	-8,86	49,13	T
24 ^{A,B}	NPA	Kalifornia	2008	83	Ipar Pazifikoa	43,50	-127,00	T
25 ^{A,B}	SEP	Kaledonia berria	2004-2005	51	Hego Pazifikoa	-19,01	-152,84	T
26 ^{A,B}	SWP	Polinesia frantsesa	2003-2008	33	Hego Pazifikoa	-18,53	165,97	T
1988-2012				Guztira= 1,331				

^A Aurretik Montes *et al.*-en (2012) aztertutako lagina. ^B Aurretik Albaina *et al.*-en (2013) aztertutako lagina. ^C Aurretik Davies *et al.*-en (2011) aztertutako lagina. ^D Aurretik Arrizabalaga *et al.*-en (2004) aztertutako lagina. ^E Aurretik Santiago & Arrizabalaga-n (2005) aztertutako lagina.



3.1. Irudia. Laginketa guneak. Gaur eguneko stock-en mugak lerro beltzez marraztuak ageri dira. Lagin izenak 3.1. Taularekin bat datoz

2.2. SNP selekzioa eta genotipazioa

454 (GS FLEX Titanium) eta HiSeq2000 (Illumina) teknologiak erabilita, transkriptomaren eta genoma sekuentziatuz, hegalaburrean aurkitutako SNPak erabili ziren ikerlan honetan (Cariani *et al.* komunikazio pertsonala). Hegalaburrean aurkitutako SNPen artean, 384 transkriptomako SNP GoldenGate plataforman (VeraCode) genotipatu ziren espeziearen banaketa osoa barnean hartzen zuten 30 hegaluze laginetan (5 indibiduo kudeaketa unitate bakoitzeko: ipar Atlantikoa, hego Atlantikoa, Mediterraneo itsasoa, ozeano Indikoa, ipar Pazifikoa eta hego Pazifikoa). 384 SNPetatik, hegaluzean arrakastaz anplifikatutakoak (konbertsio tasa) eta alelo txikiaren maiztasuna (MAF) 0,01 baino altuagoa erakusten zutenak baino ez ziren kontuan hartu. Hauetatik, TaqMan OpenArray teknologiarekin (Life Technologies) bateragarriak ziren markatzaileak hautatu ziren ikerlanerako. Gainera, hegaluzean aurretik deskribatutako bi SNP nuklear (Albaina *et al.* 2013; S3.1. Taula) gehitu ziren azkenengo SNP sortan kontrol positibo moduan, genotipazio

prozesuaren funtzionamendu egokia berresteko. Beraz, 117 SNPeko sorta finala diseinatu zen 1.331 hegaluze indibiduo Taqman OpenArray teknologiaren bidez genotipatzeko. Balioztatze tasa $MAF > 0,001$ zuten SNP proportzioaren arabera kalkulatu zen. Genotipazio kalitatea bermatzeko SNPek indibiduen %80a baino gehiago genotipatu beharko dute, genotipazio taldekapen argia eta Hardy-Weinberg orekan egotea (HWE).

2.3. Analisi estatistikoak

HWEkiko desbideratzea frogatzeko eta SNP arteko desoreka genotipikoa (GD) aztertzeko (p -balioa $< 0,001$) GENEPOP v4.0 (Rousset 2008) softwarea erabili zen. Lotutako SNPak haplotipotan batu ziren PHASE v2.1 softwarearen bidez (Stephens *et al.* 2001).

Hegaluzea populazioen egitura genetikoa ebaluatze aldera Reynolds distantzia genetikoan matrizeak (Reynolds *et al.* 1983) lortu ziren Populations v1.2.32 softwarearen bidez (Langella 2002). distantzia genetikoan matrizean oinarrituta Neighbor-Net (NN) dendrograma eraiki zen SPLITSTREE v4.13 (Hudson & Bryant 2008) softwarearen bidez. Distantzia geografikoa laginketa guneen arteko itsaso bidezko distantzia laburrena kalkulatu zen Movable Type Ltd web orriko (<http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>) scripten bidez. Distantzia bidezko isolamendua (IBD) Rousset-en distantzia genetikoa (Rousset 1996) eta distantzia geografikoaren arteko korrelazioa ebaluatuz frogatu zen IBDWS-eko (Jensen *et al.* 2005) Mantel testa erabilita 30 000ko zorizko banaketaren bidez. Populazioen egitura genetikoa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) eta GENELAND v3.2.2 (Guillot *et al.* 2008) bidez ere ebaluatu zen. Software hauek indibiduoak talde batera egokitzea ahalbidetzen duten taldekapen algoritmo Bayesianarretan oinarritzen dira populazio kopurua edo populazio mugak asumitu beharrik gabe. STRUCTURE askotariko leinu modeloa eta korrelaturiko maiztasun alelikoak (Falush *et al.* 2003) erabilita martxan jarri zen, laginketa guneetako informazioa kontuan hartuz. Hamar simulazio burutu ziren populazio kopuru potentzial (K) bakoitzerako, $K = 1-6$ balioetarako, 10 000 Markov-kate Monte Carlo (MCMC). K baliorik hoberena Pritchard *et al.*-ek (2000) proposatu bezala estimatu zen. CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) indibiduen taldekapen hoberena zehazteko erabili zen erreplika desberdinetako genotipo pareen arteko antzekotasuna maximizatuz. Taldekapen hauek DISTRICT 1.1 (Rosenberg 2004) bidez irudikatu ziren. Bukatzeko, aurkitutako talde nagusien barruan egituraketa ahulagoa frogatzeko, STRUCTURE analisiak talde bakoitzaren barnean burutu ziren. Populazioen egitura antzemateko STRUCTURE indibiduen genotipoetan soilik oinarritzen da GENELAND, ostera, indibiduen informazio geografikoa ere erabiltzen du analisisetarako parametro gehigarri legez. Kasu honetan K 1 eta 5 artean estimatu zen 500 000 MCMC iterazio eta 1000 argitzeren bidez. K finkatuarekin, hamar prozesamendu burutu ziren 50 000-ko “burn-in”-a aplikatuz indibiduo bakoitza eta eremu espazialeko pixel bakoitza populazio batera egokitze probabilitatea lortzeko.

Hautespenaren menpeko markatzaile hautagaiak (ezohiko markatzaileak) bilatu ziren probabilitate Bayesiarraren metodoa erabilia BAYESCAN v2.1 (Foll & Gaggiotti 2008) programaren bidez, 5000 errepikapeneko froga 10 frogaren bidez eta 50 000 errepikapeneko “burn-in” gehigarriarekin (5000 lagin tamaina eta 10eko argitze bitartekoa). Testerako balio kritikoak faltsuen aurkikuntza tasarekin (FDR) doitu ziren (q -balioak $< 0,05$) (Benjamini & Hochberg 1995). Markatzaile neutraletan oinarritutako lagin arteko binakako F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) balioak FSTAT v2.9.3 softwarearekin estimatu ziren (Goudet 2001). P-balioak frogaketa anizkoitzetarako FDR metodoa erabilia doitu ziren (Benjamini & Hochberg 1995).

Ikerlan honetan erabilitako SNP ekin askotariko desberdintzapen maila antzemateko beharrezko ahalmen estatistikoa POWSIM v.4.1 (Ryman *et al.* 2006). POWSIM 50 markatzailetara mugatua dagoenez, F_{ST} balio altuenak zituzten markatzaileak hautatu ziren. “Burn-in”-a 1000 urrats eta gero 1000 urratseko 100 sortaz osatu zen. Khi-karratu probabilitateak erabili ziren erreplika bakoitzaren F_{ST} balioaren esangarritasuna frogatzeko. 1000 erreplikako simulazioetan lortutako F_{ST} balio esangarri kopuruak, ahalmen estatistikoaren estimazioa emango du dibergentzia maila jakin baterako, zeinak belaunaldi kopuru zehatz batean zehar maiztasunen jitoa onesten duen. Simulatutako populazioaren tamaina efektiboa 2000 arrainekoa izan zen.

Bi eskala tenporal desberdinetarako N_e estimazioak eskuratu ziren ipar Atlantikoko stockerako. N_e garaikidea kohorte arteko alelo maiztasunen gorabehera tenporaletatik abiatuta estimatu zen (Waples 1989) eta belaunaldien gainjartzearen aurrean zuzenketa bat aplikatu zen (Jorde & Ryman 1995, 2007; Waples & Yokota 2007). Belaunaldi aldia (\hat{G}) Felsenstein-i (Felsenstein 1971) jarraituz estimatu zen aztertutako urteen (1988-2012) adinen maiztasunetik abiatuta, kohorte arteko alelo maiztasun aldaketa aldiz, F_S (Jorde & Ryman 2007) bidez estimatu zen. N_e historikoak (Beerli & Felsenstein 2001) teoria koaleszentean oinarritutako probabilitate maximoko estimatzailea erabiltzen du. Denboran atzerantz egiten du populazioen genetika modelo bidez komuneko arbasorik berriena (MRCA) bilatzeko, MRCA honetatik talde bateko indibiduo guztiak eratorri izan dira. Lanabes hau espezie ugariaren populazio tamaina historikoa estimatzeko erabili da (Gemmell *et al.* 2004).

Ipar Atlantikoko datuak 1988-2012 artean eskuratu ziren, hegaluzeak heldutasunaren %50a 5 urtean eskuratzen duela asumituz (Bard 1981), 4-5 belaunaldi suposatzen du denbora tarte honek. Adina, luzera eta pisu informazioa erabilia, Santiago-n (1993) eta Santiago & Arrizabalaga-n (2005) oinarrituta estimatu zen. Zazpi kohorteren adin egitura erabili zen (3.2. Irudia). Kohorte analisia populazio tamainako gorabehera tenporalak antzemateko burutu zen. Ipar Atlantikoko helduen populazio tamaina (N_e) ICCAT-en 2013ko ipar eta hego Atlantikoko stock-en ebaluazio txostenetik eskuratu zen, eta N_e estimazioekin konparatu zen. MIGRATE v3.2.1 softwarea (Beerli 2002) N_e historikoa kalkulatzeko erabili zen alelo infinitoen modeloa ezarriz mutazio tasa legez.

	0	1	2	3	4	5+
1988	-	-	34	-	-	-
1989	-	-	30	-	-	-
<hr/>						
2009	-	42	-	-	-	-
2010	-	33	41	70	28	28
2011	-	-	-	31	-	-
2012	-	-	-	19	21	-

3.2. Irudia. Definitutako kohorteen diagrama, indibiuoen adinean oinarrituta Zutubeek indibiduen adina adierazten dute eta ilarek harrapaketa urtea. Taula barruko balioek indibiduo kopuruak dira urte/adin konbinaziorako. Zazpi kohorte definitu ziren lau diagonalen bidez, hauen izenak indibiduen jaioturtean oinarritzen dira: C86, C87, C05, C06, C07, C08 eta C09

3. Emaizak

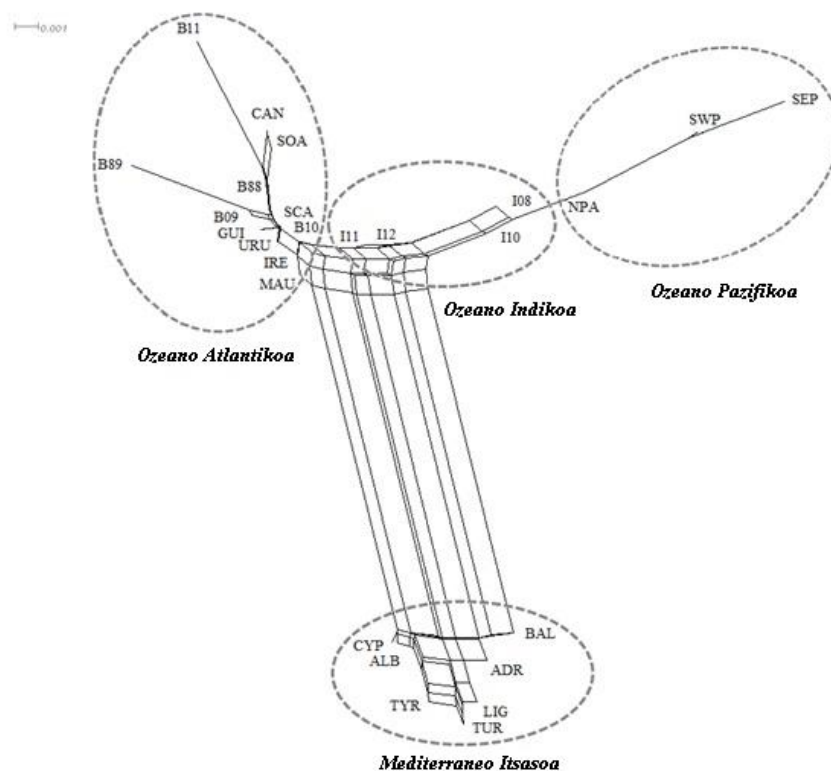
3.1. SNP aukeraketa eta genotipazioa

30 hegaluze laginetan aztertutako Hegalaburreko 384 SNPetik 311 SNP (konbertsio tasa = %80,99) modu arrakastatsuan anplifikatu ziren hegaluzean, eta hauen artean 121ek erakutsi zuten $MAF > 0,01$ (%31,51). Azken hauetatik 115 SNP ziren bateragarriak TaqMan OpenArray teknologiarekin (Life Technologies) eta genotipatu egin ziren kontrol positibo moduan gehitu ziren 2 SNP nuklearrekin batera.

117 SNP nuklearretatik 95 polimorfikoak (MAF balioa 0,001 baino altuagoa, hau da, alelo txikiena 5 aldiz behatu zen) eta 1.331 hegaluze indibiduoentzat genotipazio argikoak ziren (S3.1. Taula). Beraz, balioztapen tasa %24,61ekoa (95/386) izan zen. Hauetatik 76k HWE-n zeuden. Desoreka genotipikoaren (GD) froga zehatzek 2 SNP (ss974292126 eta ss974292127) GD probabilitate esangarrian zeudela antzeman zuten, hortaz, 2 SNP hauek haplotipo bakarria sortuz lotu ziren (ss974292126+ss974292127). Ondorioz, 75 markatzaile nuklear independenteko sortatik abiatuta aztertu ziren laginak.

3.2. Populazio egitura

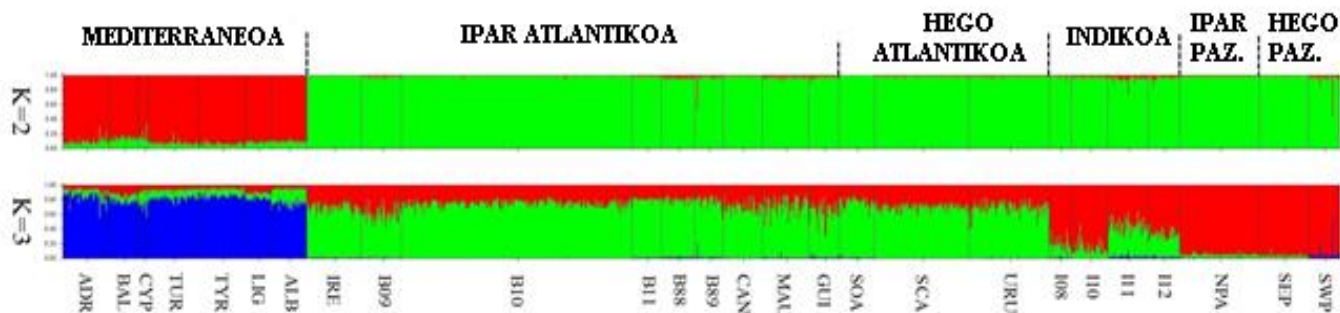
Reynolds distantzia genetikoetan oinarritutako Neighbor-Net-ak (3.3. Irudia) laginketa guneak taldekatu zituen haien eremu geografikoen arabera. Mediterraneo itsasoko laginak, talde bakarrean batuta, gainontzekoekiko urrutikoenak ziren. Hiru ozeanoetako laginak ere ozeanoka taldekatu ziren, eta Indikoko laginak Atlantiko eta Pazikoen artean kokatu ziren. Distantzia genetiko eta geografikoek korrelazio esangarria ($r = 0,4577$, $p < 0,0001$; S3.1. Irudia) ageri zuten 26 laginentzako. Korrelazio hau areagotu egin zen Mediterraneoeko laginak analisitik baztertzean ($r = 0,7549$, $p < 0,0001$; 19 laginketa gune). Mediterraneo barnean ez zen korrelaziorik antzeman distantzia genetiko eta geografikoen artean ($r = -0,3210$, $p = 0,0954$; S3.1. Irudia).



3.3. Irudia. Neighbor-Net dendrograma 26 laginen arteko Reynolds distantzietan oinarrituta eraikia. Laginketa guneen laburdurak 3.1. Taulan bezala definituta.

STRUCTURE softwarearen bidezko indibiduen taldekapen analisiari dagokionez, 2 taldeko ($K=2$) taldekapena kontuan hartu zenean Mediterraneo itsasoaren eta gainontzekoen arteko desberdintzapen argia nabarmendu zen (3.4. Irudia). Dena dela, K baliorik onena 3 izan zen (S3.2a. Irudia), ozeano Pazifikoko laginak (gorritz) erraz asko bereizten ziren Atlantikoko laginengandik (berdeak nagusiki; 3.4. Irudia) kasu honetan. Ozeano Indikoko laginen kasua berezia da, Atlantikoko eta Pazifikoko osagaien bitarteko portzentajeak ageri baitituzte. Era berean, GENELAND softwareak ere $K=3$ antzematen du talde kopuru probableena (S3.2b. Irudia). Azterketa honetan, 3 taldekapen osatu ziren: Mediterraneoeko laginak (1. taldea), Atlantikoko laginak (2. taldea) eta Indo-Pazifikoko laginak (3. taldea). STRUCTURE analisia talde bakoitzean

banaka errepikatu zenean ez zen egiturarik antzeman hauen barnean, izan ere K balioa 1 izan zen kasu guztietan.



3.4. Irudia. STRUCURE bidezko indibiduen taldekapan analisisiko K=2 eta K=3. Zutabe bertikal

bakoitzak indibiduo bat irudikatzen du eta 26 laginketa guneak lerro jarrai beltzez banatuak ageri dira, gaur eguneko stock-ak aldiz, lerro jarrai beltz etenez. Zutabe bakoitzeko kolore proportzioak talde bakoitzeko kideztaren frakzioa adierazten du indibiduo bakoitzean. estimated membership fractions of each of the clusters. Laginketa guneen laburdurak 3.1. Taulan bezala definituta.

75 markatzaile independenteetatik 17 ezohiko gisa identifikatu ziren, beraz, 58 SNP neutral definitu ziren. 58 SNP neutraletan oinarrituta, stock bakoitzean burututako heterogeneotasun azterketak agertu zuen RFMOek definitutako 6 stockak homogeneousak zirela ($p > 0,05$; 3.2. Taula). POWSIM simulazioek erakutsi zuten F_{ST} balio altuenak zituzten 50 SNPak batera gai zirela lagin arteko desberdintasun esangarriak antzemateko $F_{ST} = 0,0015$ balioarekin frogen %95 inguruan, eta $F_{ST} = 0,002$ balioarekin frogen %100ean (3.3. Taula). Stock arteko F_{ST} balioak ipar eta hego Atlantiko arteko $F_{ST} = 0,001$ minimoaren eta hego Pazifiko eta Mediterraneoaren arteko $F_{ST} = 0,051$ maximoaren artean kokatzen dira. Konparazio guztiak estatistikoki esangarriak ziren, ipar eta hego Atlantikoaren arteko, ipar eta hego Pazifikoaren artekoa eta ipar Pazifiko eta Indikoaren artekoa ez (3.2. Taula).

3.2. Taula. Binakako F_{ST} balioak (diagonalaren azpitik) eta p -balioak (diagonalaren gainetik) RFMOek gaur egun aitortzen dituzten 6 stock-en artean. Stock laburdurak: MED (Mediterraneo), NATL (ipar Atlantikoa), SATL (hego Atlantikoa), IN (Indikoa), NPAC (ipar Pazifikoa) and SPAC (hego Pazifikoa). Stock-en barneko laginketa guneen arteko F_{ST} balioak diagonalean aurkitzen dira grisez eta bat bera ere ez da esangarria (p -balioak $> 0,05$).

	MED	NATL	SATL	IN	NPAC	SPAC
MED	0,003	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
NATL	0,035*	0,004	0,783	<0,001*	<0,001*	<0,001*
SATL	0,033*	0,001	0,000	<0,001*	<0,001*	<0,001*
IN	0,038*	0,010*	0,008*	0,002	0,125	0,038*
NPAC	0,049*	0,025*	0,022*	0,002	-	0,405
SPAC	0,051*	0,026*	0,023*	0,003*	0,001	0,004

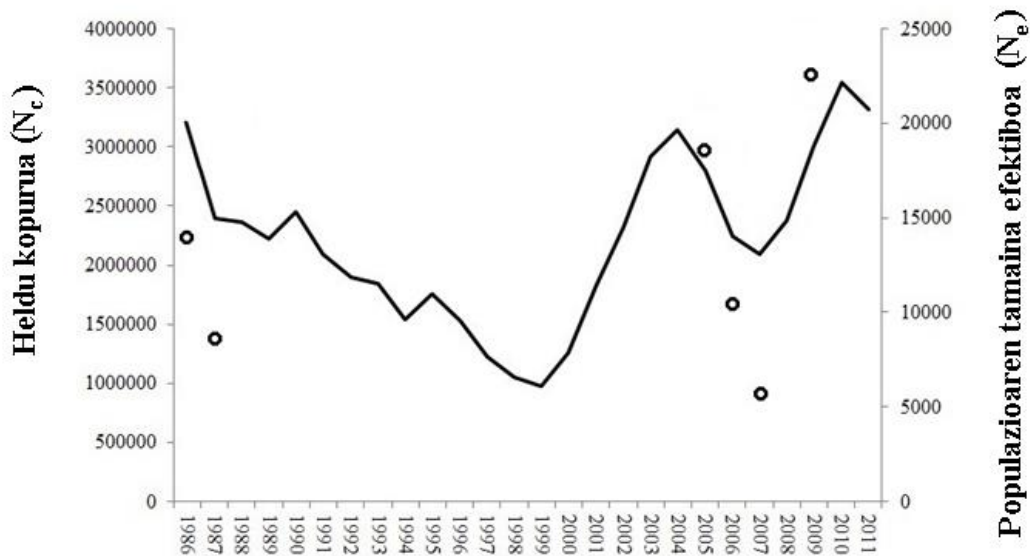
Populazioen inguruko baldintza espezifikoezeko egokitzapenari dagokionean, BAYESCAN bidez ezohiko gisa identifikatu ziren 17 markatzaileak aztertu ziren. Definitutako ss974292126+ss974292127 haplotipoak alpha balio positiboa eta F_{ST} balio altu nabarmena zituen, honek adierazten zuen hautespen dibergentearen menpe egon zitekeela (Foll & Gaggiotti 2008). Haplotipo hau ia monomorfikoa zen Mediterraneoan kanpoko laginetan ($f_{CC} = 0,999$ and $f_{CA} = 0,001$), Mediterraneoan, aldiz, nabarmenki desberdinak dira ($f_{TA} = 0,127$; $f_{CC} = 0,819$; $f_{TC} = 0,016$; $f_{CA} = 0,038$; $F_{ST} = 0,311$; $p < 0,0001$). Gainontzeko 16 ezohiko SNPak alpha balio negatiboak eta F_{ST} balio baxu nabarmenak zituen, hautespen orekatzailearekin bateragarriak (S3.3. Irudia). Oinarrizko bidezidor metabolikoetan parte hartzen duten gene hautagaiekin eta teleosteen gene ezagunekin ageri zuten homologia 18 ezohiko SNPen inguruko sekuentziek (S3.2. Taula).

3.3. Taula. Populazio artean desberdintzapen maila (F_{ST}) jakin bat antzemateko probabilitatea.

F_{ST}	$P\chi^2$
0,0005	0,351
0,0015	0,952
0,0020	0,999
0,0025	1,000
0,0050	1,000

3.3. Populazioaren tamaina efektiboa

Populazioaren tamaina efektiboa (N_e) ipar Atlantikoko ozeanorako estimatu zen 58 SNP neutral erabilita. N_e garaikideak 5.466 eta 23.330 arteko balioak ditu (C07 eta C08 kohorteak hurrenez hurren) (batez besteko N_e garaikidea= 13.267 ± 6.049 ; S3.3. Taula), N_e historikoa, aldiz, 13.897 eta 20.304 artean dabil (C08 eta C06 kohorteak, hurrenez hurren) (batez besteko N_e historikoa= 16.729 ± 2.248 ; S3.4. Taula). N_e garaikidearen eta historikoaren batez besteko balioen arteko aldea ez zen esangarria (Mann-Whitney U, p -value $> 0,05$). N_e garaikidea eta N_c -arekin alderatu zen (3.5. Irudia) eta N_e/N_c proportzioa (tamaina efektiboaren eta tamaina zentsalaren arteko proportzioa) balioak $2,62 \times 10^{-3}$ eta $9,83 \times 10^{-3}$ artekoak ziren (C07 eta C08 kohorteak hurrenez hurren). N_e eta N_c arteko ageriko korrelazioa bada ere, estatistikoki ez da esangarria ($r = 0,383$; p -value = 0,453).



3.5. Irudia. Heldu kopuruaren eboluzioaren estimak 1986tik 2011ra (lerro jarraia, N_c), eta kohorte bakoitzaren populazioaren tamaina efektibo garaikidea ipar Atlantikoan (puntuak, N_e).

4. Eztabaida

Arrantzegien kudeaketa jasangarriak stock bakoitzean populazio bakarra ustiatzea eta populazio tamainaren estimazio zehatza eskatzen du (Hauser & Carvalho 2008). Beraz, espezie barneko dibertsitatea murrizten duten ekiditen dira: gehiegizko ustiaketa eta populazio txikienak galtzeko aukera hainbat populazio stock baten barnean ustiatzen direnean. Ikerlan hau orain arte burutu dien hegaluzearen mundu mailako genetikaren inguruko lanik sakonena da. Guztira 117 SNP berri aplikatu ziren espeziearen banaketa osoko 26 laginketa gunetako 1.331 hegaluze indibiduotan. Espeziearen egitura genetikoa deskribatu, ipar Atlantikoko ozeanoko populazioaren tamaina efektiboa estimatu eta hegaluzearen genomaren hautespen naturalaren ustezko zantzuak azaldu dira lan honetan. Lortutako emaitzek adierazi dute gaur egun definitzen diren 6 stock-etatik batek ere ez du populazio genetikoa bat baino gehiago. Populazioaren tamainari dagokionean, N_e estimazioek ipar Atlantikoko populazioan botila lepo historiko garrantzitsuak gertatu izana baztertzen dute, eta erakusten dute egungo dibertsitate maila denboran jasangarriak direla, modu horretan berretsi egiten da hegaluzearen moldakortasuna eta erantzuteko gaitasuna. Hegaluze populazioen ezaugarri genetikoen gaineko emaitza guzti hauek lagungarriak izan beharko lukete arrantzegien kudeaketa politika eta programa zentzudun eta jasangarriagoak bultzatzeko.

4.1. SNPen espezie arteko amplifikazio gurutzatua

Ikerlan honek espezie arteko amplifikazio gurutzatua hegaluzean SNPak identifikatzeko hurbilketa baliagarria dela erakutsi du, %24,61eko bukaerako balioztatze tasarekin. Alderantzizko gurutzamendua Albaina *et al.*-ek (2013) plazaratu zuten, hauek hegaluzeak eta hegalaburrak SNPen

%18a partekatzen zutela deskribatu zuten. Atlantikoko sardinazarraren (*Clupea harengus*) eta Pazifikoko sardinazarraren (*Clupea pallasii*) arteko anplifikazio gurutzatuaren arrakasta are eta baxuagoa izan zen, %12koa (Helyar *et al.* 2012) hain zuzen ere. Ikerlan honetan lortutako arrakasta erabilitako indibiduo kopuruan eta hauen jatorri geografikoaren aniztasunean datza. Lan honetan 1.331 hegaluze indibiduo aztertu ziren, Helyar *et al.*-ek (2012) eta Albaina *et al.*-ek (2013), ostera, lau Pazifikoko sardinazarrak eta 107 hegalabur ikertu zituzten hurrenez hurren. Anplifikazio gurutzatua SNP sorta egokia diseinatzean ere oinarritzen da, ikerlan honetako eskualde kodetzaileko 384 SNPak bezala. Genomako eskualde kontserbatuetan, eskualde kodetzaileak esate baterako, bi espezieetan aztertutako sekuentzien antzekotasuna oso altua da eta beraz, SNP berdinak izateko aukera ere handia izango da.

Espezie arteko anplifikazio gurutzatua espezie ez ereduetan SNPak identifikatzeko hurbilketa baliagarritzat jotzen da. Gainera, SNP hauek geneetan kokatzen direnean, ikerlan honetako kasuan bezala, inguruarekiko egokitzapen ikerketan erabil daitezke. Honen harira, ss974292126+ss974292127 SNP haplotipoa BAYESCAN bidezko analisiak ezohiko markatzailetzat jo zuen, Mediterraneoan oso polimorfikoa zen, hiru ozeanoetan aldiz, ia finkatuta ageri zen. Lan honetako ss974292126+ss974292127 SNP haplotipoaren emaitza hautespen dibertsifikatzailearen ereduaren adierazgarri garbia da. Moldagarritasunaren ikuspuntutik emaitza honek Mediterraneoan inguru desberdin bat deskribatzen du hiru ozeanoen homogeneotasunaren aldean. Zoritzarrez, ez zen homologiarik topatu teleosteen gene ezagunen artean (S3.2. Taula). Bestalde, 16 ezohiko SNPek homogeneotasun maila altuak erakutsi zituzten. Seguruena hautespen orekatzaile egoerak SNP hauek hegaluzearen ondare genetikoan mantentzea ahalbidetuko zuen. Izan ere, 18 SNPen inguruko sekuentzien azterketak oinarritzko bidezidor metabolikoetan parte hartzen duten 13 gene hautagai agertu zituen. Hala ere, beste azalpen posible batzuk ezin dira baztertu, hala nola markatzaile hauen bariazio murriztua izatea populazio guztietan alelo txikiena arraroa bada, edo agian faltsu positiboak izan daitezke. Itsas inguruko datu-base genomikoen emendatze azkarrak auzi hauek argitzea ekarriko du etorkizun hurbilean.

4.2. Populazioen egitura genetikoa

Ikerlan honetan ezagutarazi den egitura genetiko fidagarria da lagin tamaina handian eta banaketa espazial eta tenporal zabaleko laginketan oinarrituta dago eta. Bestalde, POWSIM simulazioek erakutsi dute F_{ST} balio altuenak dituzten 50 SNPek batera II motako hutsegite (benetako desberdintasunak antzematean huts egitea) tasa %0koa da $F_{ST}= 0,002$ edo handiagoko balioetan. Laburbilduz, espazio-tenporalki homogeneoak ziren 4 populazio identifikatu ziren hegaluzean: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, ozeano Indikoa eta ozeano Pazifikoa (3.2. Taula). STRUCTURE analisiak taldekaperen bakoitzean egin zirenean (Mediterraneo, Pazifikoa eta Atlantikoa), ez zen egiturarik aurkitu. Emaitza honek Albaina *et al.*-ek (2013) deskribatutakoa berresten du. Aitzitik, beste egile batzuek mikrosateliteen bidez (Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012), errute-gune desberdinduen existentzian (Marano *et al.* 1999) edo konposizio isotopiko

desberdintzapenean (Goñi *et al.* 2011) oinarrituta proposatutako Mediterraneo barneko heterogeneotasuna ez zen SNPen bidez antzeman. Mediterraneo barnean ez zen korrelazio esangarririk topatu distantzia geografiko eta genetikoen artean. Ikerlan honetako emaitzek, mikrosatelite markatzaile bidez (Takagi *et al.* 2001; Montes *et al.* 2012) edo migrazioak, errutegune eta sasoiak aztertuz (Lewis 1990) ozeano Pazifikoan heterogeneotasuna iradokitzen dituzten ikerlanak ezeztatzen dituzte. Bukatzeko, ozeano Atlantikoaren egitura genetiko homogeneoa deskribatu zen, emaitza hau odol-taldeeetan (Arrizabalaga *et al.* 2004), mikrosateliteetan (Takagi *et al.* 2001; Davies *et al.* 2011) eta migrazio ezaugarrietan (Arrizabalaga *et al.* 2004; Ortiz de Zárate & Cort 1998) oinarritutako lanen emaitza eta interpretazioekin kontraesanetan dago. Berez, hegaluzearen gaineko markaketa esperimentuak oso urriak dira, Atlantiko hegoan, Indikoan eta Mediterraneoan barrena batez ere. Horregatik, informazio eskasa dago jokabide migratzailearen gainean, eta eskuragarri dauden datuak ez dira populazioen egitura eta nahasketen inguruan oso informagarriak. Bestalde, tamalez, ezagutza urria dago hegaluze populazioen errute-gune eta sasoiaren gainean (Ueyanagi 1969), honek zaildu egiten du ikerketa genetikoetarako jatorri ezaguneko erreferentzia laginak jasotzea (larbak edo urteko gazteak, adibidez). Migratzaile iragankorrak izan daitezkeen laginak erabiltzeak, printzipioz, populazioen egitura okerra irudika dezake (esate baterako, Mediterraneoan homogeneotasuna iradoki dezake nolabaiteko egituraketa egonda ere). Arazo potentzial honek, gehiago eragiten du eskala txikian eta gutxiago arro ozeaniko edota hemisferio mailako eskaletan. Hegaluzearen errute-gune eta sasoiaren inguruko jakintza berriek, eta baita erreferentzia laginak eskuratu ahal izateak ere, populazio egitura eta eskala txikiagoko nahasketa mailak ezagutzeko esperimentu genetiko sendoagoak ahalbidetuko lukete.

Ikerlan honen eta mikrosateliteak erabiltzen dituztenen arteko desadostasunei dagokionean, eta markatzaileen ahalmen estatistikoaren inguruan, SNP markatzaile bakar batek mikrosatelite alelo-anitz batek baino ahalmen txikiagoa izan (Haas & Payseur 2011), 4-12 SNP nuklearrek mikrosatelite baten ahalmen berdina omen dute (Guichoux *et al.* 2011). Bestalde, SNP markatzaileek beste markatzaileekin alderatuz gero zenbait abantailak dituzte: PCR produktu txikiko (60–80 bp) hodi-bakarreko saio anizkoitza erabiltzeak kalitate hobeko datuak modu eraginkorrean sortzea ahalbidetu dezake, zenbait mikrosatelite genotipatzeak sortzen dituenak baino, gainera SNPak erabiltzeak genoma osoko ordezkapen zabala eta markatzaile arteko bariantza murriztu izatea ziurtatzen du (Morin *et al.* 2004).

Ikerlan honetan SNP neutralen bariazioak (3.2 Taula; 3.3. eta 3.4 Irudiak) eta hautespenaren menpeko SNP haplotipoak Mediterraneoan gainontzekoekiko desberdinena zela erakutsi zuten. Modu berean, *G6PD* markatzaileak eta D-Loop sekuentzia mitokondrialen maiztasun guztiz desberdinak deskribatu zituzten Mediterraneoan eta Atlantikoko laginen artean Nakadate *et al.*-ek (2005), fluxu genetiko murriztuaren adierazgarritzat jo zuten. Gure emaitzak honekin bat datoz, izan ere Mediterraneoan eta gainontzeko populazioen arteko F_{ST} balioak altuenak baitira, 0,033 eta 0,051 artean (3.2. Taula). Mediterraneoan populazioaren isolamenduaren aldean gainontzeko hiru populazioen arteko fluxu genetiko altuagoa da. Berez, hiru ozeanoa batera aztertzean, distantzia

genetiko eta laginketa guneen distantzia geografikoen artean korrelazioa topatu zen ($r = 0,7549$; p -value $< 0,0001$; S3.1b. Irudia), Atlantikoko sardinzarrerako deskribatu zen modu berean (Ruzzante *et al.* 2006). Nahiz eta beste espezie batzuk (hegalburra eta ezpata-arraina (*Xiphias gladius*) adibidez (Block *et al.* 2005; Alvarado Bremer *et al.* 2005; Aranda *et al.* 2013)) Gibraltar itsasartetik migratzen dutela ezaguna izan, hegaluzerako migrazio hau hutsala da (Arrizabalaga *et al.* 2004; Nakadate *et al.* 2005). Ikerlan honetako emaitzek eta bestelako metodologiak, esate baterako, markatzaile genetikoak (Viñas *et al.* 2004; Nakadate *et al.* 2005; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012; Albaina *et al.* 2013), hazkuntza parametroak (Megalofonou 2000) eta markaketa experimentuak (Arrizabalaga *et al.* 2004) erabiltzen dituzten lanek Mediterraneoan hegaluzearen singularitasuna baieztatzen dute. Zaila da ebaluatzea Mediterraneoan ageri duen berezitasuna gaur eguneko fluxu genetiko murrizaren ondorio soila den edo agian Mediterraneoan hegaluzearen historia demografikoa erakusle ere ote den. Kettle *et al.*-en (2011) arabera Mediterraneoan babeslekua izan zen espezie itsastar ugariarentzat azkeneko maximo glaziarrean (LGM). Azken hipotesi honetan oinarrituta, Mediterraneoan populazioa fundatzaile efektu handi baten ondorioa izan zen eta denbora luzez gainontzeko populazioekiko isolatuta egon zen. Antzeko egoera proposatu da Atlantikoko sardinzarrerako itsaso Baltikoan (Gaggiotti *et al.* 2009). Atlantikoko eta Pazifikoko populazioekiko Indikoko hegaluze populazioaren lotura eztabaidagarria argitze aldera Atlantikoko 12 gunetako 774 indibiduo, Pazifikoko hiru gunetako 167 indibiduo eta Indikoko lau gunetako 136 indibiduo osatutako laginketa zabala aztertu genuen. Emaitzek Indikoko laginak ipar Pazifikokoetatik genetikoki gertu zeudela erakutsi zuten, hauen arteko F_{ST} balio ez esangarri bakarrak baitziren (3.2. Taula). Gure lanak Indikoko hegaluzearen laginketa zabalarekin, baieztatu egiten ditu Albaina *et al.*-ek (2013), SNPekin eta 24 indibiduoeko Indikoko laginarekin, lortutako emaitzak. Azken lagin hau Montes *et al.*-ek (2012) mikrosateliteekin aztertu zituen eta emaitza desberdinak lortu zituen, izan ere, Indikoko hegaluzea Pazifikokoarena baino, Atlantikoaren antza handiagoa zuela adierazi zuten zortzi mikrosateliteek. Kasu honetan emaitzak desbideratuak egon litezke oso polimorfikoak diren markatzaileak lagin txiki batean aztertu direlako. Edozein kasutan ere, honako lan honek Indikoko hegaluzeak Atlantikoko eta Pazifikoko osagai genetikoak dituela adierazten du STRUCTURE (3.4. Irudia) eta GENELAND analisisien arabera. Hau da, Esperantza Oneko lurmuturrak ez da fluxu genetikorako langa definitiboa, beste egile batzuk deskribatu dutenez (Chow & Ushiyama 1995; Arrizabalaga *et al.* 2004; Montes *et al.* 2012).

4.3. Populazioaren tamaina efektiboa

Hegaluzeak gehiegizko ustiaketa pairatzen du eta bere biomasa gutxitzen hasi zen orain dela hiru hamarkada. Arrantzategi datuetan oinarritutako tunidoen kudeaketak ez dira oso ziurrak (ikus Fromentin *et al.* 2014), eta hegaluzea ez da salbuespena (Arrizabalaga *et al.* 2007; ICCAT 2014). Hegaluzeak, itxuraz, populazio handiak dituen espeziea da, hala ere, jito genetikoak eta odolkidetasunak tamaina zentsalek iradokitzen dutena baino eragin handiago izan dezakete (Poulsen *et al.* 2006; Hare *et al.* 2011). Kasu honetan, kudeaketak egokiak tipikoki populazio dinamikaren oinarritzko informazioak gomendatzen duen baino tamaina zentsal askoz handiagoa mantentzea

beharrezkoa da (Hare *et al.* 2011). Honako hau gehiegi ustiatutako populazioetara lotutako arazoa da: arrantza presio altuak botila lepa genetikoak eragiten ditu (Hauser *et al.* 2002; Hutchinson *et al.* 2003). Hala izatekotan ondorio larriak izan ditzake kudeaketa prozeduretan (Poulsen *et al.* 2006; Hare *et al.* 2011; Therkildsen *et al.* 2010). Beraz, kudeaketa jasangarrirako N_e estimatzea aukera ona da, honek efektu genetikoak espeziearen bizi zikloarekin integratzen baititu, populazioaren egungo eta etorkizuneko bideragarritasunaren iragarpena baimentzen baititu (Hare *et al.* 2011). Ikerlan honetako populazio genetikako analisiek ez zuten erakutsi fluktuazio espazial edo tenporalik definitutako lau populazioetan. Emaitza honek adierazten du (1) migrazioak huts egin duela eskualde bakoitzeko maiztasun alelikoak aldatzeko orduan, eta (2) eskualde bakoitzeko populazioaren tamaina efektiboa jito genetikoak eragindako mikrodesberdintzapen prozesua geldiarazteko bezain handia da. Azken hipotesi hau ipar Atlantikoko ozeanoko populazioan frogatu zen; populazio honetan lortutako antzerako N_e garaikide eta historikoaren estimazioek adierazten dute arrantzak biomasan (N_c) eragina izanda ere, aniztasun genetikoak altu jarraitzen duela, eta beraz, populazioaren bideragarritasunean ez du eragin, hau da, populazioak ez du botila lepo eragin historiko larriarik jasan.

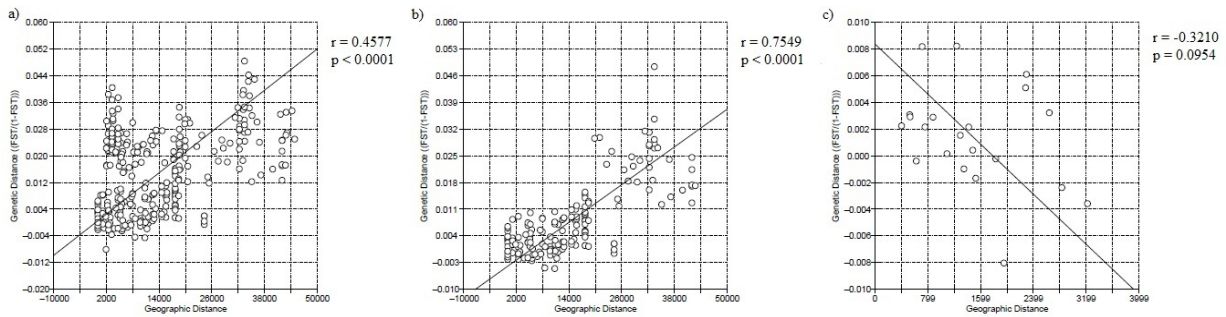
Arrantzategien kudeaketaren ikuspuntutik N_e garaikidearen estimazioak populazioen egoeraren arrantzarekiko adierazle independenteak izan daitezke. Mota honetako adierazlearen aldaketa tenporalak ustiatutako hegaluzearen aniztasun genetikoaren iragarpen-markatzaile izan daitezke, eta modu honetan, ondo antolatutako kudeaketa erantzunak piztuko lituzke aniztasunaren jaitsiera gertatzerakoan (esate baterako, arrantza esfortzuen murrizketa zorrotza aniztasun genetiko berreskuratu arte). Kudeaketak maiz arau sinpleetara jo behar du, esate baterako 50/500 irizpidea aniztasun genetiko mantentzeko; honek esan nahi du $N_e \geq 50$ beharrezkoa dela odolkidetasunaren ondorio kaltegarriak ekiditeko, eta N_e garaikidea ≥ 500 beharrezkoa dela inguruaren aldaketei aurre egiteko ezintasunetik eratorritako espeziearen desagerpena ekiditeko. Arau hau kontutan hartuta, ikerlan honetako emaitzek frogatzen dute bai odolkidetasunaren ondorioei eta baita moldatze gaitasunari ere aurre egiteko tamaina nahikoa duela ipar Atlantikoko hegaluze populazioak. Kudeaketaren helburuak lortzeko, N_e estimazioek egokituak egon behar dute hobeto uler dadin eragile ekologikoek zelan eragiten duten N_e/N_c ratioa txikiagotzea edo handitzea. Honi dagokionez, teoriak iradokitzen du populazio basatietan N_e/N_c ratioek 0,1etik gora egon behar dutela (Nunney & Campbell 1993; Frankham 1995; Vucetich *et al.* 1997), eta hainbat populazio basati ez-itsastarren ebidentziak bat datoz iragarpen honekin, 0,10 eta 0,14 arteko N_e/N_c ratioak erakusten baitituzte (Frankham 1995; Palstra & Ruzzante 2008). Ipar Atlantikoan helduen tamaina zentsala populazioaren tamaina efektiboaren halako hiru zen (S3.3. Taula). Estimazio hauek beste arrain espezieetan estimatutakoaren mailan daude, adibidez *Sciaenops ocellatus* (Turner *et al.* 2002), *Pagrus auratus* (Hauser *et al.* 2002) eta *Sebastes cramerii* (Gomez-Uchida & Banks 2006). N_e/N_c ratio apala hegaluze larba eta errekrutatze aurreko hilkortasun tasa handiek eragindako biziraupenaren diferentziek azaldu dezakete (Whitlock & Barton 1997; Nunney 1999), honek adierazten du heldu gutxi batzuek soilik egiten dute ekarpena belaunaldi bakoitzean. Zalantzan jarri da populazio tamaina efektibo handiko espezieetan N_e datu tenporaletan oinarrituta estimatzearen

egokitasuna (Poulsen *et al.* 2006) eta baita ere ea N_e/N_c ratioek sistema biologikoen benetako dinamika erakusten ote duten (Flowers *et al.* 2002; Therkildsen *et al.* 2010). Hala ere, garrantzitsua da ulertzea zein puntura arte diren galera genetikoarekiko kalteberak arrain populazioak, eta honen harira, ikerlan honetako markatzaileek aditzera ematen duten egonkortasun tenporalak etorkizunean hegaluzean N_e/N_c ebaluatzeko eta N_e -a monitorizatzeko oinarri garrantzitsua suposatzen du. Ondorioz, arrantzategiekiko ugaritasun-indize independente legez, N_e estimazioa, kudeaketa jasangarria lortze aldera, arrain populazioen egoera monitorizatzeko lanabes osagarri oso baliagarria da.

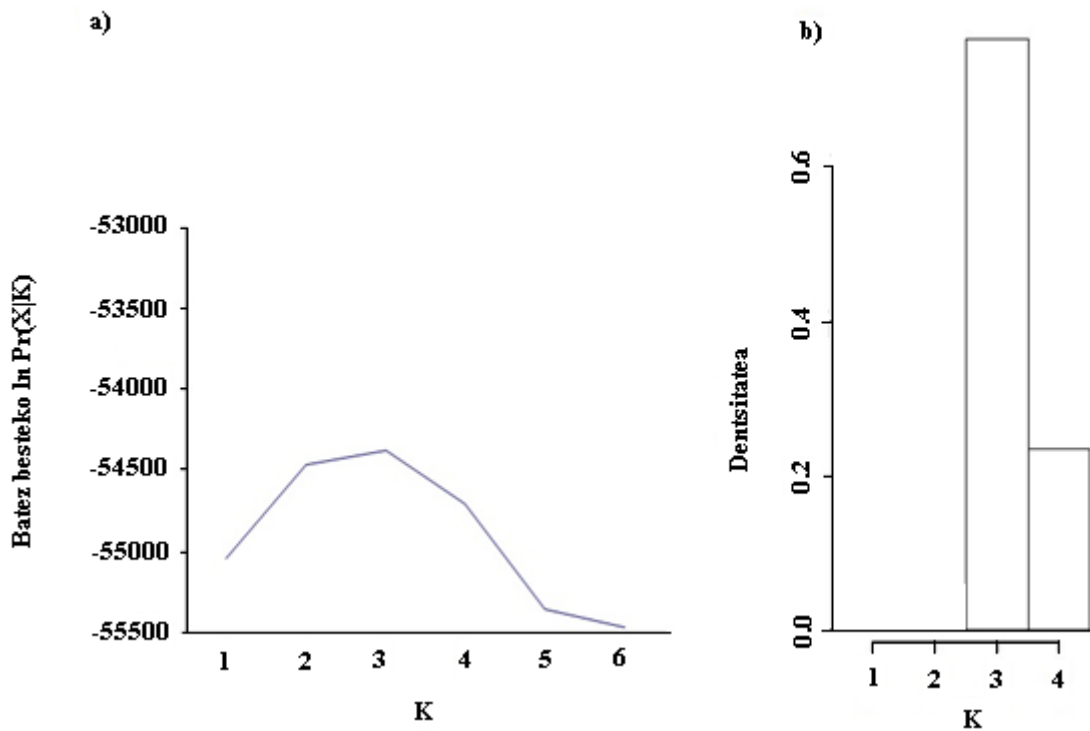
Esker onak

Egileek UPV/EHU-ko SGikerren giza babesa eta teknikoa eskertzen dute. Hurrengo institutuei eskertzen diegu laginak emateagatik: South African Institute for Aquatic Biodiversity (SAIAB, Hego Afrika), Galway-Mayo Institute of Technology (GMIT, Irlanda), Instituto Español de Oceanografía (IEO, Espainia). Eskerrik asko ere E. Jimenez, M.A. Pardo, I. Fraile, I. Arregi, J. Lopez, J. Filmarter, J. Areso, A. Delgado, D. Brophy, K.Schaefer, D. Fuller eta V. Allain laginketan laguntzeagatik. Ikerlan hau Eusko Jaurlaritzak ATM2010Hegaluze (351BI20090047) eta TUNASNIP (SPE10UN92) proiektuen bidez babestu du. Urtzi Laconcharen lana *Iñaki Goenaga - Zentro Teknologikoen Fundazioaren (IG-ZTF)* doktoretza bekak lagundu du. ICCAT-eri gure eskerrak luzatzen dizkiogu hegalabur SNPen (GBYP PHASE2 proiektua) identifikazioa finantzatzeagatik, eta GBYP kontsortzioko kideei hauek helaraztea aplikazio gurutzatuan erabiltzeko. Eskuizkribua bi aztertzaile ezezagunen komentarioei esker hobetu zen.

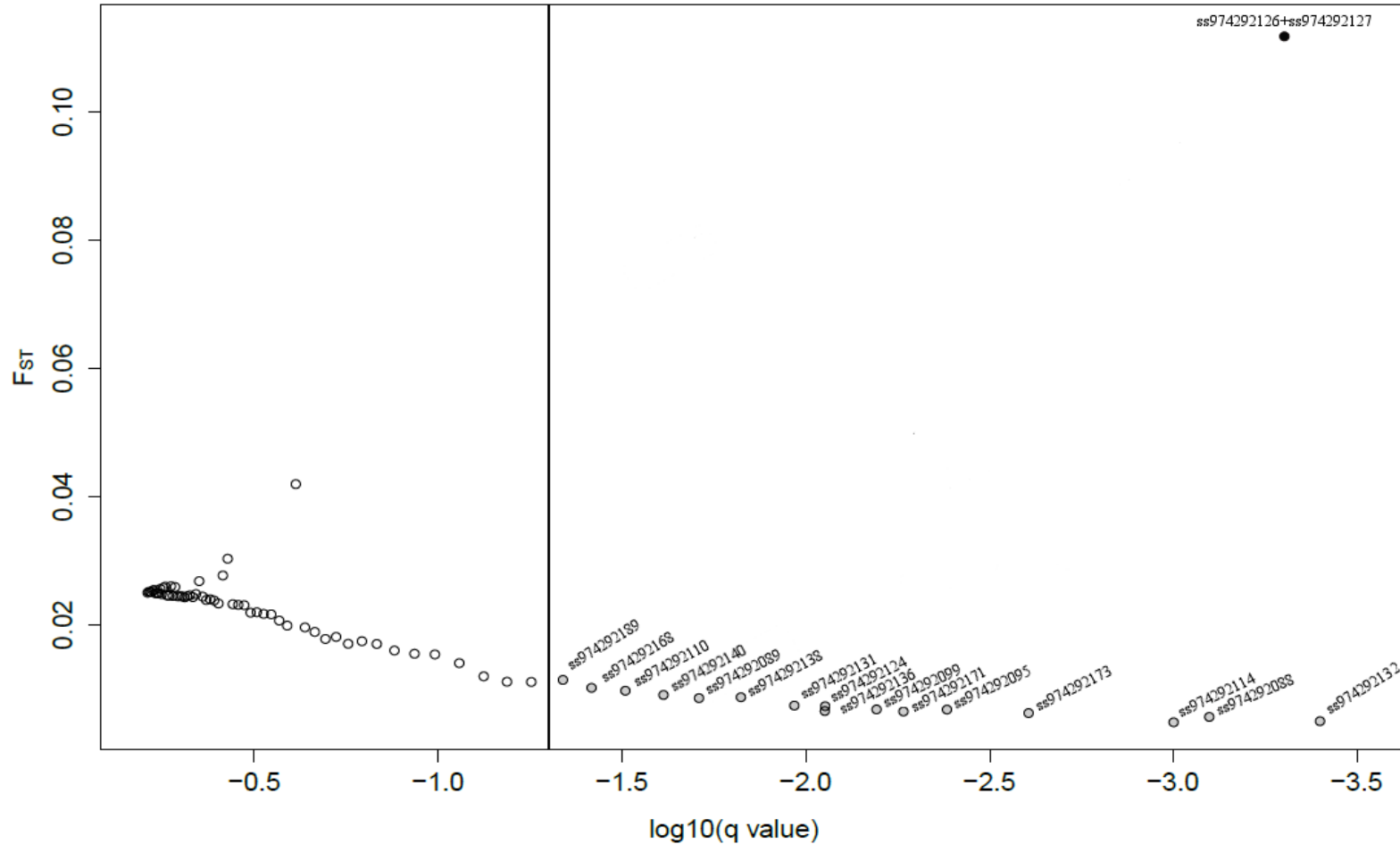
Material gehigarria



S3.1. Irudia. Distantzia bidezko isolamendua. a) Binakako distantzia geografikoen eta antzekotasun genetikoen erregresioa 26 laginketa gunetarako. b) Anlisi berdina ozeano Atlantiko, Indiko eta Pazifikoko 19 laginketa gunetarako eta c) Mediterraneoko 7 laginak bakarrik kontuan hartuta.



S3.2. Irudia. Populazio kopuru estimatua STRUCTURE (a) eta GENELAND (b) analisisien bidez (a) Datuen batez besteko $[\ln \Pr(X)|K]$ probabilitatea 10 STRUCTURE errepliketan oinarrituta balizko taldekapen kopuruaren (K) funtzioan oinarrituta. (b) Estimatutako taldekapen kopuruaren ondorengo dentsitate banaketa.



S3.3. Irudia. BAYESCAN ezohiko balioen identifikaziorako emaitza irudia. F_{ST} balio (y ardatza) eta $\log(q)$ balioak (x ardatza) artean oinarritutako Irudikapen grafikoa. Markatzaile Hautespenaren menpe egon daitezkeen markatzaile hautagaiak q - balioa $< 0,1$ dutenak dira, lerro beltz bertikaletik eskumara ageri dira. Zirkulu grisek hautespen orekatzailearen menpeko markatzaile hautagaiak irudikatzen dituzte eta zirkulu beltzek hautespen dibergentearen menpeko markatzaile hautagaiak; zirkulu hutsek balizko markatzaile neutralak irudikatzen dituzte.

S3.1 Taula. 1.331 *Thunnus alalunga* indibiduotan genotipatutako 117 SNPen ezaugarriak. (*)Albaina *et al.*-etik 2013 eskuratutako SNPak.ESANG: emaitza esangarria. EE: emaitza ez esangarria.

SNP #	NCBI Id.	Genotipazio	Aleloak	MAF	HWE
1	ss974292086	%90	A/G	0,472	EE
2	ss974292087	%98	G/G		-
3	ss974292088	%98	A/G	0,095	EE
4	ss974292089	%96	G/T	0,392	EE
5	ss974292090	%96	G/A	0,163	EE
6	ss974292091	%9	A/A		-
7	ss974292092	%96	G/A	0,038	EE
8	ss974292093	%98	G/A	0,004	EE
9	ss974292094	%95	A/G	0,297	EE
10	ss974292095	%97	C/A	0,107	EE
11	ss974292096	%99	C/C		-
12	ss974292097	%98	T/C	0,017	EE
13	ss974292098	%72	C/C		-
14	ss974292099	%95	A/G	0,245	EE
15	ss974292100	%95	T/C	0,032	EE
16	ss974292101	%81	C/G	0,241	ESANG.
17	ss974292102	%97	T/C	0,070	EE
18	ss974292103	%98	C/T	0,076	EE
19	ss974292104	%98	A/A		-
20	ss974292105	%98	G/A	0,151	EE
21	ss974292106	%93	G/A	0,263	EE
22	ss974292107	%96	T/C	0,079	EE
23	ss974292108	%97	G/A	0,012	ESANG.
24	ss974292109	%94	C/A	0,030	EE
25	ss974292110	%97	G/A	0,251	EE
26	ss974292111	%95	T/C	0,115	EE
27	ss974292459	%96	G/A	0,088	ESANG.
28	ss974292460	%98	T/T		-
29	ss974292114	%96	G/A	0,186	EE
30	ss974292115	%97	A/C	0,005	EE
31	ss974292116	%98	G/A	0,017	EE
32	ss974292117	%84	T/C	0,231	EE
33	ss974292118	%91	G/A	0,243	ESANG.
34	ss974292119	%98	A/G	0,007	EE
35	ss974292120	%96	G/A	0,032	EE
36	ss974292121	%98	G/G		-
37	ss974292122	%97	T/T		-
38	ss974292123	%97	A/G	0,035	EE
39	ss974292124	%97	G/A	0,075	EE
40	ss974292125	%97	T/T		-
41	ss974292126	%95	T/C	0,030	EE
42	ss974292127	%94	A/C	0,033	EE

43	ss974292128	%97	G/A	0,022	EE
44	ss974292129	%55	T/G		-
45	ss974292130	%97	T/C	0,061	EE
46	ss974292131	%93	C/A	0,277	EE
47	ss974292132	%98	T/C	0,149	EE
48	ss974292133	%92	A/G	0,28	ESANG.
49	ss974292134	%97	G/A	0,456	EE
50	ss974292135	%98	G/A	0,018	EE
51	ss974292136	%94	A/G	0,104	EE
52	ss974292137	%87	G/A	0,387	EE
53	ss974292138	%97	C/A	0,062	EE
54	ss974292139	%98	A/G	0,004	EE
55	ss974292140	%93	A/G	0,400	EE
56	ss974292141	%90	A/T	0,297	ESANG.
57	ss974292142	%98	G/A	0,050	EE
58	ss974292143	%91	A/G		-
59	ss974292144	%89	T/C	0,153	ESANG.
60	ss974292145	%91	A/T	0,216	ESANG.
61	ss974292146	%98	G/G		-
62	ss974292147	%97	G/A	0,004	EE
63	ss974292148	%95	A/G	0,488	ESANG.
64	ss974292149	%93	T/A	0,470	ESANG.
65	ss974292150	%98	A/G	0,003	EE
66	ss974292151	%98	A/A		-
67	ss974292152	%95	G/A	0,048	EE
68	ss974292153	%94	G/A	0,093	EE
69	ss974292154	%90	T/C	0,107	EE
70	ss974292155	%97	G/T	0,017	ESANG.
71	ss974292156	%94	G/G		-
72	ss974292157	%95	T/C	0,009	EE
73	ss974292158	%98	G/A	0,006	EE
74	ss974292159	%92	A/G	0,460	EE
75	ss974292160	%97	A/T	0,123	EE
76	ss974292161	%97	G/A	0,025	EE
77	ss974292162	%95	A/G	0,199	EE
78	ss974292163	%94	A/T	0,492	ESANG.
79	ss974292164	%98	G/A	0,002	EE
80	ss974292165	%98	T/C	0,042	EE
81	ss974292166	%82	G/A	0,120	ESANG.
82	ss974292167	%85	T/C	0,418	ESANG.
83	ss974292168	%89	A/T	0,493	EE
84	ss974292169	%98	A/G	0,009	EE
85	ss974292170	%97	G/G		-
86	ss974292171	%98	T/C	0,034	EE
87	ss974292172	%95	G/A	0,197	EE
88	ss974292173	%97	G/A	0,057	EE
89	ss974292174	%96	A/A		-
90	ss974292175	%97	G/A	0,063	EE

91	ss974292176	%84	G/A	0,400	ESANG.
92	ss974292177	%98	G/T	0,011	EE
93	ss974292178	%96	A/A		-
94	ss974292179	%96	G/A	0,055	EE
95	ss974292180	%98	G/A	0,059	EE
96	ss974292181	%96	G/A	0,049	EE
97	ss974292182	%93	T/C	0,470	ESANG.
98	ss974292183	%97	G/G		-
99	ss974292184	%86	G/A	0,135	EE
100	ss974292185	%98	G/A	0,005	EE
101	ss974292186	%95	C/C		-
102	ss974292187	%98	G/A	0,025	EE
103	ss974292188	%95	A/C	0,096	EE
104	ss974292189	%94	G/T	0,207	EE
105	ss974292190	%91	C/C		-
106	ss974292191	%97	C/T	0,019	EE
107	ss974292192	%92	G/A	0,367	ESANG.
108	ss974292193	%96	G/A	0,089	EE
109	ss974292194	%97	G/T	0,005	EE
110	ss974292195	%93	C/G	0,331	ESANG.
111	ss974292196	%97	T/C	0,136	ESANG.
112	ss974292197	%98	A/C	0,004	EE
113	ss974292198	%97	G/G		-
114	ss974292199	%95	G/A	0,061	EE
115	ss974292200	%1	G/A		-
116	rs366516796*	%92	A/T	0,264	ESANG.
117	rs193631170*	%95	A/C	0,253	EE

S3.2. Taula. BLASTn emaitzak eta hautespenaren menpe egon daitezkeen 18 SNPen funtzio molekular posiblea.

NCBI Id	Hautespen mota	Genea	Id	Funtzio molekularra
ss974292088	Orekatzailea	L18a proteina erribosomikoa	RPL18A	RNA lotura
ss974292089	Orekatzailea	Mintzarteko 9 superfamiliako 3 kidea	TM9SF3	Mintzaren osagarri integrala
ss974292095	Orekatzailea	NADH deshidrogenasa (ubikinona) 1 alpha azpikonplex, 9	NDUFA9	NADH ubikinona oxidoerreduktasa
ss974292099	Orekatzailea	RLP24 erribosoma biogenesis proteina posiblea	RLP24	ATPasa aktibatzailea
ss974292110	Orekatzailea	60S erribosomako L27 proteina	RPL27	Erribosomako osagarri egituratzailea
ss974292114	Orekatzailea	60S erribosomako L31 proteina	RPL31	RNA lotura, erribosomako osagarri egituratzailea
ss974292124	Orekatzailea	Prolinaz-aberasturiko hartzaile nuklearraren 2 koaktibatzailea	PNRC2	Transkripzioaren erregulazioa, DNA-txantiloia
ss974292126	Dibergentea	Emaitzik ez	-	-
ss974292127	Dibergentea	Emaitzik ez	-	-
ss974292131	Orekatzailea	Betaina-homozisteina metiltransferasa	BHMT	Metiltransferasa aktibitatea, zink ioi lotura
ss974292132	Orekatzailea	A desegin eta metaloproteinasa trombospondinarekin 2 motiboak	ADAMTS2	Metaloendopeptidasa aktibitatea, zink ioi lotura
ss974292136	Orekatzailea	Bakuoloko proteina antolatzailea 28	VPS28	ESCRT-I-konplexuko osagaia,
ss974292138	Orekatzailea	UPF0461 C5orf24 proteina homologoa	UPF0461	Trafiko besikularraren doitzaila
ss974292140	Orekatzailea	Emaitzik ez	-	-
ss974292168	Orekatzailea	Emaitzik ez	-	-
ss974292171	Orekatzailea	L3 erribosomako proteina	RPL3	Metiltransferasa jarduera, metal ioi lotura
ss974292173	Orekatzailea	fruktosa-1,6-bisfosfatasa isozima 2-moduko, mRNA	PFKFB2	Erribosomako osagarri egituratzailea fruktosa-1,6-bisfosfatoare sintesia eta degradazioa
ss974292189	Orekatzailea	Emaitzik ez	-	-

S3.3. Taula. N_e garaikidearen estimazioa ipar Atlantikoan 1986tik 2009ra metodo tenporalean oinarrituta. Belaunaldi denbora (\hat{G}), F_s balioak, populazioaren tamaina efektiboaren batez besteko harmonikoa (\check{N}_e), ugaltzaileen tamaina zentsala (\check{N}_c), eta \check{N}_e/\check{N}_c ratioa.

	\hat{G}	F_s	$F's$	\check{N}_e	\check{N}_c	\check{N}_e/\check{N}_c
C86	4,5	0,038	0,007	14.040	3.200.270	$4,39 \times 10^{-3}$
C87	4,3	0,046	0,012	8.388	2.397.944	$3,50 \times 10^{-3}$
C05	4,1	0,028	0,005	18.147	2.796.804	$6,49 \times 10^{-3}$
C06	4,6	0,017	0,005	10.232	2.238.867	$4,57 \times 10^{-3}$
C07	5,0	0,026	0,016	5.466	2.090.050	$2,62 \times 10^{-3}$
C08	5,3	0,017	0,004	23.330	2.373.467	$9,83 \times 10^{-3}$

S3.4. Taula. N_e historikoaren estimazioa ipar Atlantikoan metodo koaleszentean oinarrituta. Kohorte bakoitza ordezkatzeko duen lagin kopurua (N), ugaltzaileen tamaina zentsala (N_c) eta N_e/N_c ratioa.

	N	Ne	Nc	Ne/Nc
C86	30	20.304	3.200.270	$6,34 \times 10^{-3}$
C87	34	16.341	2.397.944	$6,81 \times 10^{-3}$
C05	75	18.862	2.796.804	$6,74 \times 10^{-3}$
C06	68	14.839	2.238.867	$6,63 \times 10^{-3}$
C07	70	15.696	2.090.050	$7,51 \times 10^{-3}$
C08	136	13.897	2.373.467	$5,86 \times 10^{-3}$
C09	53	17.162	3.006.973	$5,71 \times 10^{-3}$

IV. Kapitulua



Hegaluzearen eredu filogeografikoak eta Thunnus espezieen arteko lotura filogenetikoak DNAm-tan oinarrituta

Hegaluzearen eredu filogeografikoak eta *Thunnus* espezieen arteko lotura filogenetikoak DNAm-tan oinarrituta

Urtzi Laconcha, Mikel Iriondo, Haritz Arrizabalaga, Carmen Manzano, Pablo Markaide, Haritz Jimenez, Maria Jesus Sanz, Igor Velado, Andone Estonba

Laburpena

Ikerlan honetan bost eskualde mitokondrialetako (CR, 12S, 16S, Cyt *b* eta COI) sekuentziak eta bederatzi SNP mitokondrial azteru dira gaur egun onartuta dauden hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) sei stock-etako laginetan. Analisi filogeografikoek duela milioi bat urte sortu ziren bi haplotalderen presentzia agertu zuten. Haplotaldeen maiztasunen eta distantzia geografikoen arteko korrelazioa nabarmena zen, Mediterraneoan izan ezik, populazio honek ez-ohiko isolamendu maila ageri baitzuen. Honez gain, desberdintasun esangarriak aurkitu ziren Mediterraneoan itsasoaren, ozeano Atlantikoaren, ozeano Indikoaren eta ozeano Pazifikoaren artean bederatzi SNP erabiltzean (Φ_{ST} balioak 0,038 eta 0,199 artekoak), emaitza hauek bat datoz aurretik SNP nuklearrekin aurkitutako egitura genetikoarekin. Emaitza hauek Atlantikoaren eta Indo-Pazifikoaren arteko isolamendu historiko partziala agertzen dute, Mediterraneoan izan ezik. *Thunnus* generoko zortzi espeziei dagokionean, aipatutako eskualde mitokondrialek eta genoma mitokondrial osoko sekuentziek ez dute egungo *Neothunnus* eta *Thunnus* subgeneroetan oinarritutako azpitaldekapena babesten. Are gehiago, azterketa hauek argi erakusten dute hegaluzea generoko espezierik antzinakoena dela (duela 4,5 Ma banatua), eta moja atuna jarraian (4,0 Ma). Duela 2,7 eta 2,1 Ma artean prozesu kladogenetiko bat gertatuko litzateke, denbora tarte honetan gainontzeko espezie guztiak sortuko lirateke, baita moja atunaren eta tongol atunaren (*Thunnus tonggol*) bi linajeak ere. Emaitzek duela gutxiko hibridazioak eta hibridazio historikoak ere nabarmendu zituzten. Zentzu honetan, lan honetan hegaluzearen DNAm-taren introgresioa proposatzen dugu hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren (*Thunnus orientalis*) arbaso komunaren artean. Arbaso komun hau hasiera batean Atlantikoan biziko litzateke, eta orain dela 0,8 Ma, fundatzaile efektu baten ostean, Ozeano Pazifikoa kolonizatu eta Pazifikoko atungorria espeziea sortuko litzateke.

Hitz-gakoak: *Thunnus alalunga*, *Thunnus* generoa, filogenia, DNAm, nukleotido bakarreko polimorfismo mitokondrialak (SNPak)

1. Sarrera

Hegaluzea (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) *Thunnus* generoan banaketa zabalena duen espeziea da, izan ere, ozeano Pazifiko, Indiko eta ozeano Atlantikoan, eta Mediterraneoan baita ere, aurkitu daitekeen espeziea da, 50-55°I-tik to 40-45°H-rako (Arrizabalaga *et al.* 2014) hedapena du. Ur tropikal eta epeletako banaketa kosmopolitak tenperatura aldaketa nabarmeneko baldintza ozeanografikoekiko espeziearen moldakortasuna erakusten du. Hegaluzea 13,5°C eta 25,2°C artean aurkitu ohi da, nahiz eta 9,5°Ctan bizi badaitekeen denboraldi laburretan. *Thunnus* espezieen artean txikiena da, bestalde, espeziearen ezaugarriak (bizi-ziklo luzea, errute-gune ezezagunak eta errunaldi laburrak), balio ekonomiko handiarekin batera, hegaluzea gehiegizko arrantzarekiko bereziki kalterbera izatea eragiten dute (Collette *et al.* 2011). Kalteberatasun honek kudeaketa planek eraginkortasuna epe luzean izatea baldintzatzen du. Beraz, ustiatutako stock-en inguruko ezagutza hobetzen lagunduko duten metodologia desberdinetako jakintzagai anitzetako informazioak (populazio egitura, migrazioak, aldakortasun genetikoak etab.), fidagarria, egungoa eta kudeatzaileentzako erabilgarria izan beharko du. Izan ere arrantzategien kudeaketa desegokiak, hau da, egungo populazio egiturarekin bat ez datorren kudeaketa-unitateen definizioak, populazioaren gainbehera, eta ondorioz, emankortasunean murrizketa (Hauser & Carvalho 2008), eragin dezake arrantzategiak kolapso egoerara eraman arte (Fu & Fanning, 2004). Bestalde, gehiegi ustiatutako populazioek aldakortasun genetikoaren galera jasan dezakete (Hauser *et al.* 2002), honek, etengabe aldatzen ari den inguru baten aurrean espezieak duen egokitzapen-erantzunaren galera baldintzatu dezake.

Hegaluzeearen populazio egiturari dagokionean, SNP nuklearrekin mundu mailan aurretik argitaratutako ikerlanek lau populazio direla plazaratu dute: bat Mediterraneoan eta ozeano bakoitzean bat (Atlantikoa, Pazifikoa eta Indikoa)(Albaina *et al.* 2013; Laconcha *et al.* 2015b). Hala ere, markatzaile desberdinekin egindako lanek ez dute egitura hau bera islatzen. Modu honetan, Montes *et al.*-ek (2012) mikrosateliteen bidez eta mundu mailako laginketa batean, ez zituzten ozeano Atlantikoa eta Indikoa desberdintzatzen. Markatzaile desberdinak erabilita, DNAMt-eko sekuentziak esaterako, Graves & Dizon-ek (1989) eta Viñas *et al.*-ek (1999) Atlantiko eta Pazifikoko, eta Atlantikoko eta Mediterraneoeko hegaluzeak ezin izan zituzten desberdindu hurrenez hurren. Alabaina, Chow eta Ushiyama-k (1995), Atlantikoaren eta Pazifikoaren artean. Azkenik, Nakadate *et al.*-ek (2005) DNAMt-eko D-loop eskualdeko sekuentziak erabilita Atlantikoko eta Mediterraneoeko hegaluzeen artean desberdintzapenak topatu zituzten. Azkeneko bi ikerlan hauek bat datoz SNP nuklearren emaitzekin.

Bestalde hertsiki lotutako *Thunnus* espezieen arteko erlazioak argitu gabe diraite, izan ere azpitaldekapen klasikoa (Collette 1978), desberdintasun morfologiko eta ekologikoetan oinarritutakoa, ez dute, orokorrean, ikerketa genetikoek islatzen. *Thunnus* generoko zortzi espezieen bi subgenerotan sailkatzen ditu banaketa morfoekologikoak (Collette 1978): *Thunnus* (*T. alalunga*, *T. obesus*, *T. thynnus*, *T. orientalis*, *T. maccoyii*) eta *Neothunnus* (*T. atlanticus*, *T. tonggol* and *T.*

albacares). Subgeneroen banaketa bero-trukaketarako barne sistema izatean (*Thunnus*) edo ez izatean (*Neothunnus*), eta muskulu gorriko, gibelesko, larruko arteria eta eskeleto axialeko bestelako ezaugarrietan oinarritzen da (Nakamura 1965; Gibbs & Collette 1967; Collette 1978; Chow & Kishino 1995). *Thunnus* subgeneroko espezieak “epeltzat” hartzen dira, *Neothunnus* subgenerokoak aldiz, espezie “tropikaltzat”. Alvarado Bremer *et al.*-ek (1997) Kontrol Eskualdeko (CR) sekuentzia mitokondrialak azertzean aipaturako bi subgeneroen banaketarekin bat zetozen emaitzak lortu zituzten arren, ikerlan gehienek ez dituzte banaketa morfoekologiokoekin (Collette 1978) bat datozen emaitza genetikoak argitaratu. Zentzu honetan, Chow & Inoue-k (1993) – b zitokromoko (Cyt *b*), 12S-ko eta ATPasa gene mitokondrialetako RFLP markatzaileetan oinarrituta- eta Chow & Kishino-k (1995) –Cyt *b* eta ATPasa geneak aztertuz- hegalaburra (*Thunnus thynnus*) eta hegoaldeko atungorria (*Thunnus maccoyii*) filogenetikoki *Thunnus* subgenerotik baino, *Neothunnus* subgenerotik hurbilago kokatu zituzten. Azpimarragarria da bi ikerlanok Pazifikoko atungorriaren (*Thunnus orientalis*) eta hegaluzearen artean hurbiltasun filogenetiko handia aurkitu zutela, ITS1-eko sekuentzia nuklearrekin egindako azterketek (Chow & Kishino 1995; Chow *et al.* 2006) ordea, Pazifikoko atungorria hegaluzearekin baino, hegalabururarekin elkartzan zuten. Tsen *et al.*-ek (2012), zortzi espezieen Cyt *b* geneko sekuentzien bidez, generoaren filogenia egungo subgeneroen sailkapenarekin bat ez datorrela ondorioztatu zuten. Laburbilduz, datu molekularretan oinarritutako *Thunnus* eta *Neothunnus* subgeneroen existentzia eta generoko espezieen arteko lotura filogenetikoak argitu gabe daude oraindik ere. Ikerlan gehienak gene batean edo bitan oinarritzen dira *Thunnus* generoko zortzi espezieen arteko loturak zehazteko. *Thunnus* lagin kopuru zabalean mitokondriako sekuentzia tamaina desberdinak (sekuentzia mitokondrial osoak, lotutako zenbait gene eta gene bakarra) aztertzen dituen ikerlan honen hurbilketak generoaren filogenia argitzen lagundu dezake, eta baita generoko espezieazio gertaerak tenporalki erreferentziatzen lagundu ere.

Laburbilduz, ikerlan honetako helburua bikoitza da. Batetik, SNP nuklearrekin antzemandako egitura genetiko frogatzea, horretarako lehendabizikoz aztertu dira sekuentzia eta SNP mitokondrialak mundu mailako hegaluze laginean. Bestetik, ikerlan honen helburua *Thunnus* espezieen arteko lotura filogenetiko eztabaidagarriak argitzea ere bada. Helburuok betetzeko 38 hegaluzeren 4 gene mitokondrial sekuentziatu, 160 hegaluzeren Kontrol Eskualdea (CR) sekuentziatu eta 1.254 indibiduotan genotipatu ziren Cyt *b*, zitokroma oxidasa I azpiunitatea (COI), 12S eta 16S gene mitokondrialetako 10 SNP. Bestalde, datu bilketa burutu zen, guztira *Thunnus* generoko 8 espezieen 2.000 CR sekuentziatik gora eskuratuz.

2. Material eta metodoak

2.1. Laginak

1.254 hegaluze (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) indibiduoko laginak espeziearentzat definitutako sei stock-etan lagindu ziren (Mediterraneo itsasoa, ipar Atlantikoko ozeanoa, hego

Atlantikoko ozeanoa, ozeano Indikoa, ipar Pazifikoko ozeanoa eta hego Pazifikoko ozeanoa) AZTI itsas ikerketa institutuaren bidez. Indibiduoak gehien bat 2008 eta 2012 artean lagindu ziren, nahiz eta batzuk 1988 eta 1989koak diren. Lagin gehienak muskulua, hegatsa edo bihotz ehuna ziren, zeintzuk -20°C-tan edo %96 alkoholetan 4°C-tan gorde ziren. Gainera, Eukitt-an (O. Kindler GmbH) ezarritako hezur ebakiak, eta lehortu eta tindatutako odol laginak ere bildu ziren (4.1. Taula). Muskulu, hegatz eta bihotzeko laginetako DNA NucleoSpin 96 Tissue Kit-aren (Macherey-Nagel) bidez erauzi zen. Hezur eta odoleko laginak lehendabizi xylol-ean murgildu eta hezur laginak ondoren eskuz txikitu ziren; lagin hauetako DNA mintz zehatz baten bidez erauzi zen QIAmp DNA Investigator Kit-a (Qiagen) erabilia. Lagin guztien DNA NanoDrop 1000 espektrofotometroa (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) eta Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies) fluorometroaren bidez kuantifikatu zen. DNA lagin guztiak -20°C-tan gorde ziren ondorengo analisisetarako.

4.1.Taula Stock-a, harrapaketa data, kodea, hegaluze kopurua (N) hurbilketa bakoitzean: 5 eskualde mitokondrial (Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR; 5,112 bp), 344bp-ko CR sekuentziak (CR), eta 10 SNPak, eta lagin mota (T = Muskulua, hegatsa edo bihotz ehuna; B = Odola and S = Hezurra).

Stock-a	Data	Kodea	N			Lagin mota
			5 eskualde	CR	10 SNP	
Mediterraneo Itsasoa	1999-2011	MED	6	27	235	T eta B
Ipar Atlantikoa	1988-2012	NAT	11	27	492	T eta S
Hego Atlantikoa	1999-2012	SAT	7	29	232	T eta B
Indikoa	2008-2012	IND	6	20	131	T
Ipar Pazikoa	2008	NPA	3	29	81	T
Hego Pazifikoa	2003-2008	SPA	5	28	83	T
Guztira			38	160	1.254	

2.2. Sekuentziazioa eta SNP genotipazioa

Hegaluzearen azterketa filogeografikoa hiru hurbilketetan oinarritu zen (4.1 Taula). Lehenik, 38 indibiduo (Mediterraneoko 6, ipar Atlantikoko 11, Hego Atlantikoko 7, Indikoko 6, ipar Pazifikoko 3 eta hego Pazifikoko 5) sekuentziatu ziren 5 eskualde mitokondrial biltzen zituen 5.112 bp-ko luzerako sekuentziarako: CR, Cyt *b*, COI, 12S eta 16S. Bigarrenik, beste 122 indibiduo (21 Mediterranokoak, 16 ipar Atlantikokoak, 22 hego Atlantikokoak, 14 Indikokoak, 26 ipar Pazifikokoak eta 23 hego Pazifikokoak) sekuentziatu ziren CRaren 344bp-tarako soilik. Beraz, hasierako hurbilketarako sekuentziatutakoak kontuan izanda, 160 CR sekuentzia aztertu ziren hegaluzearen filogeografia ikertzeko. Bukatzeko, 10 nukleotido bakarreko polimorfismo (SNP) 1.254 indibiduotan genotipatu ziren. SNPak lehenengo hurbilketan sekuentziatutako 4 eskualde mitokondrialetan kokatzen ziren: SNP bat 12S genean (ss947846612), bi SNP 16S genean

(ss947846613, ss947846614), bi SNP COI genean (ss947846615, ss947846616) eta 5 SNP Cyt *b* genearen (ss947846617, ss947846618, ss947846619, ss947846620 eta ss947846630) skeuntzietatik eratorria. CR eskualdea ez zen baliagarria izan aldakortasun handia erakusteagatik.

Sekuentziazioa UPV/EHUko Sekuentziazio eta Genotipazio Zerbitzuan (SGIKer) burutu zen, ABI PRISM BIGDYE v3.1 Terminator Sekuntziazio Erreakzioa (Life Technologies) erabiliz egin zen ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer-ean (Life Technologies). Sekuentziak SeqScape v3.0 (Life Technologies) softwarea erabilia prozesatu ziren. Bukatzeko, skuentzien editazioa BioEdit 7.0.1 (Hall 1999) egin zen eta MUSCLE-en (Edgar, 2004) bidez. Aukeratutako SNPen genotipazioa TaqMan OpenArray teknologiaren (Life Technologies)bidez burutu zen SGIker-en. SNP bakoitzaren aleloa TaqMan OpenArray teknologiaren (Life Technologies) bidez ezarri ziren. Genotipazioaren kalitatea ziurtatzeko, SNPen genotipazio maila %80tik gorakoa izan eta taldekapen argiak erakutsi behar zituzten.

2.3. Analisi estatistikoak

Dibertsitate haplotipikoa (h), haplotipo kopurua (nh), SNP kopurua eta nukleotido dibertsitatea (π) DNAsp v.5 (Rozas *et al.* 2003) eta MEGA6 (Tamura *et al.* 2004) softwareekin estimatu ziren. Tajima-ren D (Tajima 1989) and Fu-ren FS (Fu 1997) neutralitatearen neurriak DNAsp v.5-ren (Rozas *et al.* 2003) bidez estiamtu ziren.

Hegaluzearen egitura geografikoa Arlequin 3.5 bidez frogatu zen Tamura-Nei distantzien matrizean oinarrituta. Binakako Φ_{ST} eremu guztien artean frogatu zen, 160 CR sekuentziak eta SNPentzat genotipatutako 1.254 indibiduoak erabilia. Korrelazio haplotipikoen esangarritasun maila 1000 permutazio erabilia aztertu zen.

Azterketa filogenetikoetarako GenBank-etik aztertutako bost eskualde mitokondrialetako (Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR) sekuentziak eskuratu ziren *Thunnus* generoko 7 espeziaren (guztiak *T. atlanticus* ezik) 55 indibiduoentzat, bestalde mitokondria osoko 16 sekuentzia espezie berdinentzat, gainera CR sekuentziak ere eskuratu ziren generoko zortzi espezieentzat. Azken kasu honetan, behin sekuentziak lerrokatuak eta ziurgabetasunak ezabatuta, 344bp-ko 2,113 CR sekuentzia eskuratu ziren guztira (S4.1. Taula). Lanpo sabel-marraduna sabel-marradunaren (*Katsuwonus pelamis*), , bala atuna (*Auxis rochei*) eta atuntxikia (*Euthynnus lineatus*) azterketa filogenetikoan ere erabili dira kanpo-talde modura.

Egokitzapen hoberena erakusten zuen modeloa identifikatu zen DNA mitokondrial (mtDNA) datu-sorta bakoitzerako MODELTEST 3.06-aren (Posada & Crandall 1998) bidez. Tamura-Nei (1993) modeloarekin egokitzapen hoberena lortu zen. Ordezkapen modelo hau erabili zen, RAxML (Berger & Stamatakis 2011) eta MEGA6-an (Tamura *et al.* 2004) probabilitate maximoko (ML) eta neighbour-joining (NJ) zuhaitzak sortzeko hurrenez hurren. Bestalde, median-joining sareak (Bandelt *et al.* 1999) eraiki ziren NETWORK 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd.)

softwarea erabilia. Hegaluze haplotaldeen artean eta baita *Thunnus* espezieen arten distantzia genetikoak kalkulatu ziren CR sekuentzietan (344 bp) oinarrituta MEGA6 softwarearen bidez, Tamura-Nei (1993) modeloa jarraituz eta 1000 erreplikako bootstrap-arekin. “Binakako ezabaketa” aukera erabili zen espezieak eta haplotaldeak haien artean alderatzean distantzien gehiegizko estimazioak ekiditeko. Taldeen arteko distantziak zuzendu egin ziren talde barruko distantziak kontuan hartuta. Estimazio berdinak burutu ziren GenBank-en eskuragarri zeuden espezieen mitokondria osoko sekuentziekin. Espeziario eta kladogenesi datazioak CR sekuentzietan (344 bp) oinarritu ziren erloju molekular hertsia erabiliz (Faber & Stepien 1997; Stepien & Faber 1998; Munday *et al.* 2004). Bi dibergentzia tasa erabili ziren: %3,6-koa arrainen CR-rako proposatua (Donaldson & Wilson 1999), eta %11-koa, hegalaburrarentzat eta ezpata-arrainen CR-rako proposatua (Alvarado Bremer *et al.* 2005).

3. Emaizak

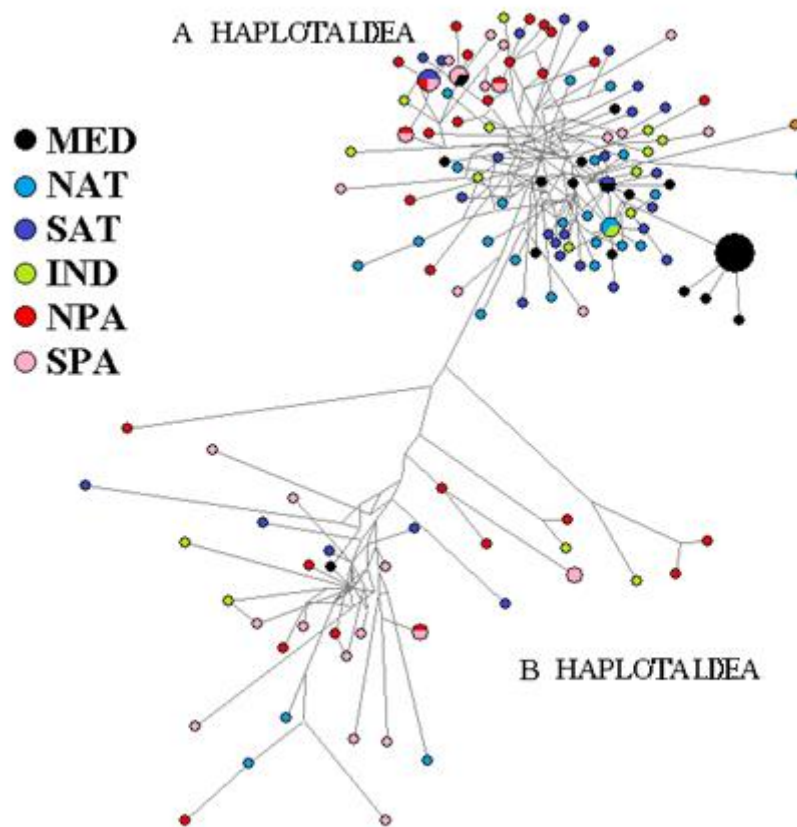
3.1. Hegaluzea

Bost eskualde mitokondrialetan —Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR— oinarritutako 38 hegaluze indibiduen azterketak 123 gune polimorfiko antzeman zituen (60 gune ziren parsimonikoki informatiboak), zeintzuek 37 haplotipo osatu zituzten, indibiduo bakoitzeko haplotipo bat, kointzidentzia bat salbu. 344 bp-ko 160 indibiduen CR sekuentziek 177 gune polimorfiko antzeman (139 gune ziren parsimonikoki informatiboak) eta 145 haplotipo osatu zituzten. Aurreragoko analisisiek erakutsi zuten haplotipo mitokondrialen muturreko aldakortasuna. Zentzu berean, aldakortasun neurketek dibertsitate haplotipiko (*h*) balioak 0,976-1,000 artekoak ziren eta dibertsitate nukleotidikoa (π) 0,003 eta 0,057 artekoak (4.2. Taula).

4.2. Taula. Haplotipo kopurua (*nh*), haplotipo dibertsitatea (*h*), nukleotido dibertsitatea (π), eta A edo B haplotaldeetako indibiduen ehunekoa bost eskualde mitokondrialetan (5,112 bp), CR (344 bp) eta 7 SNPak. Hegaluze stock laburdurak 4.1. Taulan definituta bezala.

	Kateatutako bost eskualde mitokondrial			Kontrol eskualdea					Aukeratutako SNPak			
	<i>nh</i>	<i>h</i>	π	<i>nh</i>	<i>h</i>	π	%A	%B	<i>nh</i>	<i>h</i>	%A	%B
MED	5	0,933	0,003	16	0,812	0,025	96,3	3,7	8	0,730	91,1	8,94
NAT	11	1,000	0,003	26	0,997	0,04	88,9	11,1	11	0,725	85,6	14,4
SAT	7	1,000	0,003	28	0,998	0,044	82,8	17,2	9	0,728	87,1	12,9
IND	6	1,000	0,004	20	1,000	0,057	65,0	35,0	8	0,840	68,7	31,3
NPA	3	1,000	0,005	29	1,000	0,057	62,1	37,9	7	0,774	63,0	37,0
SPA	5	1,000	0,004	26	0,995	0,056	60,7	39,3	8	0,790	62,7	37,3
Batez bestekoa	6	0,989	0,004	24	0,967	0,047	76,0	24,0	9	0,765	76,4	23,6

Leinu mitokondrialei dagokionean bi haplotalde antzeman ziren hegaluzean. 38 hegaluzeen bost eskualde mitokondrialetan eta 160 indibiduen CR sekuentzien median-joining sareek argi erakusten dute bi haplotipo talderen existentzia (4.1. Irudia; S4.1. Irudia). Haplotipo gehien zituen haplotalde A haplotalde legez izendatu zen eta B haplotalde legez haplotipo kopuru txikiagokoa.



4.1. Irudia. 344bp-ko CR sekuentzien haplotipoen median-joining sarea 160 hegaluze indibiduoentzat.

1.254 hegaluze indibiduotan aztertutako 10 SNPei dagokionean ss947846618 SNPak huts egin zuen genotipazio pausuan huts egin zuen. Bestalde, ss947846614 eta ss947846620 SNPek baztertu egin ziren polimorfismo maila altuak zarata gehiegi sortzen zuelako haplotipoen azterketan. Zentzu honetan, gainontzeko zazpi SNPek 13 haplotipo sortu zituzten 1.254 hegaluze indibiduotan (4.3. Taula). SNPetan oinarritutako haplotipo dibertsitatea aldatu egiten da stock bakoitzean, balioak $h=0,725\pm0,024$ -tik ipar Atlantikoan, $h=0,840\pm0,011$ artekoak, Indikoan, dira (4.2 Taula). Tajima-ren D eta Fu-ren FS neurriek ez dira 0-tik nabarmenki ezberdintzen ($D = 1,46$; $p > 0,10$ eta $FS = -0,56$; $p > 0,10$), honek markatzaileen neutralitatea adierazten du.

4.3. Taula. SNP Mitokondrialen haplotipoak eta haplotaldeak hegaluzean. Haplotipo bakoitzeko zazpi SNPen aleloak (ss947846612, ss947846613, ss947846615, ss947846616, ss947846617, ss947846619 eta ss947846630) adierazita (azken hiru zenbakiakin ordezkatuak taulan). (*) A eta B haplotaldeak desberdintzatzen dituen SNPa adierazten du. Erreferentzia indibiduok A eta B haplotaldeak 5 eskualdeak (5.112 bp) eta 344 bp-ko CR sekuentziak ageri direnak dira.

Haplotipoa	612	613	615	616*	617	619	630	Erreferentzia	Erreferentzia	Haplotaldeak	
								indibidualak	indibidualak		
								5.112bp	CR		
H1	G	A	G	A	C	T	A	4	30	A	
H2	G	A	A	G	G	C	A	2	17	B	
H3	G	A	G	G	G	C	A	1	8	B	
H4	G	A	G	A	G	T	A	8	29	A	
H5	G	A	G	A	G	T	C	5	24	A	
H6	G	A	G	G	G	T	A	1	1	B	
H7	G	G	G	A	G	T	A	0	7	A	
H8	G	A	A	G	G	T	A	0	1	B	
H9	G	A	G	A	G	C	A	0	0	A	
H10	A	A	G	A	C	T	A	1	14	A	
H11	G	A	A	A	G	T	A	0	0	A	
H12	G	G	G	A	C	T	A	0	0	A	
H13	G	G	A	G	G	C	A	0	0	B	
Guztira								22	131		

13 SNP haplotipoetatik bederatzi 38 eta 160 indibiduoko bost eskualde mitokondrial eta/edo 344 bp-ko CR sekuentzietan, hurrenez hurren, ere aztertu ziren (4.3. Taula). 4.4. Taulan SNP haplotipoen banaketa 6 stock-etan zehar eta hauen banaketa A edo B haplotaldeetan. Stock bakoitzaren A eta B ehunekoak antzerakoak izan ziren CR sekuentzia eta SNPetan oinarritutako azterketak izan (4.2. Taula). A haplotaldea nagusi izan zen, Mediterraeo eta Atlantikoan ehuneko altuenak ageri zituelarik (%83-96) eta baxuenak Indo-Pazifikoan (%61-68) (4.2. Taula). Azpimarratzekoa da H10 haplotipoa Mediterraneoko indibiduotan soilik topatu zela (N=82; %34,9) (4.4. Taula).

4.4. Taula. SNP Haplotipo eta haplotaldeen banaketa gau egun onartuak dauden hegaluze stock-etan. N: indibiduo kopurua.

Haplotipoa	N	Indibiduoak jatorriaren arabera						Haplotaldea
		MED	NATL	SATL	IN	NPAC	SPAC	
H1	373	83	173	92	23	1	1	A
H2	135	14	37	16	22	24	22	B
H3	50	2	19	4	13	6	6	B
H4	345	29	181	73	33	11	18	A
H5	156	20	45	24	18	26	23	A
H6	28	1	13	7	6	0	1	B
H7	64	0	15	11	15	13	10	A
H8	10	4	2	3	0	0	1	B
H9	7	0	4	2	1	0	0	A
H10	82	82	0	0	0	0	0	A
H11	2	0	2	0	0	0	0	A
H12	1	0	1	0	0	0	0	A
H13	1	0	0	0	0	0	1	B
Guztira	1.254	235	492	232	131	81	83	

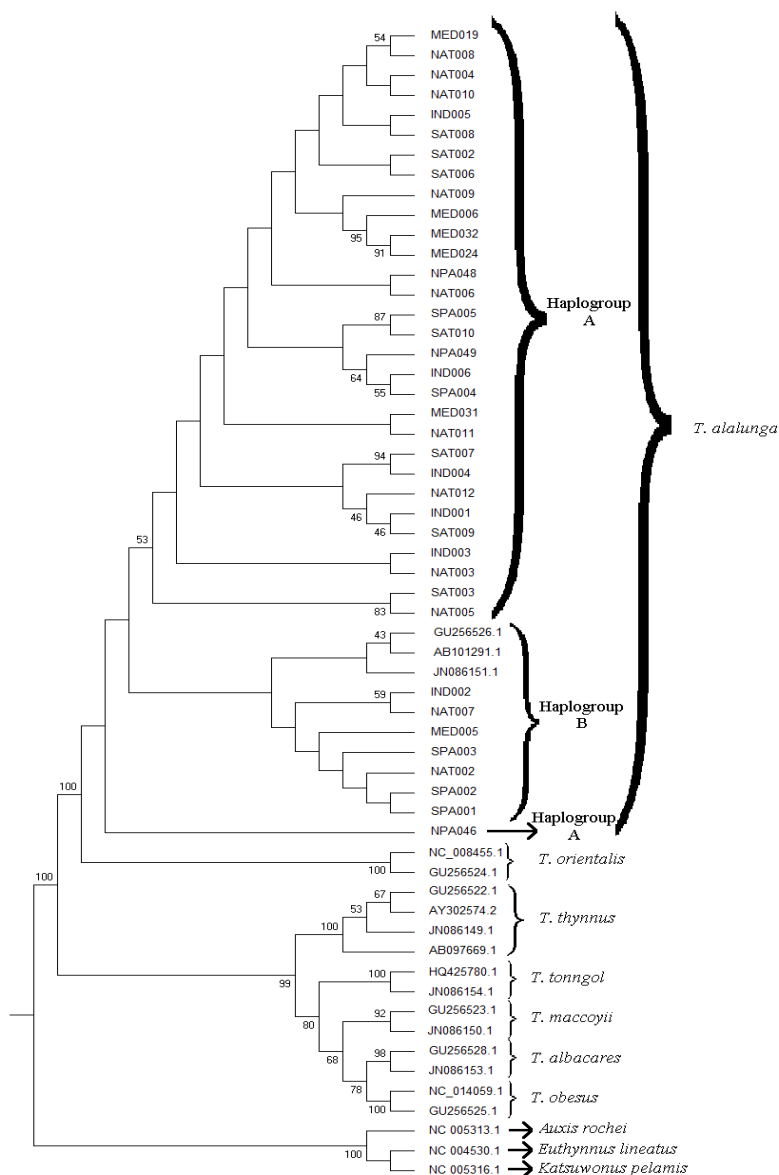
344bp-ko CR sekuentzietan oinarritutako hegaluze stock-en arteko desberdintasunak $\Phi_{ST} = 0,032$ balio orokor esangarria ($p < 0,01$) ageri zuen. Binakako Φ_{ST} konparazioetatik esangarritasun estatistikoa zuen bakarra Mediterraneoan zen gainontzekoekin alderatzean ($p < 0,01$) (4.5. Taula). Desberdintasun maila SNPetan oinarritu zenean, Φ_{ST} balio orokorra altuagoa (0,087) eta esangarria ($p < 0,01$) zen. Kasu honetan gainera, binakao alderaketan guztiak esangarriak izan ziren, Atlantikoko eta Pazifikoko ipar eta hego hemisferioen artean izan ezik (4.5. Taula).

4.5. Taula. Desberdintasun genetiko matrizeagaur egun onartuta dauden hegaluze stock-en artean Φ_{ST} bidez adierazita, 344 bp-ko CR sekuentzietan (diagonaletik behera) eta 7 SNPetan (diagonaletik gora) oinarrituta (* p-balioa $< 0,01$).

	MED	NAT	SAT	IND	NAP	SPA
MED		0,110*	0,098*	0,114*	0,199*	0,182*
NAT	0,095*		0,001	0,038*	0,160*	0,124*
SAT	0,094*	0,002		0,041*	0,161*	0,130*
IND	0,097*	0,000	0,001		0,046*	0,025*
NPA	0,093*	0,001	0,000	0,000		0,000
SPA	0,094*	0,004	0,001	0,003	0,000	

3.2. *Thunnus* generoa

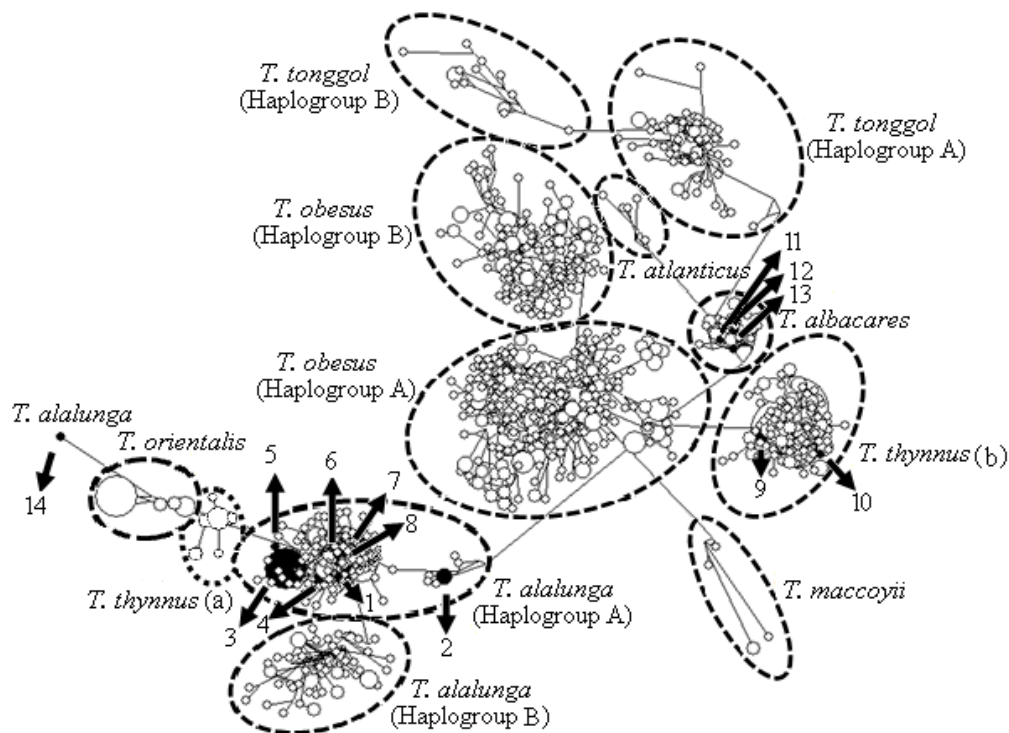
Thunnus generoko filogeniari dagokionean, gure emaitzek zortzi espezieen jatorri monofiletikoa babesten dute. Berez, bost eskualde mitokondrialetan (5112 bp) oinarritutako NJ zuhaitzak (sekuentziatutako 38 hegaluzeak, GenBank-etik eskuratutako *Thunnus* espezieen, *T. atlanticus*-a ezik, 16 sekuentziekin batera) guztiak batera ageri ziren zuhaitzaren adar batean, gainontzeko generoetako indibiduoetatik (*Katsuwonus pelamis*, *Auxis rochei* eta *Euthynnus lineatus*) aldentuta (4.2. Irudia). Bestalde, *Thunnus* generoaren barnean, hegaluzea eta Pazifikoko atungorria biak batera aldentuta ageri dira gainontzeko 6 espezieengandik (4.3. Irudia; 4.4. Irudia). Irudi berbera lortu zen *Thunnus* generoko zazpi espezieen 16 sekuentzia osoekin ML zuhaitza filogenetikoa eraikitzean (4.2. Irudia). Eskala desberdinetan oinarritutako azterketen irudien patroiek bat egiteak fidagarritasuna ematen die analisisiei eta emaitzen baliagarritasuna ziurtatzen dute.



4.2. Irudia. NJ zuhaitza Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR (5,112 bp) sekuentzietan oinarrituta, ikerlan honetako 38 hegaluze, GenBank-etik eskuratutako *Thunnus* generoko sekuentziak: *T. alalunga* (3 indibiduo), *T. obesus* (2), *T. thynnus* (4), *T. tonggol* (2), *T. orientalis* (2), *T. albacares* (2) eta *T. maccoyii* (2). Indibiduo bat *Katsuwonus pelamis*, *Auxis rochei* eta *Euthynnus lineatus* espezie bakoitzetik, kanpoko-talde modura gehituak izan dira. %50etik gorako bootstrap balioak soilik ageri dira.

Analisi filogenetikoan erabilitako sekuentzia kopuru handiak 2.113 indibiduoren genoma mitokondrialen azterketa zehatza ahalbidetu du, hauek lehenago *Thunnus* generoko 8 espezieetako batean sailkatua izan delarik morfologian oinarrituta (4.3. Irudia; 4.6. Taula). Lehendabizi, azpimarratu behar da sekuentzia gehienak morfologian oinarritutako sailkapenarekin bat datozela, taldekaper garbiak edo espezieka banatutako adarrak sortuz. Bigarrenez, hegalabur morfotipoko sekuentziak ez dira guztiak batera taldekatu, ez sortutako sarean (4.3. Irudia) ezta zuhaitz filogenetikoan ere (4.4. Irudia). Nahiz eta gehienak klado desberdinu batean taldekatzen diren,

hegalabur sekuentzia ugarik aparteko talde bat osatzen dute Pazifikoko atungorriaren eta hegaluzearen artean. Hirugarrenez, sekuentzia indibidual ugari (n=24) nahasiak ageri dira beste espezie batzuen kladoen barnean (4.3. Irdia; 4.6. Taula). Bereziki aipagarria da 18 hegalaburmorfotipodun haplotipo zeintzuk hegaluzearen kladoan ageri dira (hegaluze moduko hegalaburrak), eta bi hegalabur morfotipo *T. albacares* kladoan ageri dena. Aurkako kasua ere gertatzen da, bi Pazifikoko atungorriren hegalaburraren kladoan ageri dira (hegalabur moduko Pazifikoko atungorriak). Amaitzeko, hegaluze sekuentzia bat *T. albacares*-en kladoarekin taldekatu zen, eta beste bat Pazifikoko atungorriarekin.



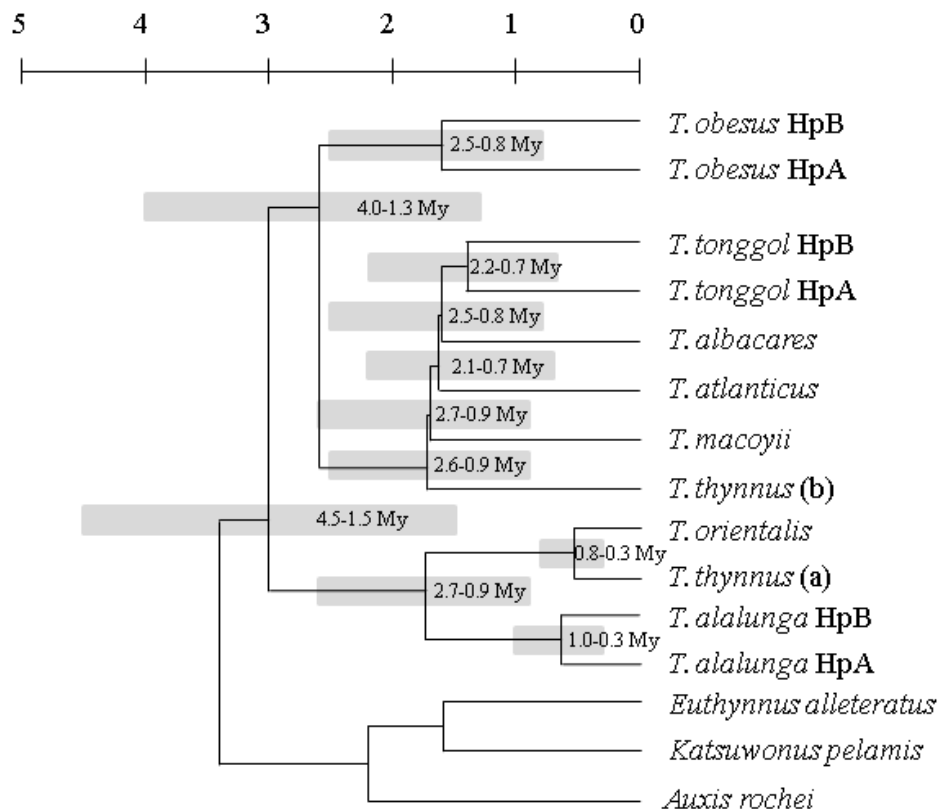
4.3. Irdia 344 bp-ko CR haplotipoen MJ sarea 2.113 *Thunnus* generoko indibiduotan. Marratxoaz osatutako zirkuluek espezieei dagozkien taldekapenak adierazten dituzte. Hegaluzean, Moja atunean eta Tongol atunean bina haplotalde (A and B) ageri dira. *T. thynnus* (a) eta *T. thynnus* (b) espeziearen bi taldekapen adierazten dituzte. Zirkulu zuriek espezieari dagozkion haplotipoak adierazten dituzte; zirkulu beltzek aldizdauden taldekapenekoa ez den beste espezie bat adierazten du (ikus 4.6. Taula).

4.6. Taula. *Thunnus* generoko 2.113 indiniduen CR haplotipoen MJ sarean (4.3. Irudia) dagokien espeziearen taldekapenetik kanpo ageri diren 24 sekuentzien informazioa: GenBanken ageri duten espezie izena; 4.3. Irudia-n taldekatzen direneko espezie-taldea.

#	GenBank-eko espeziea	Zein espezetan taldekatzen den	GB id. zenbakia
1	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AF390419
1	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650620
2	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AF390379
2	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AF390370
2	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650465
2	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650452
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AF390384
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AF390425
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650713
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650425
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	DQ087541
3	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	DQ087593
4	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650502
4	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650740
5	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650544
6	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY650659
7	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY699942
8	<i>T. thynnus</i>	<i>T. alalunga</i>	AY699946
9	<i>T. orientalis</i>	<i>T. thynnus</i>	GU972554
10	<i>T. orientalis</i>	<i>T. thynnus</i>	GU972555
11	<i>T. thynnus</i>	<i>T. albacares</i>	DQ087564
12	<i>T. thynnus</i>	<i>T. albacares</i>	DQ087565
13	<i>T. alalunga</i>	<i>T. albacares</i>	JN007604
14	<i>T. alalunga</i>	<i>T. orientalis</i>	KP412767

Thunnus generoaren espeziatio eta kladogenesis gertaeren datazioei dagokienean, 4.4. Irudiak %3,6 eta %11-ko dibergentzia tasak aplikatuta lortutako datak irudikatzen ditu CR-ko 2.113 sekuentziak erabilita. Lehen adarkatzea hegaluzearen eta Pazifikoko atungorria gainontzeko espezieengandik banatu zirenean gertatu zen, orain dela 4,5 eta 1,5 Ma artean. Gure estimazioen arabera, (a) hegalaburraren haplotipoak Pazifikoko atungorritik bereizi ziren (orain dela 0,8 eta 0,3 Ma), generoko banaketa berriena delarik hau. 4.4. Irudiko hegalabur sekuentziek (a) 4.3. Irudian hegaluzearen eta Pazifikoko atungorriaren artean talde txikia osatzen dute, (b) hegalabur klado nagusitik hurrun. Generoko bigarren adarkatzea lehenengotik gutxira gertatu zen, moja tuna banatzean orain dela 4,0 eta 1,3 Ma artean. Hala ere, hurrengo espeziatio gertaerak eta haplotalde

bereizketak, tongol eta moja atunetan, 2,7 eta 0,7 Ma artean gertatuko lirateke. Bukatzeko, denboran askoz ere laburrago (1,0 eta 0,3 Ma artean) hegaluzeko haplotaldeen arteko banketa jasoko zen.



4.4 Irudia. ML zuhaitz filogenetikoa 2.113 CR sekuentzia mitokondrialak irudikatuz (344 bp), espeziaioa eta kladogenesi gertaeren datazioak %3,6 eta %11 dibergentzia tasetan oinarrituta. *T. thynnus* (a) eta *T. thynnus* (b) *T. thynnus*-en bi taldekapenak dira (4.3. Irudian bezala).

4. Eztabaida

4.1. Hegaluzearen populazio egitura DNAm-tan oinarrituta

Bost eskualde mitokondrialen (CR, 12S, 16S, Cyt *b* eta COI) eta SNP mitokondrialen analisiek hegaluzean bi haplotalde desberdin daudela agertu zuten, Viñas *et al.*-ekin (2004) bat eginez, zeintzuek bi filotalde definitu zituzten CR sekuentzien bidez, eta baita Chow & Ushiyama-rekin (1995) ere, hauek RFLP-en maiztasunetan oinarrituta laginak bi talde handitan banatu zituzten. 160 CR sekuentzien azterketaren arabera, estimatutako datazioek haplotalde biak duela 1,0-0,3 Ma inguru banatu zirela adierazten dute (3.4. Irudia).

Hirugarren ikerlanean A haplotaldeak batez besteko distantzia genetiko txikiagoak (0,034) agertu zituen B haplotaldearen aldean (0,053), honek adierazten du A haplotaldea B haplotaldetik abiatuta sortu zitekeela. Haplotaldeen maiztasunek banaketa geografiko diferentzialak agertu zituzten: Mediterraneo itsasoan eta ozeano Atlantikoan A haplotaldearen maiztasunak %85,6 eta %91,1 artekoak ziren, ozeano Pazifikoan aldiz, %63koa (4.2. Taula). Egungo haplotaldeen banaketa eboluzio alopatriko batetik eratorritakoak izan daitezke, beste eskonbrido espezie batzuetan deskribatua izan den bezala (Alvarado Bremer *et al.* 1995, 1998; Chow *et al.* 2000).

Hala ere, haplotaldeen banaketa asimetrikoa izanda ere, haplotaldeen egungo banaketa lortzeko beharrezkoa litzatekeen ondorengo fluxu genetikoa ez da SNP mitokondrial eta nuklearrek agertzen dituzten distantzia genetiko handiekin bateragarria. Honek espeziearentzat bestelako egoera filogeografiko alternatibo bat planteatzera garamatza. Hipotesi alternatiboa jarraitutasun filogenetiko eta banaketa espazial partzial batean oinarritzen da, Avise *et al.*-en (1987) “V. kategoria” bezala definitua, hain zuzen ere, tarteko fluxu genetiko mailak dituzten espezieekin bat datorrena. Hipotesi honi jarraiki haplotaldeen agerpena haplotipoen desagertze estokastikoetatik abiatuta sortuko zen, gerora, Atlantiko eta Indo-Pazifikoren arteko isolamendu partzialak leinuen arteko banaketa bimodal desberdinerako bidea emango luke (Slatkin & Hudson, 1991; Harpending *et al.* 1998).

Aitzitik, Mediterraneoan lortutako emaitzak egoera demografiko honetako salbuespena lirateke, hala ere, egoera honetan populazio guztiek tamaina erlatiboki handia eta egonkorra mantenduko zuketena. Alde batetik, haplotalde bakoitzeko CR eskualdean mutazioen pilaketek (4.5. Taula), bestetik Mediterraneoan indibiduen %34,9-a haplotipo eskusibo bakarrean agertzeak (4.4. Taula) eta azkenik SNP nuklearrekin lortutako populazioen arteko desberdintzapen maila altuek (lehenengo eta bigarren ikerlanak), Mediterraneo itsasoa espeziearen populazio bereziena dela adierazten dute. Datu hauek adierazten dutenez, Mediterraneoan bi haplotaldeen agerpenaren (1,0-0,3 Ma) osteko desberdintzapen prozesua gertatu izan zitekeen. Populazio hau isolatuta geratuko litzateke Pleistozenoko azken gertaera glaziarrean, ziur aski Riss edo Würm glaziazioan zehar, belarrianean (*Xiphias gladius*) deskribatu den modu berean (Alvarado-Bremer *et al.* 1995).

SNP mitokondrialetan oinarritutako stock arteko desberdintasun genetikoaren (Φ_{ST}) emaitzak (4.6. Taula) goian planteatutako egoerarekin bat datoz, izan ere, Mediterraneoan desberdintzapen maila altua eta ozeanoen barneko homogeneotasuna eta haien arteko heterogeneotasuna nabarmentzen baitituzte. Laburbilduz, genoma mitokondrialeko eskualde kodetzaileko SNPek lau populazio antzeman zituzten hegaluzean: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, ozeano Indikoa eta ozeano Pazifikoa, emaitza hau bat dator lehenengo eta bigarren ikerlaneko SNP nuklearrek emandako emaitzekin.

Emaitza hauetan oinarrituta ondorioztatu daiteke hegaluzearen egitura lau populazioetan oinarritzen dela. Esan daiteke Montes *et al.*-en (2012) mikrosateliteetan oinarritutako emaitzek, hein handi batean behintzat, genoma nuklearreko SNPen emaitzeko (lehenengo eta bigarren ikerlanak)

eta SNP mitokondrielen emaitzekin (hirugarren ikerlana) bat dutozela. Dena den, egitura hau ez da ikusten bost eskualde mitokondrialen (5112 bp) ezta CR eskualdeak (344 bp) aztertzean, batez ere lagin kopurua txikiagoa zelako (n=38 eta n=160, hurrenez hurren, eta n=1.254 SNPen kasuan) eta gainera, CR eskualde hiperaldakorreko SNPak ezin izan zirelako erabili. Azken finean, hegaluzearen populazio egitura deskribatzeko gai den SNP mitokondrialen panela argitaratzea posible izan da, eta zentzu honetan, interesgarria litzateke markatzaile hauek generoko beste espezieetan aplikatzea helburu berdinarekin.

4.2. *Thunnus* generoaren eboluzioa

Collette-k (1978) ezaugarri morfoekologikoetan oinarritutako *Thunnus* generoaren banaketa *Neothunnus* eta *Thunnus* subgeneroetan, ez dator lan honetan proposatutako generoaren filogeniarekin bat. Hirugarren ikerlaneko emaitzak sekuentzia mitokondrialak (Chow & Inou 1993; Chow & Kishino 1995; Viñas & Tudela 2009; Tseng *et al.* 2012) edo nuklearrak (Chow *et al.* 2006) aztertu dituzten lanekin bat datoz. Hirugarren ikerlaneko emaitzen arabera, lehendabizi hegaluzea eta Pazifikoko atungorria banatu ziren, generoko talderik aitzinekoena osatuz. Ondoren, *Neothunnus* subgeneroko espezieak taldekatu ziren (atun hegats-beltza (*Thunnus atlanticus*), atun hegats-horia (*Thunnus albacares*), tongol atuna (*Thunnus tonggol*)), eta *Thunnus* subgeneroko gainontzeko espezieengandik (hegalaburra, hegoaldeko atungorria (*Thunnus maccoyii*) eta moja atunetik (*Thunnus obesus*)) desberdindu ziren. Beraz, lan honek *Neothunnus* subgeneroaren jatorri monofiletikoa babesten du baina *Thunnus* subgeneroa parafiletikotzat jotzen du, gaur egun definituta dagoenaren arabera.

Bestalde, *Thunnus* generoko espezieen CR sekuentzia kopuru handia aztertzean, printzipioz espezie jakin batekoak ziren zenbait haplotipo ez ziren haien espezieko beste kideen artean ageri, beste espezieetako haplotaldeetan baizik. Indibiduo hauen taldekapen “nahasia” indibiduoek genoma mitokondrialak, genoma nuklearrari dagokion espezie desberdin batena dutenean gertatzen da, hau da, “hibridoak” lirateke (4.3. eta 4.4. Irudiak). *Thunnus* generoan hibridazio (edo introgresio) gertaerak hainbat egilek deskribatu dituzte (Chow & Kishino 1995; Carlsson *et al.* 2004; Alvarado Bremer *et al.* 2005; Lowenstein *et al.* 2009; Viñas & Tudela 2009). Aipatzekoak dira hegalaburraren eta Pazifikoko atungorrien eta hegaluzearen sekuentzien kokapena. Doktorego-tesi honetan hegaluzearen DNAm-aren introgresioa proposatzen dugu hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunean. Alde batetik, Pazifikoko atungorriaren haplotipo gehienak eta hegalaburraren zenbait haplotipo hegaluzearen sekuentzien alboan kokatzen dira (4.3. Irudia), honek adierazten du hiru haplotipo taldekapen hauek *Thunnus* generoko lehen espezie banaketatik eratorriak direla. Bestalde, hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arteko kontaktu gunerik ez egoteak hauen artean berriki gertatutako introgresio gertaera baztertzin dute, honek adieraziko luke Pazifikoko atungorriaren bi sekuentziak (4.3. Irudiko 9. eta 10. zk) hegalaburraren haplotaldean (b) aurkitzea antzinako gertaera introgresibo baten emaitza dela. Azkenik, orain gutxire arte hegalaburra eta Pazifikoko atungorria espezie berekotzat jotzea (Collette 1999) fenotipikoki ez

direlako desberdintzen, eta ITS1 sekuentzia nuklearrak partekatzeak (Chow *et al.* 2006) espezie hauek duela denbora gutxi arbaso komuna izan zutela iradokitzen dute.

Hegaluzetik gertu dauden hegalabur haplotipoen aniztasun genetiko txikiagoak hauek introgresio historikotik eratorritakoak direla erakutsiko luke. Hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arteko arbaso komunetik datorren DNAMt-a, aldiz, hegalaburraren (b) haplotaldearena litzateke, *Thunnus* generoko espezie gehienekin batera kokatzen dena. Zentzu honetan, hegalabur haplotipo (a) taldekapenak eta Pazifikoko atungorrien haplotipo gehienak haplotipo zentral eskas batzuk eta periferikoki luzatzen diren haplotipo gehiago agertzen dituzte aurrekoekin alderatuz gero. Orokorki, mota honetako itxurak indibiduo gutxi batzuetatik abiatutako fundatzaile efektuekin lotzen dira. Ebidentzia hauetan oinarrituta, badirudi gaur egun ageri diren hibridazioak hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunaren ar eta hegaluzearen emeen artean gertatu zela. Hibridatutako Pazifikoko atungorri eta hegalabur hauek gerora gurutzatzeak hegaluzearen mitokondriak bi espezie hauetan irautea bermatu zuen.

Hibridazio prozesua *Thunnus* generoan arrunta dela dirudi, horrela erakusten dute fenotipikoki ez dagokien beste espezie baten kladoan taldekatzen diren hiru espezieetako 24 sekuentziek (4.3 Irudia eta 4.6. Taula). “Tokiz kanpo” dauden sekuentzia hauen dibergentzia denbora dauden kladoko gainontzeko sekuentzien berdina da (aurretik deskribatutako hegalabur eta atungorri sekuentzietan ezik), honek introgresiboak erlatiboki berriak direla erakutsiko luke. Hauen artean hegaluzearen haplotaldean ageri diren 18 hegalabur sekuentziak eta atun hegats-horiaren haplotaldean ageri diren bi hegalabur sekuentziak nabarmentzen dira. Hauek, ziurrenik, hegalabur ar eta hegaluze emeen (n=18) eta atun hegats-hori (n=2) emeen arteko, duela denbora gutxiko, hibridazioen ondorengoak dira.

Arrainen CR-arentzat proposatutako %3,6 dibergentzia Ma-ko tasa (Donaldson & Wilson 1999) duen erloju molekularra asumitzean hegaluzearen gainontzeko espezieekiko banaketa orain dela 4,5 Ma gertatuko zen. Orain dela 2,7 eta 2,1 Ma artean gainontzeko espezieen sorrera ahalbidetuko zukeen prozesu kladogenetikoa gertatuko zen, eta epe honetan ere bi leinu mitokondrialak sortuko ziren moja atunean eta tongol atunean. Tarte honetan gertatuko zen hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunaren sorrera ere, sorrera horretatik gutxira hegaluzearen DNAMt-a aipatutako espezieen arbaso komunean introgresatuko zen aurretik deskribatu bezala. Bestalde, hegaluzearen hurbileko haplotipoen arteko desberdintasun genetikoek (4.3. Irudia) hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arteko dibergentzia 0,8 Ma-ean datatzea ahalbidetzen dute. Ziur aski Pleistozenoko garai interglaziar batean gertatuko litzateke, itsasoko tenperatura eta itsaso-mailak gora egin eta atun espezieak Artikoan zehar mugitu zitezkeenean. Hegalaburrean topatutako aniztasun genetiko altuagoak iradokitzen duenez, bi espezieen arbaso komuna Atlantikoan biziko zen eta fundatzaile efektu baten ostean ozeano Pazifikoa populatu eta Pazifikoko atungorria sortaraziko luke.

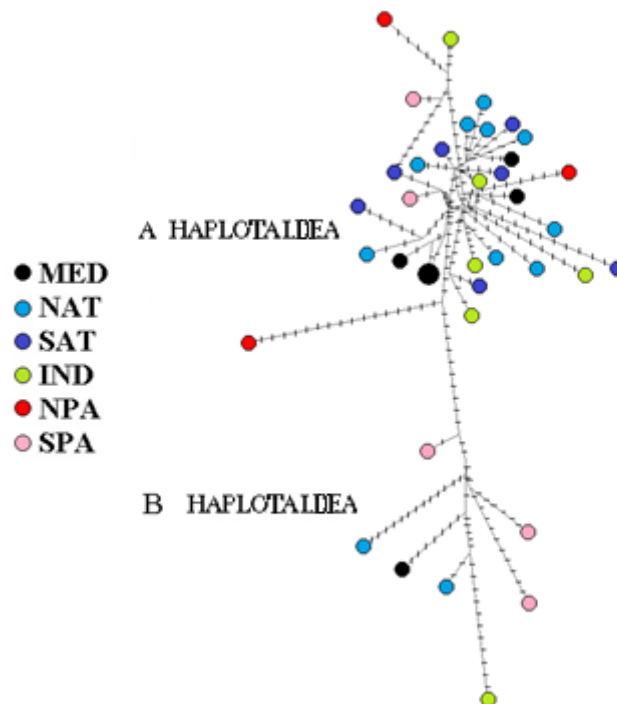
Esker onak

Egileek UPV/EHU-ko SGikerren giza babesa eta teknikoa eskertzen dute. Hurrengo institutuei eskertzen diegu laginak emateagatik: South African Institute for Aquatic Biodiversity (SAIAB, Hego Afrika), Galway-Mayo Institute of Technology (GMIT, Irlanda), Instituto Español de Oceanografía (IEO, Espainia). Eskerrik asko ere E. Jimenez, M.A. Pardo, I. Fraile, I. Arregi, J. Lopez, J. Filmarter, J. Areso, A. Delgado, D. Brophy, K.Schaefer, D. Fuller eta V. Allain laginketan laguntzeagatik.

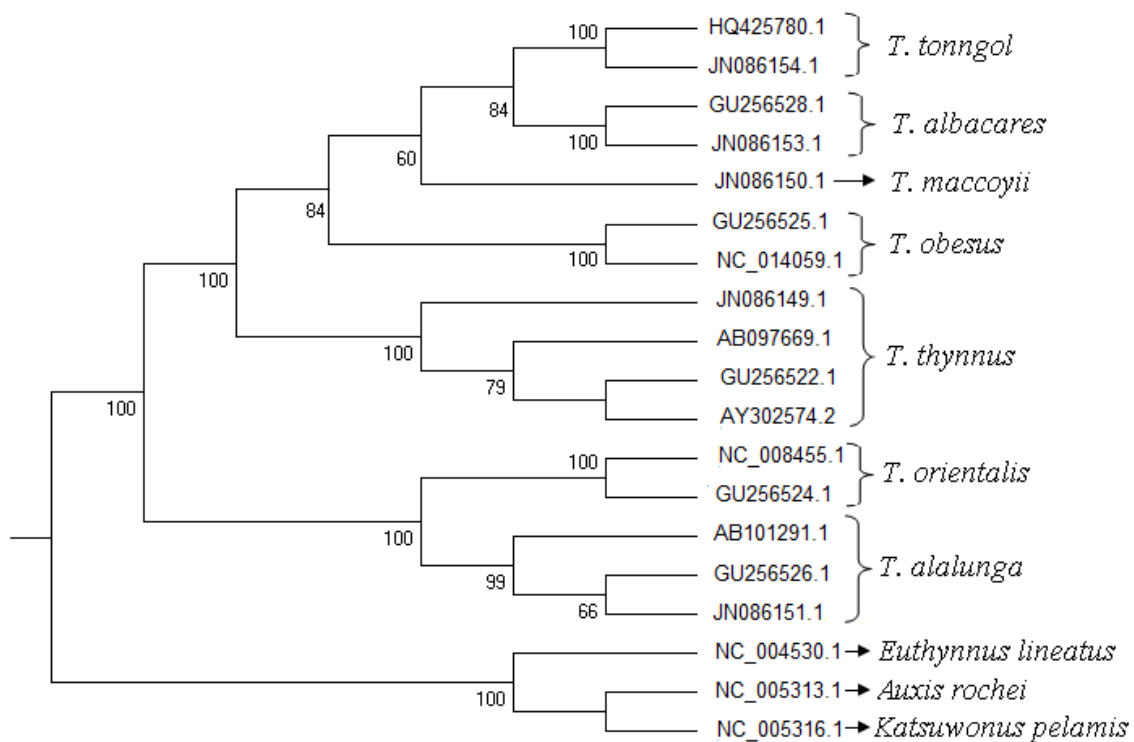
Material osagarria

S4.1. Taula. Hiru analisietan erabilitako espezie bakoitzeko indibiduoak: DNAm-t osoak, 5 eskualdeak (Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR) and 344 bp-ko CR sekuentziak (CR). Haplotipo kopurua (nh), haplotipo dibertsitatea (h) eta dibertsitate nukleotidikoa (π) kalkulatuak CR sekuentzietarako.

	DNAm-t osoa	5 eskualdeak	CR			
	N	N	N	nh	h	π
<i>Thunnus obesus</i> (BET)	2	2	1052	744	0,999	0,057
<i>Thunnus thynnus</i> (BFT)	4	4	630	311	0,992	0,031
<i>Thunnus alalunga</i> (ALB)	3	41	274	224	0,995	0,041
<i>Thunnus tonggol</i> (LOT)	2	2	93	84	0,998	0,043
<i>Thunnus orientalis</i> (PBF)	2	2	32	7	0,593	0,037
<i>Thunnus albacares</i> (YFT)	2	2	22	18	0,983	0,027
<i>Thunnus maccoyii</i> (SBF)	2	2	5	4	0,900	0,042
<i>Thunnus atlanticus</i> (BLF)	-	-	5	5	1,000	0,041
Guztira	17	55	2.113			



S4.1. Irudia MJ sarea Cyt *b*, COI, 12S, 16S eta CR (5,112 bp) sekuentziak erabiliz osatuta 38 hegalezetarako. Haplotipoen jatorrizko stock-ak koloreen bidez adierazita (ikusi testua). Mutazioak gidoi bidez adierazita.



S4.2. Irudia. ML zuhaitza 16 *Thunnus* generoko 7 espezieren GenBank-eko sekuentzia mitokondrial osoak erabilita. *Katsuwonus pelamis*, *Auxis rochei* eta *Euthynnus lineatus* kanpo talde legez gehitu ziren. Adarretan %50etik gorako bootstrap balioak soilik ageri dira.

VI. Kapituluua



Eztabaida orokorra

EZTABAIDA OROKORRA

Naturaren Kontserbaziorako Nazioarteko Batasunaren (IUCN) irizpideen arabera eskonbrido espezieen eta bela-arrainen %18aren inguruko datuen urritasunak ebaluazio egokia oztopatzen du. Espezieen %64a “Kezka Baxuko” egoeran dago, %7a “Ia Mehatxatu” egoeran eta %11a “Mehatxatutako” egoeratako batean dago (iraungitze arrisku larrian, mehatxatua edo kaltebera) (Collette *et al.* 2011). Gaur egun, hegaluze eta hegalabur stock gehienak gehiegizko ustiapen egoeran daude (Collette *et al.* 2011). Gehiegizko ustiapen egoera honek stock-en ebaluaziorako metodologia zehatzak garatzeko beharra areagotu egin du, zentzu honetan, kudeaketa unitateen – stock-en– mugaketak espeziearen benetako populazio egiturarekin bat etorri beharko luke. Izan ere, errendimendu jasangarrira bideratutako ustiapenak espeziearen dinamika eta ekologia kontuan hartzeaz gain, egitura genetikoa ere aintzakotzat hartu behar du. Zentzu honetan, hegaluzea hainbat ikerketa taldek aztertu dute, gureak barne. Ikerlan hauek ozeano arteko heterogeneotasuna antzematen dute, nahiz eta populazio ordezkapena eta markatzaile kopurua ez izan gure lanetan aurkeztutakoa bezain bestekoa.

Gehiegizko ustiapen arriskuak eratorritako produktuen jatorria kontrolatzeko eta babeserako neurriak hartzea dakar. Gainera, ozeano Atlantikoko hegaluzea oso baloratua dago merkatuan berezko irmotasun eta zapoeragatik, hala ere, mundu mailako harrapaketen %20a soilik suposatzen du. Hori dela eta, etiketatuan eta harrapaketen lehorreratzeak aitortzean iruzurra gertatzeko arriskua dago, eta iruzur honek garrantzi ekonomia izugarria izan dezake. Praktika bidegabe hauek kontsumitzaileari iruzur egiteaz gain stock-aren ebaluaketa zaildu egiten dute, agerian utziz arrantzaren eta eratorritako produktuen jatorria egiaztatzeke babes neurriak ezartzearen beharra. Zentzu honetan, hegaluzetik eratorritako produktuen jatorria kontrolatzeko aurrerapena suposatzen duten lanabesen diseinua eta sendotzea guztiz beharrezkoak dira eta DNA-lanabesak jatorri geografikoa esleitzeko helburu honetan oso erabilgarriak dira. Gaurdaino egindako ikerlan genetiko gehienak espezie mailako bereizpenaren ingurukoak dira, eta populazioak bereizten dituen metodo bakarra (18 SNP erabiltzen dituen ES 2 392 293 B1 Patentea) hobetu daitekeen lanabesa da.

Bestalde, *Thunnus* generoko lotura filogenetikoak ebatzi gabeko gaia izaten jarraitzen du (Alvarado Bremer *et al.* 1997; Tsen *et al.* 2012) eta *Thunnus* genero barneko espeziazio gertaeren datazioak nekez topa daitezke. Eskualde mitokondrial desberdineko sekuentzia kopuru handi baten azterketak *Thunnus* generoaren historia ebolutiboa eta *Thunnus* eta *Neothunnus* subgeneroen inguruko eztabaida taxonomikoa argitzen lagunduko du. Ezinbestekoa da behin betiko ebaztea generoaren banaketa hau datu genetikoek sustengatzen dutenentz.

Aurrekoa kontuan izanik, eta populazioen egitura globalki ikertzen duten hegaluzean oinarritutako ikerlan genetikoaren gabezia ikusirik, Doktorego-tesi honetan planteatutako lehen helburu orokorra hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) banaketa osoko egitura genetikoa

karakterizatzea izan da. Helburu hau lortze bidean sortutako jakintza espeziearen kudeaketa unitateak mugatzeko baliagarria da, baita hegaluzearen jatorri geografikoa egiaztatzeko sistema garatzeko ere. Bigarren helburu orokorra *Thunnus* generoaren historia ebolutiboaren inguruko jakintzan sakontzea izan da, bai espezieen arteko lotura filogenetikoaren inguruan bai eta espeziatio eta kladogenesi gertaeren datazioen inguruan ere.

Doktorego-tesi honetan lortutako emaitzak lau ikerlanetan bildu dira. Lehenengo eta bigarren ikerlanetan, DNA nuklearraren ikuspegitik, hegaluzearen aniztasun genetikoa eta populazio egitura argitu ahal izateko baliabide genetikoak garatu dira. Hirugarren ikerlana, DNA mitokondrialetik eratorritako baliabide genetikoetan oinarrituta, hegaluzearen populazio egitura eta *Thunnus* generoaren barneko lotura filogenetikoak argitzea du helburu. Azkenik, laugarren ikerketa, espeziearen populazio desberdinen jatorria egiaztatzea bilatzen duen lanabes genetiko baten aplikazioa da.

- Lehenengo ikerlana: **SNP aurkikuntzak hegaluzearen eta hegalaburraren mundu mailako populazio egitura argitzen laguntzen du.**

Ikerlan honek lehendabizikoz deskribatzen ditu SNP nuklearrak hegaluzean, eta hauek aplikatuz karakterizatzen du espeziearen egitura genetikoa. Gainera, espezie arteko anplifikazio gurutzatuaren bidez, deskribatutako hainbat SNP hegalaburrean balioztatu dira. SNPak aurkitzeko metodoak Sanger sekuentziazioan oinarritu ziren lan honetan. Populazioen genetikaren ikerketarako, ICCATek deskribatutako hegaluzearen sei stock-en eta hegalaburraren bi stock-en laginak aztertu dira, 460 hegaluze ale eta 107 hegalabur ale guztira. Stock-en arteko desberdintasunak topatu genituen, gutxienez lau stock definituz hegaluzean eta bi hegalaburrean.

- Bigarren ikerlana: **SNP markatzaile berriek hegaluzearen (*Thunnus alalunga*) egitura genetikoa eta populazioaren tamaina efektiboa argitzen dituzte.**

Ikerlan honetan sekuentziazio masibo bidez hegalaburraren transkriptoman aurkitutako SNP nuklear berriak karakterizatu dira hegaluzean. Hegaluzean zentratutako lan honetan, markatzaile SNP berriak aplikatzeaz gain, lehenengo ikerlanarekin alderatuz, ikertutako indibiduo kopurua nabarmenki handitu da eta 24 urtetako aldea duten laginak gehitu dira, guztira 1.331 indibiduo eskuratuz. Honek, aurreko ikerketan proposaturiko egitura frogatzeaz gain, ipar Atlantikoko hegaluzearen tamaina efektiboaren estimazioa burutzea ahalbidetu du. Honen harira, emaitzek stock-aren aniztasun genetikoa, eta ondorioz, egokitzapen potentziala ez direla kaltetuak suertatu adierazten dute.

- Hirugarren ikerlana: **Mundu mailako hegaluze (*Thunnus alalunga*) stock-en arteko lotura filogeografikoak eta *Thunnus* generoaren lotura filogenetikoak DNA mitokondrialean oinarrituta.**

Ikerlan honetan hegaluzearen 5 gene mitokondrialen sekuentzia eta 10 SNP mitokondrial analisatu dira. Genbank datu-basean eskuragarri dauden *Thunnus* generoko espezie guztien sekuentziak ere kontuan hartu dira. Azterketa filogeografiko bidez hegaluzean bi haplotipo desberdintzatu dira, bien maiztasunek distantzia geografikoarekin lotura agertu dituzte, Mediterraneoak izan ezik, honek oso isolamendu maila handia baitu. Gainera, SNP mitokondrialen analisisiek SNP nuklearrekin lortutako emaitzekin bat egiten dute lau populazio desberdintzean: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, Indikoa eta ozeano Pazifikoa ($\Phi_{ST} = 0,038-0,199$). Bestalde, *Thunnus* generoko 8 espezieetan aipatutako bost eskualde mitokondrialen eta genoma mitokondrial osoaren azterketak, gaur egun onartutako *Neothunnus* eta *Thunnus* subgeneroen bereizketa datu molekularretan ez dela oinarritzen agertu du. Analisi hauek hegaluzea espezie aitzinekoena dela agertu dute, orain dela 5,5 Ma berezia. Azkenik, emaitzek agerian jartzen dute duela gutxiko hibidazio eta hibridazio historikoen gertaera generoko espezien artean. Zentzu honetan, emaitzek hegaluzearen DNAm-ta Atlantikoko (*Thunnus thynnus*) eta Pazifikoko atungorriaren (*Thunnus orientalis*) arbasoan introgresatu zela agertu dute. Gertaera introgresibo honen ondoren, orain dela 0,8 Ma gutxi gorabehera, fundatzaile efektu baten ostean, bi hegalabur espezieen arbasoak Pazifikoa populatu eta gero Pazifikoko atungorria sortuko zen.

- Laugarren ikerlana: **Hegaluzearen jatorria egiaztatzeko SNPetan oinarritutako trazabilitate lanabes genetikoak.**

Hirugarren ikerlana hegaluzearen eta eratorritako produktuen jatorri geografikoa esleitzera bideratutako markatzaile genetikoaren erabileraren adibide praktikoa da. Hau da, trazabilitaterako lanabes baliagarri bat garatu da hegaluzearentzat, produkzio katean erraz aplikatu daitekeena. Lanabesa 32 SNP markatzailez osatua dago: 30 lehenengo, bigarren eta laugarren ikerlanetatik aukeratuak eta 2 SNP mitokondrial osagarri, aurretik deskribatuak, hegaluzea gainontzeko *Thunnus* espezieengandik bereizteko. Proposatutako metodoa gai da Atlantiko, Mediterraneo eta Indo-Pazifikoko populazioetako jatorria zuten hegaluzeen %68a bereizteko, %100eko asmatzeko probabilitateaz.

1. SNP markatzaile aurkikuntza hegaluzean

Hegaluzearen egitura genetikoak aztertu zuten lan molekularrek alozimak (Suzuki, 1962; Serene, 1969; Hallaire y Dao, 1971; Hue, 1979; Pujolar *et al.* 2003), RFLP (Chow & Ushiana, 1995) eta odol-taldeak (Arrizabalaga *et al.* 2004) erabili zituzten. 80. Hamarkadatik aurrera ikerketa lan gehienak sekuentzia mitokondrialak, eta neurri txikiago batean nuklearrak, (Graves & Dizon

1989; Viñas *et al.* 1999; Viñas *et al.* 2004; Nakadate *et al.* 2005) eta baita mikrosateliteak ere (Takagi *et al.* 2001; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012) ikertu zituzten. Aitzitik, SNP markatzaileak mikrosatelite eta DNA sekuentziak ordezkatzen ari dira ikerketa alor ezberdinetan dituzten abantailengatik, hala nola ekologian, kontserbazioan eta akuikulturan (Brumfield *et al.* 2003; Morin *et al.* 2004). Hala ere, organismo ez-ereduentzat, hegaluzea kasu, genomaren sekuentzia osoaren informazio eza mugarrria izan da SNP aurkikuntzan. Horregatik erabili ditugu zoriz anplifikatutako zatien sekuentziario konparatiboa bezalako metodologiak hegaluzean (McLenachan *et al.* 2000; Bensch *et al.* 2002).

Doktorego-tesi honetan hiru hurbilketa metodologiko erabili dira hegaluzean guztira 751 SNP aurkitzeko:

1.- EPIC-PCR metodologia (Exon-Primed Intron-Crossing) (Palumbi y Baker, 1994; Lyons *et al.* 1997; Shubitowski *et al.* 2001; Primmer *et al.* 2002) *Thunnus* generoaren eta bestelako teleosteo espezieen sekuentzietatik abiatuta (GenBank eta Ensembl datu baseetan eta bibliografian aurkitutakoak) (lehenengo ikerlana).

2.- Teleosteotan (lehenengo ikerlana) eta *Thunnus* generoan (lehenengo eta hirugarren ikerlana) kontserbaturik dauden sekuentzietan oinarritutako hasle endekatuen bidez lortutako hegaluze genomaren zatien sekuentziario konparatiboa.

3.- Espezie arteko anplifikazio gurutzatua (*Cross species amplification*) hegalaburrean aurkitutako SNPen bidez (hirugarren ikerlana).

Modu honetan, aipatutako lehenengo bi estrategien bidez hegaluzearen genomaren barreiatutako 54 sekuentzia berri lortu ziren: 19 eskualde introniko EPIC-PCR metodologia bidez, 17 hasle endekatuen bidez eta 18 eskualde *Thunnus* generoko sekuentzietan oinarritutako hasleen diseinuen bidez. Gainera, Hardy-Weinberg orekan (HWE) zeuden 67 SNP nuklearrez osatutako panel balioztatua sortu zen, 41 SNP markatzaile independente jasotzen ziren bertan (32 SNP indibidual eta 9 haplotipo-multzo). Bestalde, 54 sekuentzia bakoitzetik SNP bakarra edo haplotipo-multzo bakarra hautatu zen markatzaileen arteko independentzia bermatze aldera.

Hirugarren estrategia aplikatzerakoan beste 75 markatzaile nuklear balioztatu ziren, independenteak eta HWE. Hauen artean bi SNPek osatutako haplotipo-multzo bakarra dago.

Estrategia guztiek SNP neutralen aurkikuntza bermatzen dute, oinarrizkoak jito genetiko eta fluxu genetiko bezalako prozesu ebolutiboak estimatzeko, estimazio hauek desbideratuak suerta daitezke hautespenaren menpeko markatzaileak erabiliz gero (Beaumont & Nichols, 1996; Laval *et al.* 2010). Aplikatu ohi diren populazioen genetikako teoria konbentzionalek eta estatistiko gehienek markatzaileen neutraltasuna asumitzen dute, hortaz, hiru estrategia hauek baliagarriak

ziren hegaluzearen populazio egitura aztertzeko. Berez, lan honetan guztira aldakuntza neutrala zuten 96 (38+58) markatzaile nuklear eta 9 markatzaile mitokondrial aurkitu ziren.

Hala ere, bigarren eta hirugarren estrategien bidez aztertutako genomako eskualde oso kontserbatuak dira teleosteo edo tunidoetan. Horregatik, hautespenaren menpe egoteko joera izan dezakete, funtzioen bat izan dezaketen neurrian. Hain zuzen ere, aztertutako 41 markatzaile nuklearretatik hiru dira hautespen dibertsifikatzailearen menpe egon litezkeenak. Modu berean, hirugarren estrategiak hegalaburraren transkriptomatik eratorritako SNPak sortu zituen. SNPak bi tunido espezieen transkriptoman kontserbaturik egoteak tunidoentzat garrantzitsuak izan daitezkeen prozesu biologikoetan parte hartzen duten SNP funtzionalak aurkitzea ahalbidetzen du. Hain zuzen ere, 75 SNPetatik 17 dira hautespen orekatzailearen menpe egon litezkeenak

Markatzaile nuklearrez gain, hirugarren ikerlanean beste bost eskualde mitokondrial sekuentziatu ziren gaur egun definitutako 6 stock-etako 38 hegaluzetan (190 sekuentzia guztira), eta 159 SNP mitokondrial deskribatu ziren. Hauetatik 10 sailkatu ziren eta 9 balioztatu. Genoma mitokondrialaren informazioa baliabide ebolutibo baliagarria eta nuklearrarekiko osagarria da, denbora eskala desberdin bati egiten baitio erreferentzia (Bohonak & Vandergast 2011; Wang 2011).

Lortutako SNPen balioztatze portzentajeak egokiak izan ziren (%25-72). Gainera, balioztatutako SNP multzoa ez litzateke aurkikuntzatik eratorritako joerak baldintzatuta egongo, markatzaile aurkikuntzarako erabilitako laginak stock guztietakoak baitziren. Honek, lan honetan plazaratutako markatzaileak mundu mailako etorkizuneko ikerketetarako baliagarriak izatea bermatzen du.

Esan daiteke beraz, aurretik aipatutako estrategiak egokiak eta eraginkorrak izan zirela. Laburbilduz, guztira hegaluzearen genoma mitokondrialaren eta nuklearraren 163 erreferentziazko sekuentzia sortu eta mundu mailako 137 SNPen aldakuntza aztertu zen. Modu honetan, espezie ez-eredu honen genomaren estaldura zabaldu eta populazioen genetikarako baliagarri diren markatzaile ugari sortu dira, neutralak eta hautespenaren menpekoak. Hala eta guztiz ere, aipagarria da kostu ekonomiko eta tenporal aldetik ez direla estrategia ezin hobeak gaur egun garatzen ari diren Belaunaldi Berriko Sekuentziekin (NGS) alderatuz gero. Metodologia hauek SNP eta mikrosatelite gehiago aurkitzea ahalbidetzen baitute denbora laburragoan, kostuak gutxituz eta analisiak automatizatuz (Seeb *et al.* 2011).

2. Hegaluzearen egitura genetikoa

Populazioaren tamaina handiak eta migrazio-ahalmen handiak espezie itsastar askotan populazioen arteko desberdintasunak ahulak izatea eragiten dute, batez ere ur gezako eta espezie anadromoekin alderatuz gero (Waples 1998; DeWoody & Avise, 2000). Hala ere, ikerlan askok

deskribatu dute populazioen desberdintzapen esangarria espezie itsastar pelagikoetan (Carlsson *et al.* 2004; Castillo *et al.* 2004; Ruzzante *et al.* 2006; Gaggiotti *et al.* 2009; Poulsen *et al.* 2011).

Ustez desberdintzapen genetikoa txikia deneko kasuetan bi aspektu lantzea oso garrantzitsua da ikerlan baten plangintza egiteko orduan: 1) Espeziearen egituraketa genetikoa antzemateko nahikoa bereizmen maila duten markatzaile kopurua erabiltzea, eta egitura balego 2) populazio bakoitzeko adierazgarria den eta denbora tarte zabala hartzen duen lagin kopuru zabala lortzea.

Hegaluzearen populazio egitura aztertzen duten hainbat lagin dago, bai ikerlan meristiko eta morfologikoak (Godsil 1948; Kurogane & Hiyama 1959; Ishii 1965; Yeh *et al.* 1996) baita genetikoak ere. Hauetatik gehienek espeziearen banaketa partziala aztertu dute. Montes *et al.*-en (2012) lanarekin batera Doktorego-tesi honetako lehenengo, bigarren eta hirugarren ikerlanak dira espeziearen banaketa osoa aztertzen duten bakarrak. Modu honetan, lehenengo, bigarren eta hirugarren ikerlanek batera espeziearen ikuspegi genetiko globala eskaintzen dute. Espeziearen banaketa globala modu egokian irudikatzen duten laginak markatzaile kopuru egokiarekin aztertu dira, hiru SNP panelen bidez hain zuzen ere: bi nuklear (lehenengo eta bigarren ikerlanak) eta mitokondrial bat (hirugarren ikerlana).

Lehenengo, bigarren eta hirugarren ikerlanek aztertutako laginak lau populazio genetiko desberdinetan sailkatuak izan dira: 1) itsaso Mediterraneo 2) ozeano Atlantikoa 3) ozeano Indikoa eta 4) ozeano Pazifikoa. Bigarren ikerlanean egindako distantzia genetiko eta geografikoen artean egindako azterketan korrelazio esangarria topatu zen Atlantiko iparretik hasi, Indikotik pasata, eta ipar Pazifikora arte. Hala ere, Mediterraneoko laginak azterketan gehitzean korrelazioa ez zen esangarria suertatu (S3.1b irudia). Emaitza hauek distantzia-isolamendu eredua iradokitzen dute, non jito genetikoak fluxu genetikoaren efektua gailenduko luke distantzia geografikoa geroz eta handiagoa denean (S3.1b Irudia), Mediterraneorako izan ezik, ezohiko isolamendua agertzen baitu. Gainera, CR sekuentzien eta mitokondriako eskualde kodetzaileko SNPen azterketek hegaluzean bi haplotalde desberdin zeudela erakutsi zuten, zeintzuek maiztasunen banaketa desberdina duten (4.2. Taula). Banaketa honen azalpen posible bat haplotaldeen eboluzio alopatrikoan datza, baina honek ez du ematen hegaluzearentzat egoerarik egokiena. denik. Izan ere, gaur egungo haplotaldean maiztasunak lortzeko beharrezkoa litzatekeen ondorengo fluxu genetiko ozeano arteko distantzia genetiko altuekin bateraezina da, bai SNP mitokondrialekin (4.5. Taula) zein nuklearrekin ikusi denez (2.4. Taula eta 3.2. Taula). Hipotesi esplikatzailea honakoa litzateke: Atlantiko eta Indo-Pazifiko arteko isolamendu geografiko partzialeko egoeran haplotaldean banaketa bimodala (bi haplotalde edo leinu) sortuko litzateke haplotipoen desagertze estokastikoaren eraginez.

2.1. Mediterraneo itsasoa

Hala ere, hiru ikerlanetan Mediterraneoaren gainean lortutako emaitzek, populazio hau aurretik deskribatutako egoera demografikoan salbuespena izango litzatekeela adierazten dute.

Zenbait datuk adierazten dute, genetikoki behintzat, Mediterraneo delat populaziorik desberdinenena. Gainontzeko populazioekin alderatuz, Mediterraneo populazioaren desberdintzapen handia distantzia genetiko eta geografikoen artean egindako azterketan (S3.1. Irudia) nabari da, baina baita gainontzeko analisisietan ere. STRUCTURE eta GENELAND programen bidez egindako indibiduo mailako *clustering* analisisiek (2.3. Irudia eta 3.4. Irudia) eta Reynolds distantzietan oinarritutako dendogramak (3.3. Irudia) ere Mediterraneo itsasoko populazioa genetikoki urrunena dela adierazten dute. Honela, lehenengo eta bigarren ikerlanetan kalkulaturako F_{ST} balioek Mediterraneo itsasoko populazioa desberdinduena dela adierazten dute (2.4. Taula eta 3.2. Taula). Era berean, DNAm-tan oinarritutako analisisiek ere agerian usten dute Mediterraneoaren desberdintzapena gainontzeko populazioen aldean. Alde batetik, SNP mitokondrialentzat genotipaturako hegazuzeen %34,9ak Mediterraneoakoa eskusiboa den haplotipo (H10) bera dute (4.4. Taula). Bestalde, CR genearen sekuentziak alderatzean, Φ_{ST} balioak Mediterraneo gainontzeko populazioekin alderatzean soilik ziren esangarriak, eta sailkatutako SNP mitokondrialekin egindako analisisietan Mediterraneoak Φ_{ST} balioak altuagoak ziren gainontzeko populazioentzat baino (4.5. Taula).

Mediterraneo populazioaren desberdintzapena aurretik beste autore batzuek deskribatu zuten: Viñas *et al.*-ek (2004) DNAm sekuentzia bidez, Nakadate *et al.* (2005) DNAm sekuentzia eta RFLP nuklear bidez eta Davies *et al.* (2011) eta Montes *et al.* (2012) mikrosatelite bidez. Lan hauek Mediterraneo eta gainontzeko populazioen artean heterogeneotasuna deskribatu bazuten ere, Viñas *et al.*-ek (1999) DNAm sekuentzia bidez eta Pujolar *et al.*-ek (2003) alozima bidez, ez zuten desberdintasunik topatu Atlantikoa eta Mediterraneoaren artean, arrazoa lagin kopuru txikian legoke lehenengo kasuan eta markatzaileen bereizmen ahamen apalean bigarrean.

Bestalde, Mediterraneo barnean egituraketa topatu dute bi ikerlanek: Davies *et al.*-ek (2011) eta Montes *et al.*-ek (2012). Biek erabili zituzten mikrosatelite markatzaileak eta desberdintasunak aurkitu zituzten mendebaldeko Mediterraneo eta Mediterraneo zentralaren artean. Doktorego-tesi honetako bigarren ikerlanean aldiz, ez zen inolako desberdintzapen esangaririk aurkitu Mediterraneoak 7 laginen artean (3.4. Irudia), gainera, Mediterraneo barnean ez zen distantzia genetiko eta geografikoen arteko lotura esangaririk topatu (S3.1 Irudia).

Gainontzeko populazioekin alderatuz Mediterraneo hegazuzeak duen desberdintzapen genetiko maila altuak populazioak jasaten duen isolamendua islatzen du, hegazuzearentzat Gibraltar itsasarte fluxu genetikorako langa gogorra dela adierazten du honek, nahiz eta hegaburra eta ezpata-arraina bezalako espezie migratzaile batzuek itsas-langa hau zeharkatzeko gai izan (Block *et al.* 2005; Alvarado Bremer *et al.* 2005; Aranda *et al.* 2013). Markatze-berrantzemate lanek Mediterraneoaren isolamenduaren ideia babesten dute, hauek Atlantiko eta Mediterraneoaren arteko migrazioak nuluak direla adierazten baitute (Arrizabalaga *et al.* 2004). Alabaina, bigarren ikerlanean deskribaturako Mediterraneo barneko homogeneotasunak adierazten du Mediterraneo barneko beste langa ozeanikorik ez duela fluxu genetikoan etena suposatzen hegazuzearentzat. Dena den, zaila da jakitea Mediterraneo populazioak agertzen duen desberdintasun maila gaur egungo

fluxu genetikoaren etenaren ondorio soila den, edo eremu honetako hegaluzearen historia demografikoaren isla ere ba ote den. Kettle *et al.*-en (2011) esanetan, azken maximo glaziarrean (LGM), Mediterraneoak aterpea suposatu zuen hainbat itsas espezierentzat. Hipotesi honen arabera, Mediterraneoako populazioa fundatzaile-gertaera baten ondorioa izango litzateke, eta gerora gainontzeko populazioekiko denbora luzez isolatuta egonda, gaur egungo desberdintzapen maila lortuko luke.

2.2. Ozeano Atlantikoa eta ozeano Pazifikoa

Suzuki-k (1962) azterlan serologikoetan oinarrituta, Chow & Ushima-k (1995) RFLP bidez eta Takagi *et al.* -ek (2001) eta Montes *et al.*-ek (2012) mikrosatelite bidez, Atlantiko eta Pazifikoko arteko desberdintzapen handiak deskribatu zituzten.

Ozeano bakoitzaren barneko egituraketari dagokionez, Chow & Ushima-k (1995) ez zuten desberdintzapenik aurkitu hemisferio artean, Takagi *et al.*-ek (2001) eta Montes *et al.*-ek (2012) ordea bai. Takagi *et al.*-ek (2001) ipar eta hego Atlantiko artean desberdintzapen esangarriak topatu zituzten, baita Pazifikoko hiru laginen artean ere. Montes *et al.*-ek (2012) aldiz, ez zuten Atlantiko barnean azpiegituraketarik aurkitu, bai ordea, ipar eta hego Pazifikoko artean. Bestalde, mikrosateliteetan oinarritutako Davies *et al.*-en (2011) lanean azpiegituraketa tenporala eta espaziala topatu zuten ipar-ekialde Atlantikoan.

Doktorego-tesi honetako lehen, bigarren eta hirugarren ikerlanetan Atlantiko eta Pazifikoko ipar eta hego hemisferioak homogeenak eta gainontzeko populazioekiko independenteak ageri dira (2.3. Irudia; 3.4. Irudia; 4.5. Taula). Beraz, SNP markatzaile nuklear zein mitokondrialek adierazten dute ez dagoela ipar eta hego hemisferioen arteko fluxu genetiko oztopatzen duen langa ozeanikorik.

Bigarren ikerlanean Atlantikoa izan zen hobekien lagindutako eremua: 12 laginketa gune, 774 indibiduo eta 24 urteko alde maximo tenporala laginduz (3.1. Taula). 75 SNPetatik abiatutako analisisiek ez zuten egituraketa tenporal ezta espazialik antzeman Atlantikoan eta markatzaile neutralen F_{ST} balioek (3.2. Taula) ere Atlantikoko homogeneotasunaren hipotesia babesten dute. Ikerlan honetan lortutako egonkortasun tenporalak egituraketa genetikoaren inguruko emaitzen sendotasuna bermatzen du.

2.3. Ozeano Indikoa

Odol-taldearen ikerketaren bidez Arrizabalaga *et al.*-ek (2004) eta Montes *et al.*-ek (2012) mikrosatelite bidez, Indikoko laginak Pazifikokoengandik baino, Atlantikoengandik genetikoki hurbilago zeudela adierazi zuten. Arrizabalaga *et al.*-en (2004) kasuan Indikoko lagina 20 indibiduok osatzen zuten, Montes *et al.*-en (2012) kasuan 26k, posible da lagin tamaina txikiak

emaitzen desbideratzea eragin izana. Edonola ere, Montes *et al.*-en (2012) Indikoko lagin bera lehenengo ikerlanean aztertu genuen SNP nuklearren bidez eta emaitza desberdina izan zen, hain zuzen ere, Indikoko lagina independentea ageri zen baina Pazifikoarekiko antzekoagoa Atlantikoarekiko baino.

Emaitza berdina egiaztatu zuen bigarren ikerlaneko SNP panel berriak lagin tamaina handiagoa aztertuz (N=136). Lan honetan Indiko eta ipar Pazifiko arteko antzekotasuna egiaztatu zen (3.4. Irudia eta 3.2. Taula), eta ondorioz, Malaysiako artxipelagoaren bidezko fluxu genetikoak ezin da baztertu bi eremuen artean. Ikerlanean Indikoko 4 urteko laginketa segida izateak emaitzen sendotasuna bermatzen du.

Laburbilduz, markatzaile nuklear eta mitokondrialekin antzemandako hegaluzearen egungo egitura genetikoak etengabeko eredu filogenetiko baten bidez azaldu daiteke, baina bereizketa espazial partzialak baldintzatua. V kategoria bezala izendatua Avise *et al.*-en (1987), historikoki populazio geografikoen artean tarteko fluxu genetikoak agertzen dituzten espezieetan jazotzen da eredu hau. Mediterraneoko hegaluzea, espezieko populazio genetikoki bereziena, populazioen egonkortasun egoera demografiko honetako salbuespena litzateke.

3. Aplikazioa hegaluzearen kudeaketan

3.1. Hegaluze stock-en definizioa eta mugaketa

Atunak gehiegizko arrantzarekiko bereziki kalteberak dira zenbait aspektu biologikoengatik, hala nola, heldutasun sexual berantiarra, bizitza luzea, jokaera taldekoa eta balio ekonomiko altua (Collette *et al.* 2011). Ezaugarri hauek predatzaile pelagiko hauen ebaluazioa eta kudeaketa bereziki konplexua izatea eragiten dute.

Gaur egun, mundu mailako hegaluzearen kudeaketa sei stock-en definizioan oinarritzen da: i) Mediterraneo Itsasoa, ii) Ipar Atlantikoa, iii) Hego Atlantikoa, iv) Indikoa, v) Ipar Pazifikoa eta vi) Hego Pazifikoa. Nahiz eta ICCATEk Mediterraneo stock bakartzat definitzen duen, hainbat ikerlanek, errunaldi gune desberdinu posibleetan oinarrituta (Marano *et al.* 1999), eta egituraketa genetikoa oinarrituta (Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012), Mediterraneo barnean hainbat stock egon daitezkeela adierazten dute. Alabaina, tesi honetako bigarren ikerlanean ez da egituraketarik aurkitu Mediterraneoko zazpi laginen artean.

Gauza bera gertatzen da ozeano Indikoan, RFMOek stock bakar eta independentetzat jotzen dute, hala ere, Yeh *et al.*-ek (1996) datu morfologiko eta sekuentzia mitokondrialetan oinarrituta 90°E meridianoak banatuko lituzkeen bi stock proposatu zituen Indikorako. Aitzitik, Arrizabalaga *et al.* -ek (2004) eta Montes *et al.*-ek (2012) Indikoko eta Atlantikoko hegaluzeen artean homogeneotasuna deskribatu zuten. Lan hauetan Indikoko laginketa ez zen optimoa izan (N=26 eta

N=20), biek ala biek Indikoan laginketa hobea iradokitzen dute ondorio sendoagoak eskuratze aldera. SNP nuklear eta mitokondrialetan oinarritutako Doktorego-tesi honetako ikerlanek Indikoko egungo stock bakar eta independentearen planteamenduarekin bat egiten dute. Hala ere, Indiko eta ipar Pazifikoaren arteko fluxu genetiko posibleak (3.2. taula) eta Indiko ekialdeko laginik ez izatea (90°E meridianotik ekialdera), eremu honetan azterketa sakonagoaren beharra iradokitzen dute.

Atlantikoari eta Pazifikoari dagokionean, kudeaketa ipar eta hego hemisferioetan stock desberdinen definizioan oinarritzen da bi ozeanoetan. Ikerlan desberdinek azpiegitureketa deskribatzen dute Pazifikoan eta Atlantikoan: hemisferio arteko migrazio gabezia (Arrizabalaga 2003), arrantza-estatistika arteko desberdintasunak (Nakamura 1969), gonaden azterketa histologikoak (Otsu & Uchida 1959), desberdintasun morfologikoak (Kurogane & Hiyama 1958, 1959; Ishii 1965) eta mikrosateliteetan oinarritutako ikerketa genetikoak (Takagi *et al.* 2001; Davies *et al.* 2011; Montes *et al.* 2012). Hala ere, Doktorego-tesi honetako emaitza genetikoek ez dute desberdintzapen hau babesten, ez Atlantikoan ezta Pazifikoan ere. RFLP eta sekuentzia mitokondrialetan oinarritutako Chow & Ushiana-ren (1995) lanak ere ez du heterogeneotasunik antzematen Atlantiko eta Pazifiko barnean.

Laburbilduz, Doktorego-tesi honetako emaitzek hegaluzean gutxienez 4 populazio badirela adierazten dute: Mediterraneoan, Atlantikoa, Pazifikoa eta Indikoa, eta euren arteko isolamendu mailak desberdinak dira. Emaitza hauek populazio ozeanikoak, Mediterraneoan barne, modu berezian kudeatzen direneko kudeaketa planak babesten ditu, baina gaur egungo sei stock-en definizioarekin ez dator bat. Hala ere, gaur egungo kudeaketa modeloak hainbat populazioen oharkabeko gehiegizko arrantzaren arriskua gutxituko lukeen hurbilketa kontserbatiboa litzateke.

3.2. Ipar Atlantikoko hegaluzearen tamaina efektiboaren estimazioa

Ipar Atlantikoko hegaluzeak hainbat hamarkadetan gehiegizko ustiapena jasan du. Horregatik, stock honen “osasun” genetikoa neurtzeko, eta urteen poderioz aldakortasun genetikoa galdu ote den jakiteko, bigarren ikerlanean populazioaren tamaina efektiboa (N_e) kalkulatu genuen. N_e estimazioak egin dituzten ikerketek tradizionalki mikrosateliteak edo sekuentzia mitokondrialak erabili izan dituzten (Turner *et al.* 1999; Hauser & Carvalho, 2008; Qiu *et al.* 2013) arren, ikerlan honetan SNP nuklearrak erabili ditugu. Analisiak optimizatzeko denbora-laginketa zehatza egin zen 23 urteko gehienezko aldea (1986-2009) zuten zazpi kohorte definituz (3.2. Irudia).

N_e estimazioetan denbora-eskala desberdineko bi metodo erabili ziren. Batetik N_e garaikidea kalkulatu genuen, estimazio hau jito genetikoak eragindako frekuentzia alelikoen aldakortasunean oinarritzen da. Haien artean, gehienez 23 urteko denbora-tartea duten kohorteen definizioaren bidez ekidin genuen belaunaldi diskretuak asumitzeak emaitzetan eragin zezakeen desbideratzea. Bestalde, metodo koaleszentean oinarritutako N_e historikoa ere estimatu genuen. Azken honek garaikideak baino denbora-eskala handiagoa hartzen du kontuan (Whiteley *et al.* 2010), espezieak

gehiegizko arrantza jasan zueneko baina lehenagokoa, hau da, eboluzio-periodo askoz ere urrunagoa.

N_e estimazio garaikidea eta historikoa ez ziren nabarmenki desberdinak (S3.3. eta S3.4. Taulak). N_e estimazio hauen arteko antzekotasun honek, ipar Atlantikoko gaur egungo eta iragan urruneko hegaluzearen populazio tamainak horren desberdinak ez zirela adierazten du. Bestalde, N_e/N_c (populazio tamaina zentsala) ratioak $2,62 \times 10^{-3}$ eta $9,83 \times 10^{-3}$ artean dabil. Espezie itsastarretan ratio hau horren baxua izatearen arrazoia errekrutatze-aurreko faseetan dagoen heriotza-tasa altuetan egon daiteke, izan ere, honek belaunaldiz belaunaldi, ekarpen genetiko heldu kopuru murriztu batek soilik egiten duela adieraziko luke.

Tunidoetako N_e estimazioak sekuentzia mitokondrialetan (317.929 eta 407.900.000 indibiduo artean) edo mikrosateliteetan (500 eta 44.903 indibiduo artean) oinarrituta kalkulatu diren, asko aldatzen dira estimazioak (Riccioni *et al.* 2010; Qiu & Miyamoto 2011; Qiu *et al.* 2013; Nomura *et al.* 2014). Qiu *et al.*-en (2013) arabera desadostasun honen arrazoia tunido espezieetako ar eta emeen jokaera desberdintasunean datza. Mikrosateliteetan oinarritutako bi estimazio daude hegaluzean: 23.250 indibiduo Atlantikoan eta 20.183 indibiduo Pazifikoan (Qiu *et al.* 2013). Bigarren ikerlanean lortutako estimazioen batez bestekoak 13.267 eta 16.729 izan ziren, N_e garaikidean eta historikoan hurrenez hurren. Estimazio hauek ez dira nabarmenki desberdinak, nolana ere komenigarria litzateke aniztasun genetikoaren monitorizazioa ezartzea urtero N_e -a estimatuz. Zentzu honetan, bigarren ikerlanean 58 SNP neutral aurkezten dira helburu honetan erabiliak izateko. Gure estimazioak Qiu *et al.*-ek (2013) mikrosatelite bidez lortutako estimazioen maila berean kokatzen dira. Markatzaile mota bakoitzak duen mutazio-tasa desberdinak N_e estimazioak aldatzea eragin dezake kalkulatzeko orduan. Edozein kasutan ere, nabaria da SNPak mikrosateliteak bezain erabilgarri eta fidagarriak direla tunidoen populazioen tamaina efektiboa estimatzeko.

Laburbilduz, bigarren ikerlanak adierazten du ipar Atlantikoko hegaluzearen tamaina efektiboa egonkor mantendu dela (3.5. Irudia) tamaina zentsalak aldaketa nabarmenak jasan dituelarik. N_e -ren estimazioek aniztasun genetiko mailak egonkor eta 500 indibiduotik gora mantendu direla erakusten dute, azken hau gutxieneko kritiko bezala definitua. Beraz, ipar Atlantikoko stock-aren bideragarritasuna arriskuan jarri zezaketen botila-lepo gertaera garrantzitsuak gertatu izana baztertzen da. Nolanahi ere, garrantzitsua da aldakortasun genetikoaren galeraren aurrean populazioen kalteberatasuna zein den hobeto ulertzea. Zentzu honetan, N_e/N_c ratioaren estimazioak kontu handiarekin hartu beharrekoak dira, izan ere, horren populazio tamaina handiak dituzten espezieen populazio dinamikak zailak dira ulertzen (Flowers *et al.* 2002; Therkildsen *et al.* 2010). Honen harira, teorikoki populazio basatietan N_e/N_c ratio garaikideak 0,1-etik gora egon behar du (Nunney & Campbell 1993; Frankham 1995; Vucetich *et al.* 1997) populazioaren osasun genetiko egokia bermatzeko. Hala ere, hainbat ikerlanek zalantzan jarri dute populazio tamaina efektibo handiko espezieetan N_e datu tenporaletan oinarrituta estimatzearen

egokitasuna (Poulsen *et al.* 2006) eta baita ere ea N_e/N_c ratioek sistema biologikoen benetako dinamika erakusten ote duten (Therkildsen *et al.* 2010; Flowers *et al.* 2002).

Nolanahi ere, Doktoretza-tesi honetako bigarren ikerlaneko markatzaile neutralek adierazitako egonkortasun tenporalaren emaitzak etorkizuneko hegaluzearen N_e/N_c ebaluaketen eta N_e monitorizazioen erreferente izan daitezke. Bestalde, arrantzategiekiko ugaritasun-indize independente legez, N_e estimazioa, kudeaketa jasangarria lortze aldera, arrain populazioen egoera monitorizatzeko lanabes osagarri oso baliagarria da.

4. *Thunnus* generoko lotura filogenetiko eta ebolutiboak

4.1. Hegaluzearen populazio egitura DNAm-tan oinarrituta

Bost eskualde mitokondrialen (CR, 12S, 16S, Cyt *b* eta COI) eta SNP mitokondrialen analisisiek hegaluzean bi haplotalde desberdin daudela agertu zuten, Viñas *et al.*-ekin (2004) bat eginez, zeintzuek bi filotalde definitu zituzten CR sekuentzien bidez, eta baita Chow & Ushiamarekin (1995) ere, hauek RFLP-en maiztasunetan oinarrituta laginak bi talde handitan banatu zituzten. 160 CR sekuentzien azterketaren arabera, estimatutako datazioek haplotalde biak duela 1,0-0,3 Ma inguru banatu zirela adierazten dute (3.4. Irudia).

Hirugarren ikerlanean A haplotaldeak batez besteko distantzia genetiko txikiagoak (0,034) agertu zituen B haplotaldearen aldean (0,053), honek adierazten du A haplotaldea B haplotaldetik abiatuta sortu zitekeela. Haplotaldeen maiztasunek banaketa geografiko diferentzialak agertu zituzten: Mediterraneo itsasoan eta ozeano Atlantikoan A haplotaldearen maiztasunak %85,6 eta %91,1 artekoak ziren, ozeano Pazifikoan aldiz, %63koa (4.2. Taula). Egungo haplotaldeen banaketa eboluzio alopatriko batetik eratorritakoak izan daitezke, beste eskonbrido espezie batzuetan deskribatua izan den bezala (Alvarado Bremer *et al.* 1995, 1998; Chow *et al.* 2000).

Hala ere, haplotaldeen banaketa asimetrikoa izanda ere, haplotaldeen egungo banaketa lortzeko beharrezkoa litzatekeen ondorengo fluxu genetiko ez da SNP mitokondrial eta nuklearrek agertzen dituzten distantzia genetiko handiekin bateragarria. Honek espeziearentzat bestelako egoera filogeografiko alternatibo bat planteatzera garamatza. Hipotesi alternatiboa jarraitutasun filogenetiko eta banaketa espazial partzial batean oinarritzen da, Avise *et al.*-en (1987) “V. kategoria” bezala definitua, hain zuzen ere, tarteko fluxu genetiko mailak dituzten espezieekin bat datorrena. Hipotesi honi jarraiki haplotaldeen agerpena haplotipoen desagertze estokastikoetatik abiatuta sortuko zen, gerora, Atlantiko eta Indo-Pazifikoren arteko isolamendu partzialak leinuen arteko banaketa bimodal desberdinerako bidea emango luke (Slatkin & Hudson, 1991; Harpending *et al.* 1998).

Aitzitik, Mediterraneoan lortutako emaitzak egoera demografiko honetako salbuespena lirateke, hala ere, egoera honetan populazio guztiek tamaina erlatiboki handia eta egonkorra mantenduko zuketean. Alde batetik, haplotalde bakoitzeko CR eskualdean mutazioen pilaketek (4.5. Taula), bestetik Mediterraneoako indibiduen %34,9-a haplotipo eskusibo bakarrean agertzeak (4.4. Taula) etaazkenik SNP nuklearrekin lortutako populazioen arteko desberdintzapen maila altuek (lehenengo eta bigarren ikerlanak), Mediterraneo itsasoa espeziearen populazio bereiziena dela adierazten dute. Datu hauek adierazten dutenez, Mediterraneoan bi haplotaldean agerpenaren (1,0-0,3 Ma) osteko desberdintzapen prozesua gertatu izan zitekeen. Populazio hau isolatuta geratuko litzateke Pleistozenoko azken gertaera glaziarrean, ziur aski Riss edo Würm glaziazioan zehar, belarrainean (*Xiphias gladius*) deskribatu den modu berean (Alvarado-Bremer *et al.* 1995).

SNP mitokondrialetan oinarritutako stock arteko desberdintasun genetikoaren (Φ_{ST}) emaitzak (4.6. Taula) goian planteatutako egoerarekin bat datoz, izan ere, Mediterraneoako desberdintzapen maila altua eta ozeanoen barneko homogeneotasuna eta haien arteko heterogeneotasuna nabarmentzen baitituzte. Laburbilduz, genoma mitokondrialeko eskualde kodetzaileko SNPek lau populazio antzeman zituzten hegaluzean: Mediterraneo itsasoa, ozeano Atlantikoa, ozeano Indikoa eta ozeano Pazifikoa, emaitza hau bat dator lehenengo eta bigarren ikerlaneko SNP nuklearrek emandako emaitzekin.

Emaitza hauetan oinarrituta ondorioztatu daiteke hegaluzearen egitura lau populazioetan oinarritzen dela. Esan daiteke Montes *et al.*-en (2012) mikrosateliteetan oinarritutako emaitzek, hein handi batean behintzat, genoma nuklearreko SNPen emaitzeko (lehenengo eta bigarren ikerlanak) eta SNP mitokondrialeko emaitzekin (hirugarren ikerlana) bat dutozela. Dena den, egitura hau ez da ikusten bost eskualde mitokondrialen (5112 bp) ezta CR eskualdeak (344 bp) aztertzean, batez ere lagin kopurua txikiagoa zelako ($n=38$ eta $n=160$, hurrenez hurren, eta $n=1.254$ SNPen kasuan) eta gainera, CR eskualde hiperaldakorreko SNPak ezin izan zirelako erabili. Azken finean, hegaluzearen populazio egitura deskribatzeko gai den SNP mitokondrialen panela argitaratzea posible izan da, eta zentzu honetan, interesgarria litzateke markatzaile hauek generoko beste espezieetan aplikatzea helburu berdinarekin.

4.2. *Thunnus* generoaren eboluzioa

Collette-k (1978) ezaugarri morfoekologikoetan oinarritutako *Thunnus* generoaren banaketa *Neothunnus* eta *Thunnus* subgeneroetan, ez dator lan honetan proposatutako generoaren filogeniarekin bat. Hirugarren ikerlaneko emaitzak sekuentzia mitokondrialak (Chow & Inou 1993; Chow & Kishino 1995; Viñas & Tudela 2009; Tseng *et al.* 2012) edo nuklearrak (Chow *et al.* 2006) aztertu dituzten lanekin bat datoz. Hirugarren ikerlaneko emaitzen arabera, lehendabizi hegaluzea eta Pazifikoko atungorria banatu ziren, generoko talderik aitzinekoena osatuz. Ondoren, *Neothunnus* subgeneroko espezieak taldekatu ziren (atun hegats-beltza (*Thunnus atlanticus*), atun hegats-horia (*Thunnus albacares*), tongol atuna (*Thunnus tonggol*)), eta *Thunnus* subgeneroko

gainontzeko espezieengandik (hegalaburra, hegoaldeko atungorria (*Thunnus maccoyii*) eta moja atunetik (*Thunnus obesus*)) desberdin ziren. Beraz, lan honek *Neothunnus* subgeneroaren jatorri monofiletikoa babesten du baina *Thunnus* subgeneroa parafiletikotzat jotzen du, gaur egun definituta dagoenaren arabera.

Bestalde, *Thunnus* generoko espezieen CR sekuentzia kopuru handia aztertzean, printzipioz espezie jakin batekoak ziren zenbait haplotipo ez ziren haien espezieko beste kideen artean ageri, beste espezieetako haplotaldeetan baizik. Indibiduo hauen taldekapen “nahasia” indibiduoek genoma mitokondrial, genoma nuklearrari dagokion espezie desberdin batena dutenean gertatzen da, hau da, “hibridoak” lirake (4.3. eta 4.4. Irudiak). *Thunnus* generoan hibridazio (edo introgresio) gertaerak hainbat egilek deskribatu dituzte (Chow & Kishino 1995; Carlsson *et al.* 2004; Alvarado Bremer *et al.* 2005; Lowenstein *et al.* 2009; Viñas & Tudela 2009). Aipatzekoak dira hegalaburraren eta Pazifikoko atungorrien eta hegaluzearen sekuentzien kokapena. Doktorego-tesi honetan hegaluzearen DNAm-aren introgresioa proposatzen dugu hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunean. Alde batetik, Pazifikoko atungorriaren haplotipo gehienak eta hegalaburraren zenbait haplotipo hegaluzearen sekuentzien alboan kokatzen dira (4.3. Irudia), honek adierazten du hiru haplotipo taldekapen hauek *Thunnus* generoko lehen espezie banaketatik eratorriak direla. Bestalde, hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arteko kontaktu gunerik ez egoteak hauen artean berriki gertatutako introgresio gertaera baztertzen dute, honek adieraziko luke Pazifikoko atungorriaren bi sekuentziak (4.3. Irudiko 9. eta 10. zk) hegalaburraren haplotaldean (b) aurkitzea antzinako gertaera introgresibo baten emaitza dela. Azkenik, orain gutxire arte hegalaburra eta Pazifikoko atungorria espezie berekotzat jotzea (Collette 1999) fenotipikoki ez direlako desberdintzen, eta ITS1 sekuentzia nuklearrak partekatzeak (Chow *et al.* 2006) espezie hauek duela denbora gutxi arbaso komuna izan zutela iradokitzen dute.

Hegaluzetik gertu dauden hegalabur haplotipoen aniztasun genetiko txikiagoak hauek introgresio historikotik eratorritakoak direla erakutsiko luke. Hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arteko arbaso komunitik datorren DNAm-a, aldiz, hegalaburraren (b) haplotaldearena litzateke, *Thunnus* generoko espezie gehienekin batera kokatzen dena. Zentzu honetan, hegalabur haplotipo (a) taldekapenak eta Pazifikoko atungorrien haplotipo gehienak haplotipo zentral eskas batzuk eta periferikoki luzatzen diren haplotipo gehiago agertzen dituzte aurrekoekin alderatuz gero. Orokorki, mota honetako itxurak indibiduo gutxi batzuetatik abiatutako fundatzaile efektuekin lotzen dira. Ebidentzia hauetan oinarrituta, badirudi gaur egun ageri diren hibridazioak hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunaren ar eta hegaluzearen emeen artean gertatu zela. Hibridatutako Pazifikoko atungorri eta hegalabur hauek gerora gurutzatzeak hegaluzearen mitokondriak bi espezie hauetan irautea bermatu zuen.

Hibridazio prozesua *Thunnus* generoan arrunta dela dirudi, horrela erakusten dute fenotipikoki ez dagokien beste espezie baten kladoan taldekatzen diren hiru espezieetako 24 sekuentziek (4.3 Irudia eta 4.6. Taula). “Tokiz kanpo” dauden sekuentzia hauen dibergentzia

denbora, dauden kladoko gainontzeko sekuentzien berdina da (aurretik deskribatutako hegalabur eta atungorri sekuentzietan ezik), honek introgresiboak erlatiboki berriak direla erakutsiko luke. Hauen artean hegaluzearen haplotaldean ageri diren 18 hegalabur sekuentziak eta atun hegats-horiaren haplotaldean ageri diren bi hegalabur sekuentziak nabarmentzen dira. Hauek, ziurrenik, hegalabur ar eta hegaluze emeen (n=18) eta atun hegats-hori (n=2) emeen arteko, duela denbora gutxiko, hibridazioen ondorengoak dira.

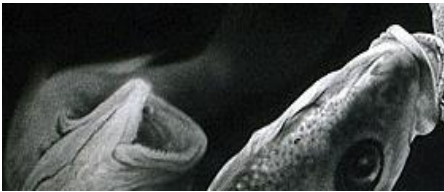
Arrainen CR-arentzat proposatutako %3,6 dibergentzia Ma-ko tasa (Donaldson & Wilson 1999) duen erloju molekularra asumitzean hegaluzearen gainontzeko espezieekiko banaketa orain dela 4,5 Ma gertatuko zen. Orain dela 2,7 eta 2,1 Ma artean gainontzeko espezieen sorrera ahalbidetuko zukeen prozesu kladogenetikoa gertatuko zen, eta epe honetan ere bi leinu mitokondrialak sortuko ziren moja atunean eta tongol atunean. Tarte honetan gertatuko zen hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunaren sorrera ere, sorrera horretatik gutxira hegaluzearen DNAm-ta aipatutako espezieen arbaso komunean introgresatuko zen aurretik deskribatu bezala. Bestalde, hegaluzearen hurbileko haplotipoen arteko desberdintasun genetikoek (4.3. Irudia) hegalabur eta Pazifikoko atungorriaren arteko dibergentzia 0,8 Ma-ean datatzea ahalbidetzen dute. Ziur aski Pleistozenoko garai interglaziar batean gertatuko litzateke, itsasoko tenperatura eta itsaso-mailak gora egin eta atun espezieak Artikokoan zehar mugitu zitezkeenean. Hegalaburrean topatutako aniztasun genetiko altuagoak iradokitzen duenez, bi espezieen arbaso komuna Atlantikoan biziko zen eta fundatzaile efektu baten ostean ozeano Pazifikoa populatu eta Pazifikoko atungorria sortaraziko luke.

5. Hegaluzearen jatorria egiaztatzeko SNPetan oinarritutako trazabilitate lanabes genetikoa

Lehenengo, bigarren eta hirugarren ikerlanetan aurkitu eta balioztutako SNP informatzaileenak aukeratzeak hegaluzetik eratorritako produktuen jatorria esleitzeko baliagarri den SNP panela diseinatzea ahalbidetu da. Testatutako indibiduen %68a %100eko ziurtasunez bereiztea lortu zuen Mediterraneo, Atlantiko eta Indo-Pazifiko jatorrien artean modu egokian.

Atlantikoko hegaluzerako marka bat diseinatzeko helburuarekin Euskal Herriko Unibertsitatearen eta AZTIren artean patente bat (ES 2 392 293 B1) diseinatu eta argitaratu zuten. Hala ere, lanabes honek indibiduen %45,5a bereizten zuen, hauetatik %91,2 modu egokian sailkatuz. Lan honetan aurkeztzen den lanabesarekin bereiztea lortu den indibiduo portzentajea nabarmen igotzea lortu da (%45,5etik %67,8ra) eta indibiduen %100a modu egokian sailkatu ziren eta, beraz, lanabes genetikoa nabarmen hobetzea lortu da. Bestalde, markatzaile kopuru txikienarekin bereizketa ahalmen handiena duen panela garatzea lortu da, izan ere, hasierako 137 SNPetatik 32ko panela diseinatu zen.

SNP panel hau oso erabilgarria da bi helburu lortzeko: 1) Hegaluzetik eratorritako edozein produkturen, freskoa edo tratatua izan, etiketak espeziearen eta harrapaketa guneko (Mediterranea, Atlantikoa edo Indo-Pazifikoa) identifikazioari dagokion araudia betetzen duela egiaztatzea, eta 2) edozein tokitan porturatutako harrapaketak aitortzen den puntuan harrapatuak izan direla egiaztatzea.



Ondorioak

METODOLOGIA

- Sanger, EPIC-PCR eta teleosteoetan kontserbatutako hasle degeneratuen sekuentziario estrategia klasikoak eraginkorrak eta egokiak suertatu dira hegaluzean SNPak aurkitzeko orduan. Genomaren estaldura zabaldu da 54 sekuentzia nuklear eta 5 mitokondrial gehituz, gainera 151 SNP balioztatu eta publikoki eskuragarri jarri dira espeziearen populazio-genetika aztertzeko.
- Hegalabur eta hegaluzearen arteko espezie-arteko anplifikazio gurutzatuak transkriptomako SNP kopuru nabarmena argitaratu ditu. Hauek lagin kopuru handi batean aplikatuta populazio egitura genetikoaren irudikatu dute, bestalde, serie tenporal batean aplikatuz populazioaren tamaina efektiboa (N_e) estimatzea lortu da.

EGITURA GENETIKOA

- Hegaluzearen populazio egituraketa nabarmena aurkezten du, gutxienez lau populazioz osatutakoa: i) Mediterraneoan, ii) Atlantikoan, iii) Indikoa y iv) Pazifikoa. Hortaz, azterketa genetikoak ipar eta hego hemisferioak bat egiten ditu Atlantikoan eta Pazifikoa, eta Arrantza Antolaketarako Erakunde Erregionalek definitutako sei stock-ak lura pasako lirateke. Printzipioz, populazio bat bi stock-etan banatuta kudeatzeak ez luke zertan ondorio negatiborik izan behar, batez ere, haien arteko ageriko migrazio eza eta errute-gune desberdinak kontuan hartuz gero. Hala ere, oso gomendagarria da bi hemisferioetako kudeatzaileen arteko koordinaketa bideratzea.
- Mediterraneoan populazioa genetikoki bereiziena da, ziurrenik Gibraltar itsasarte oso langa gogorra delako hegaluzerako. Indikoa eta Pazifikoa berdintsuenak dira, agian, Malaysiako artxipelagoan barrena fluxu genetiko dagoenaren seinale.
- Hegaluzean bi haplotalde handi (A eta B) izatea, eta hauen banaketa, Atlantiko eta Indo-Pazifikoaren arteko isolamendu genetiko partzialeko ereduarekin eta Mediterraneoaren isolamendu handiarekin bat datoz. Gainontzeko populazioekiko Mediterraneoan ageri duen desberdintzapena nabaria da Mediterraneoan A haplotaldea gehiengoa da (>%90), Mediterraneoan indibiduen %35 biltzen duen haplotipo eskusiboagatik eta desberdintzapen mailarik (Φ_{ST}) garaiena Mediterraneoan ageri duelako.

KONTSERBAZIO-GENETIKA

- Ipar Atlantikoko kohorteen bidez lortutako N_e/N_c ratioak erakusten du ondorengo indibiduo kopuru, erlatiboki, txiki batek sortzen duela hegaluzean, seguruenik erreklutatze-aurreko faseek duten biziraupenaren aldakortasun handiak baldintzatua.
- Ipar Atlantikoko stock-a gehiegi ustiatua izan eta kopuru zentsala murriztu den arren, tamaina efektiboaren murrizketa (N_e) ez da esangarria izan, honek aniztasun genetikoak murrizketa zorrotzik jasan ez duela adierazten du. Nolanahi ere, N_e -aren monitorizazioa gomendagarria litzateke bere murrizketa epe luzerako ondorioak dituen joera egonkorra ote den jakiteko. Kasu horretan gehiegizko arrantza arintzeko berehalako neurriak hartzea garrantzitsua litzateke.

LOTURA FILOGENETIKOAK *Thunnus* GENEROAN

- *Neothunnus* subgeneroaren jatorri monofiletikoa argi geratzen da DNA mitokondrialaren eskualde desberdinetako sekuentzien azterketaren bidez, *Thunnus* subgeneroa aldiz, parafiletikoa litzateke. Beraz, frogatutzat jo daiteke datu molekularrek ez dutela ezaugarri morfoekologikoetan oinarritutako egungo *Thunnus* generoaren banaketa babesten.
- *Thunnus* generoko zortzi espezieen CR sekuentzia kopuru handi baten azterketak genero barruan gertaera introgresiboak arruntak direla egiaztatzea ahalbidetu du eta, era berean, gaurdaino deskribatu ez ziren espezieen arteko introgresio gertaerak deskribatu dira. Hegaluzearen DNA mitokondrialak hegalaburraren eta Pazifikoko atungorriaren arbaso komunaren arteko hibridazio historikoa, eta azken espezie bi hauen banaketa orain dela 0,8 Ma, proposatzen ditugu.
- Ma-ko %3,6-ko dibergentzia tasa kontuan hartutako datazioen arabera, hegaluzea orain dela 4,5 Ma banatuko zen, orain dela 4,0 Ma moja atuna sortuko zen eta orain dela 2,7 eta 2,1 Ma artean gainontzeko espeziazioak gertatuko ziren, hauek baldintzatu zitzaizkiren glaziazio gertaerekin bat datoz datazio hauek.

TRAZABILITATEA

Hegaluzearen populazio-jatorria egiaztatzeko guztiz diskriminatzailea den lanabes genetikoa garatu dugu. 32 SNPeko lanabes honekin testatutako indibiduen %68ari bere jatorri geografikoa esleitu zitzaion %100eko ziurtasunaz.



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Ackerman MW, Habicht C, Seeb LW (2011) Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) under diversifying selection provide Increased accuracy and precision in mixed-stock analyses of sockeye salmon from the Copper River, Alaska. *T Am Entomol Soc* **140**: 865-381.

Agnew DJ, Pearce J, Pramod G, Peatman T, Watson R et al. (2009). Estimating the worldwide extent of illegal fishing. *PLoS ONE* **4**: e4570.

Albaina A, Iriondo M, Velado I, Laconcha U, Zarraonaindia I et al. (2013) Single nucleotide polymorphism discovery in albacore and Atlantic bluefin tuna provides insights into worldwide population structure. *Anim Genet* **44**(6): 678-92. doi:10,1111/age.12051.

Alvarado Bremer JR, Baker AJ, Mejuto J (1995). Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. *Can J Fish Aquat Sci* **52**: 1720-1732.

Alvarado Bremer JR, Naseri, I Ely B (1997). Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *J Fish Biol*, 50: 540-554.

Alvarado Bremer JR, Stéquet B, Robertson NW, Ely B (1998). Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar Biol* **132**: 547-557.

Alvarado Bremer JR, Viñas J, Mejuto J, Ely B, Pla C (2005) Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Mol Phylogenet Evol* **36**: 169-187.

André C, Larsson LC, Laikre L, Bekkevold D, Brigham J et al. (2011) Detecting population structure in a high gene-flow species, Atlantic herring (*Clupea harengus*): direct, simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. *Heredity* **106**: 270-280.

Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a FST-outlier method. *BMC Bioinformatics* **9**: 323-327.

Aranda G, Abascal FJ, Varela JL, Medina A (2013) Spawning behaviour and post-spawning migration patterns of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) ascertained from satellite archival tags. *PLoS ONE* **8**: e76445.

Arena P, Potoschi A, Cefali A (1980) Risultati preliminari di studi sull'età, l'accrescimento a la prima maturità sessuale dell'alalunga *Thunnus alalunga* (Bonn., 1788) del Tirreno. *Mem Biol Mar Oceanogr* **10**: 71-81

Arrizabalaga H, Lopez-Rodas V, Ortiz de Zarate V, Costas E, Gonzalez-Garcés A (2002) Study on the Migrations and Stock Structure of Albacore (*Thunnus alalunga*) from the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea Based on Conventional Tag Release- Recapture Experiences. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **54**: 1479-1494.

Arrizabalaga H (2003) Estructura poblacional del atún blanco (*Thunnus alalunga* Bonn. 1788): una aproximación multidisciplinar. PhD thesis. University of Vigo

Arrizabalaga H, Costas E, Juste J, González-Garcés A, Nieto B et al. (2004) Population structure of albacore *Thunnus alalunga* inferred from blood groups and tag-recapture analyses. *Mar Ecol Prog Ser* **282**: 245–252

Arrizabalaga H, Lopez-Rodas V, Costas E, Gonzalez-Garcés A (2007) Use of genetic data to assess the uncertainty in stock assessments due to the assumed stock structure: the case of albacore (*Thunnus alalunga*) from the Atlantic Ocean. *Fish Bull* **105**: 140-146.

Arrizabalaga H, Dufour F, Kell L, Merino G, Ibaibarriaga L et al. (2014) Global habitat preferences of commercially valuable tuna *Deep-Sea Res Pt II* **113**: 102-112.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T et al (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* **1987**:489-522.

Bard FX (1981) La thon germon (*Thunnus alalunga*) de l'Océan Atlantique De la dynamique de population à la stratégie démographique Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles, Université de Paris VI, 330P.

Bartlett SE, Davidson WS (1991). Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome *b* genes. *Can J Fish Aquat Sci* **48**: 309-317.

Beardsley GL (1969) Proposed Migrations of Albacore, *Thunnus alalunga*, in the Atlantic. *Ocean T Am Fish Soc* **98**: 589-598.

Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *P Roy Soc Lond B Bio* **263**: 1619-1626.

Beddington JR, Agnew DJ, Clark CW (2007) Current problems in the management of marine fisheries. *Science* **316**: 1713-1716.

Berli P (2002) MIGRATE: documentation and program, part of LAMARC, Version 1.5 Available at <http://evolution.genetics.washington.edu/lamarc.html>

Berli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *P Natl A Sci* **98**: 4563-4568.

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B Met* **57**: 289-300.

Bensch S, Åkesson S, Irwin DE (2002). The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Mol Ecol* **11**: 2359-2366.

Benton MJ. (Ed.) (1993). The fossil record 2 (2nd ed., pp. 681-715). London: Chapman & Hall.

Berger SA, Stamatakis A (2011). Aligning short reads to reference alignments and trees. *Bioinformatics* **27**: 2068-2075.

Block BA, Dewar H, Blackwell SB, Williams TD, Prince ED et al. (2001) Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* **293**: 1310-1314.

Block BA, Teo SL, Walli A, Boustany A, Stokesbury MJ et al. (2005) Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. *Nature* **434**: 1121-1127.

Block BA, Dewar H, Blackwell SB, Williams TD, Prince ED et al. (2001). Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* **293**: 1310-1314.

Block BA, Teo SL, Walli A, Boustany A, Stokesbury et al. (2005). Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. *Nature* **434**: 1121-1127.

Bohonak AJ, Vandergast AG (2011). The value of DNA sequence data for studying landscape genetics. *Mol Ecol* **20**: 2477-2479.

Boustany AM, Reeb CA, Block BA (2008) Mitochondrial DNA and electronic tracking reveal population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Mar Biol* **156**: 13-24.

Bravington MV, Grewe PM, Davies CR (2014) Fishery-independent estimate of spawning biomass of Southern Bluefin Tuna through identification of close-kin using genetic markers. FRDC Report 2007/034 CSIRO, Australia.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol Evol* **18**: 249-256.

Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L et al. (2004). Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* **74**: 106-120.

Carlsson J, McDowell JR, Carlsson JEL, Graves JE (2007) Genetic Identity of YOY Bluefin Tuna from the Eastern and Western Atlantic Spawning Areas. *J Hered* **98**: 23-28.

Carroll R L (1988). Vertebrate paleontology and evolution. *Freeman*.

- Castillo AG, Martinez JL, Garcia-Vazquez E (2004) Fine spatial structure of Atlantic hake (*Merluccius merluccius*) stocks revealed by variation at microsatellite loci. *Mar Biotechnol* **6**: 299-306.
- Childers J, Snyder S, Kohin S (2011) Migration and behavior of juvenile North Pacific albacore (*Thunnus alalunga*). *Fish Oceanogr* **20**: 157-173.
- Chow S, Inoue S (1993). Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull Natl Res Inst Far Seas Fish* **30**: 207-225.
- Chow S, Kishino H (1995). Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J Mol Evol* **41**: 741-748.
- Chow S, Ushiyama H (1995) Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Mar Biol* **123**: 39-45.
- Chow S, Okamoto H, Miyabe N, Hiramatsu K, Barut N (2000). Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Mol Ecol* **9**: 221-227.
- Chow S, Nakagawa T, Suzuki N, Takeyama H, Matsunaga T (2006) Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence. *J Fish Biol* **68**: 24-35.
- Collette BB (1999) Mackerels, molecules, and morphology. *Proc. 5th Indo-Pac. Fish Conf, Soc. Fr. Ichtyol* **1999**:149–164.
- Collette BB, Nauen C (1983) FAO species catalogue. Vol. 2 Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO *Fisheries Synopsis* **125** Volume 2. FAO, Rome.
- Collette BB, Carpenter KE, Polidoro BA, Juan-Jordá MJ, Boustany A et al. (2011) High Value and Long Life—Double Jeopardy for Tunas and Billfishes. *Science* **333**: 291-292.

Collette BB (1978) Adaptation and systematics of the mackerels and tunas. In: Sharp GD, Dizon AE (eds) The physiological ecology of tunas. *Academic Press* New York: 7-39

Cort JL, Arregui I, Estruch VD, Deguara S (2014). Validation of the Growth Equation Applicable to the Eastern Atlantic Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus* (L.), Using L max, Tag-Recapture, and First Dorsal Spine Analysis. *Rev Fish Sci Aqu* **22**: 239-255.

Davies CA, Gosling EM, Was A, Brophy D, Tysklind N (2011) Microsatellite analysis of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): population genetic structure in the North-East Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Mar Biol* **158**: 2727-2740.

De Roos AM, Persson L (2002) Size-dependent life-history traits promote catastrophic collapses of top predators. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 12907-12912.

DeWoody JA, Avise JC (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* **56**: 461-473.

Diaz M, Wethey D, Bulak J, Ely B (2000). Effect of harvest and effective population size on genetic diversity in a striped bass population. *T Am Fish Soc* **129**: 1367-1372.

Dicenta A, Piccinetti C, Piccinetti Manfrin G (1975) Observaciones sobre la reproducción de los túnidos en las islas Baleares. *Bol Inst Espa Oceanogr* **204**: 25-37.

Dickhut RM, Deshpande AD, Cincinelli A, Cochran MA, Corsolini S, et al. (2009) Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) population dynamics delineated by organochlorine tracers. *Environ Sci Technol* **43**: 8522-8527.

Donaldson KA, Wilson RR (1999). Amphi-panamic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol Phylogenet Evol* **13**: 208-213.

Duclerc J, Sacchi J, Piccinetti C, Piccinetti Manfrin G, Dicenta A, et al. (1973) Nouvelles donne sur la reproduction du thon rouge (*Thunnus thynnus* L.) et d'autres espèces de Thonidés en Méditerranée. *Rev Trav Inst Peches Marit* **37**: 2.

- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797.
- Efron B (1983) Estimating the error rate of a prediction rule: improvement on cross-validation. *J Am Stat Assoc* **78**: 316-331. doi:10.1080/01621459.1983.10477973.
- Elliott NG, Ward RD (1995). Genetic relationships of eight species of Pacific tunas (Teleostei: Scombridae) inferred from allozyme analysis. *Mar Freshwater Res* **46**: 1021-1032.
- Ely B, Stoner DS, Bremer AJ, Dean JM, Addis P, et al. (2002) Analyses of nuclear *ldhA* gene and mtDNA control region sequences of Atlantic Northern bluefin tuna populations. *Mar Biotechnol* **4**: 583-588.
- Faber JE, Stepien CA (1997). The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. *Mol Syst Fish*, 129-143.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- FAO 2011 Review of the state of world marine fishery resources. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* **569** Rome, 2011
- FAO 2014 Fisheries and aquaculture software FishStatJ - software for fishery statistical time series In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online] Rome Updated 22 July 2014 <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- Farley JH, Williams AJ, Hoyle SD, Davies CR, Nicol SJ (2013) Reproductive Dynamics and Potential Annual Fecundity of South Pacific Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*). *PLoS ONE* **8**: e60577.
- Felsenstein J (1971) Inbreeding and variance effective numbers in populations with overlapping generations. *Genetics* **68**: 581-597.

- Flowers, JM, Schroeter SC, Burton RS (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: Genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Evolution* **56**:1445-1453.
- Foll M, Gaggiotti OE (2008) A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* **180**: 977-993.
- Fontaine MC, Baird SJE, Piry S, Ray N, Tolley KA et al. (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biol* **5**: 30.
- Frankham R (1995) Effective population-size adult population size ratios in wildlife: A review. *Genet Res* **66**: 95-107.
- Fromentin JM, Fonteneau A (2001) Fishing effects and life history traits: A case study comparing tropical versus temperate tunas. *Fisheries Res* **53**: 133-150.
- Fromentin JM, Powers JE (2005) Atlantic bluefin tuna: Population dynamics, ecology, fisheries, and management. *Fish Fish* **6**: 281-306.
- Fromentin JM (2009) Lessons from the past: Investigating historical data from bluefin tuna fisheries. *Fish Fish* **10**: 197-216.
- Fromentin JM, Bonhommeau S, Arrizabalaga H, Kell LT (2014) The spectre of uncertainty in management of exploited fish stocks: The illustrative case of Atlantic bluefin tuna Mar Policy **47**: 8-14.
- Fu C, Fanning LP (2004). Spatial considerations in the management of Atlantic cod off Nova Scotia, Canada. *N Am J Fish Man* **24**: 775-784.
- Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.

- Gaggiotti OE, Bekkevold D, Jørgensen HBH, Foll M, Carvalho GR et al (2009) Disentangling the effect of evolutionary, demographic and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. *Evolution* **63**: 2939-2951.
- Galuardi B, Royer F, Golet W, Logan J, Neilson J et al. (2010) Complex migration routes of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) question current population structure paradigm. *Can J Fish Aquat Sci* **67**: 966-976.
- García A, Alemany F, Rodríguez JM (2002) Distribution of tuna larvae off the Balearic sea: preliminary results of the TUNIBAL 0600 larval survey. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **54**: 554-560
- García A, Cortés D, Ramírez T, Fehri-Bedoui R, Alemany F et al. (2006) First data on growth and nucleic acid and protein content of field-captured Mediterranean bluefin (*Thunnus thynnus*) and albacore (*Thunnus alalunga*) tuna larvae: a comparative study. *Sci Mar* **70**: 67-78.
- García SM, Grainger RJ (2005) Gloom and doom? The future of marine capture fisheries. *Philos T Roy Soc B* **360**: 21-46.
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Mol Ecol Resour* **10**: 915-934.
- Gattepaille LM, Jokobsson M (2012) Combining markers into haplotypes can improve population structure inference. *Genetics* **190**: 159-174.
- Gemmell NJ, Schwartz MK, Robertson BC (2004) Moa were many. *P Roy Soc Lond B Bio* **271**: 430-432.
- Gibbard PL, Head MJ, Walker MJ (2010) Formal ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma. *J Quaternary Sci* **25**: 96-102.
- Gibbs RHJ, Collette BB (1967) Comparative anatomy and systematics of the tunas, genus *Thunnus*. *Fish Wildl Ser Fish Bull* **66**:65-130

Godsil HC (1948) A preliminary population study of the yellowfin and the albacore. *Calif Dep Fish Game Fish Bull* **70**:1-90

Gomez-Uchida D, Banks MA (2006) Estimation of Effective Population Size for the Long-Lived Darkblotched Rockfish (*Sebastes crameri*). *J Herd* **97**: 603-606.

Goñi N, Logan J, Arrizabalaga H, Jarry M, Lutcavage M (2011) Variability of albacore (*Thunnus alalunga*) diet in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea. *Mar Biol* **158**: 1057-1073.

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) Available at: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

Graves JE, Dizon AE (1989) Mitochondrial DNA sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Can J Fish Aquat Sci* **46**: 870-873.

Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, et al (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* **11**: 591-611.

Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* **24**: 1406-1407.

Haasl R, Payseur B (2011) Multi-locus inference of population structure: a comparison between single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Heredity* **106**: 158-171.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids sym se* **41**: 95-98.

Hallaire L, Dao JC 1971 Etude serologique du germon du nord-est Atlantique (résultats préliminaires). *ICCAT* **35**

Hare MP, Nunney L, Schwartz MK, Ruzzante DS, Burford M et al. (2011) Understanding and Estimating Effective Population Size for Practical Application in Marine Species Management. *Conserv Biol* **25**: 438-449.

- Harpending, HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR et al. (1998). Genetic traces of ancient demography. *P Natl Acad Sci* **95**: 1961-1967.
- Hauser L, Seeb JE (2008). Advances in molecular technology and their impact on fisheries genetics. *Fish Fish* **9**: 473-486.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Bernal Ramirez JH, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *P Natl Acad Sci USA* **99**: 742-747.
- Hauser L, Carvalho GR (2008) Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish Fish* **9**: 333-362.
- Hayes B, Lærdahl J, Lien S, Berg P, Davidson W et al. (2004) Detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) from Atlantic salmon expressed sequence tags (ESTs). In: Proceedings of the 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production: 5-9 September 2004; Bled, Slovenia. European Federation of Animal Science.
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, Taylor MI, Ogden R et al. (2011) Application of SNPs for populations genetics of non-model organism: new opportunities and challenges. *Mol Ecol Resour* **11**: 123-136.
- Helyar SJ, Limborg MT, Bekkevold D, Babbucci M, Van Houdt J, et al. (2012) SNP Discovery Using Next Generation Transcriptomic Sequencing in Atlantic Herring (*Clupea harengus*) *PLoS ONE* **7**: e42089.
- Hoarau G, Boon E, Jongma DN, Ferber S, Palsson J et al. (2005). Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *P Roy Soc Lond B Bio* **272**: 497-503.
- Hudson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies *Mol Biol Evol* **23**: 254-267.

Hue SB (1979) Electrophoretic studies on the heterogeneity of the albacore stock (*Thunnus alalunga*) in the northeast Atlantic. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **8**: 265-271

Hutchinson WF, Van Oosterhout C, Rogers SI, Carvalho GR (2003) Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). *Proc R Soc B* **270**: 2125-2132.

ICCAT [14-04] recommendations for eastern (14-04) BFT.

ICCAT 2014. Report of the 2013 ICCAT North and South Atlantic albacore stock assessment meeting (Sukarrieta, Spain - June 17 to 24, 2013). *ICCAT Col Vol Sci Pap*. In press.

Ihssen PE, Booke HE, Casselman JM, McGlade JM, Payne NR et al. (1981) Stock identification: Materials and methods. *Can J Fish Aquat Sci* **38**: 1838-1855

Ishii T (1965) Morphometric analysis of the Atlantic albacore populations mainly her eastern areas. *B Jpn Soc Sci Fish* **31**: 333-339

Iwai T, Nakamura I (1964) Branchial skeleton of the bluefin tuna, with special reference to the gill rays. *Bull Misaki Mar Biol Inst Kyoto Univ* **6**:21-25

Iwai T, Nakamura I, Matsubara K (1965) Taxonomic study of the tunas. *Misaki Mar Biol Inst Kyoto Univ* **2**:1-51

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**: 1801-1806.

Jamieson A (1973) Genetic "tags" for marine fish stocks. *Sea Fish Res* Elek Science, London: 91-99

Jansen T, Gislason H (2013) Population Structure of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) *PLoS ONE* **8**: e64744.

- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genet* **6**: 13.
- Jones S, Silas EG (1960). Indian tunas-A preliminary review, with a key for their identification. *Indian J Fish* **7**: 369-393.
- Jorde PE, Ryman N (1995) Temporal allele frequency change and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics* **139**: 1077-1090.
- Jorde PE, Ryman N (2007) Unbiased estimator for genetic drift and effective population size. *Genetics* **177**: 927-935.
- Jørgensen HBH, Hansen MM, Bekkevold D, Ruzzante DE, Loeschcke V (2005) Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol Ecol* **14**: 3219-3234.
- Juan-Jordá MJ, Mosqueira I, Cooper AB, Freire J, Dulvy NK (2011) Global population trajectories of tunas and their relatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20650-10655.
- Juan-Jordá MJ, Mosqueira I, Freire J, Dulvy NK (2013). Life in 3-D: life history strategies in tunas, mackerels and bonitos. *Rev Fish Biol Fisher* **23**: 135-155.
- Kaminski S, Olech W, Olenski K, Nowak Z, Rusc A (2012) Single nucleotide polymorphisms between two lines of European bison (*Bison bonasus*) detected by the use of Illumina Bovine 50 K BeadChip. *Conserv Genet Resour* **4**: 311-314.
- Kettle AJ, Morales-Muniz A, Rosello-Izquierdo E, Heinrich D, Vøllestad LA (2011) Refugia of marine fish in the northeast Atlantic during the last glacial maximum: concordant assessment from archaeozoology and palaeotemperature reconstructions. *Clim Past* **7**: 181-201.
- Knutsen H, Jorde PE, André C, Stenseth NC (2003) Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Mol Ecol* **12**: 385-394.

Knutsen H, Jorde PE, Albert OT, Hoelzel AR, Stenseth NC (2007) Population genetic structure in the North Atlantic Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*): influenced by oceanic current systems? *Can J Fish Aquat Sci* **64**: 857-866.

Knutsen H, Olsen EM, Jorde PE, Espeland SH, André C et al. (2011) Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes 'biologically meaningful'? A case study of coastal Atlantic cod. *Mol Ecol* **20**: 768-783.

Koto T (1969) Studies on the albacore-XIV Distribution and movement of the albacore in the Indian and the Atlantic Oceans based on the catch statistics of Japanese tuna long-line fishery *Bull Far Seas Fish Res Lab, Japan* **1**:115-129.

Kunal SP, Kumar G, Menezes MR, Meena RM (2014). Genetic homogeneity in longtail tuna *Thunnus tonggol* (Bleeker, 1851) from the northwest coast of India inferred from direct sequencing analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. *Mar Biol Res* **10**: 738-743.

Kurogane K, Hiyama Y (1958) Morphometric comparison of the albacore from the northwest, the equatorial and the southwest Pacific. *Rec Oceanogr Wks* **4**: 67-75

Kurogane K, Hiyama Y (1959) Morphometric comparison of the albacore from the Indian and the Pacific Ocean. *Rec Oceanogr Wks* **5**: 68-84

Laconcha U, Iriando M, Arrizabalaga H, Manzano C, Markaide P et al. (2015a) New nuclear SNP markers unravel the genetic structure and effective population size of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *PLoS ONE* **10**: e0128247.

Laconcha U Iriando M, Arrizabalaga H, Manzano C, Markaide P (2015b) Phylogeographic pattern in albacore and phylogenetic relationship between *Thunnus* species inferred from direct mtDNA analysis. In prep.

Lalami Y, Tellai S, Barrois JM, Piccinetti C, Piccinetti Manfrin G (1973) Observations sur les oeufs et larves des thonides des cotes algeriennes *Pelagos IV* (2): 54-65.

Langella O (2002) Populations 1.2.32. CNRS UPR 9034.

Laval G, Patin E, Barreiro LB, Quintana-Murci L (2010) Formulating a historical and demographic model of recent human evolution based on resequencing data from noncoding regions. *PLoS ONE* **5**: e10284.

Le Gall JY (1974) Exposé synoptique des données biologiques sur le germon *Thunnus alalunga* (Bonaterre, 1788) de l'Océan Atlantique. *Synopsis FAO sur les pêches* **109**: 70

Lenfant P, Planes S (2002). Temporal genetic changes between cohorts in a natural population of a marine fish, *Diplodus sargus*. *Biol J Linn Soc* **76**: 9-20.

Lewis AD (1990) South Pacific albacore stock structure: a review of available information South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia, p 13

Lourie SA, Vincent AC (2004). Using biogeography to help set priorities in marine conservation. *Conserv Biol* **18**: 1004-1020.

Lowenstein, JH, Amato G, Kolokotronis SO (2009). The real maccoyii: identifying tuna sushi with DNA barcodes—contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE* **4**: e7866.

Lutcavage ME, Brill RW, Skomal GB, Chase BC, Howey PW (1999) Results of pop-up satellite tagging on spawning size class fish in the Gulf of Maine: Do North Atlantic bluefin tuna spawn in the mid-Atlantic? *Can J Fish Aquat Sci* **56**: 173-177.

Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack J E et al. (1997) Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet* **15**: 47-56.

Macdonald JJ, Farley JH, Clear NP, Williams AJ, Carter TI et al (2013) Insights into mixing and movement of South Pacific albacore *Thunnus alalunga* derived from trace elements in otoliths. *Fish Res* **148**: 56-63.

Magnuson JJ, Block BA, Deriso RB, Gold JR, Grant WS et al. (1994) An assessment of Atlantic bluefin tuna. *Natl Acad Press*, Washington, DC.

- Malhi RS, Trask JS, Shattuck M, Johnson J, Chakraborty D et al. (2011) Genotyping single nucleotide polymorphisms (SNPs) across species in Old World monkeys. *Am J Primatol* **73**: 1031-1040.
- Marano G, De Zio V, Pastorelli AM, Rositani L, Ungaro N et al. (1999) Studio sinottico sulla biologia e pesca di *Thunnus alalunga* (Bonnaterre, 1788) *Biol Mar Medit* **6**: 192-214.
- Mather FJ, Mason JM, Jones AC (1995) Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna. *NOAA Technical Memorandum* **370**, NOAA, Miami.
- McCluskey SM, Lewison RL (2008) Quantifying fishing effort: a synthesis of current methods and their applications. *Fish Fish* **9**: 188-200.
- McLenachan PA, Stöckler K, Winkworth RC, McBreen K, Zauner S, Lockhart PJ (2000). Markers derived from amplified fragment length polymorphism gels for plant ecology and evolution studies. *Mol Ecol* **9**: 1899-1903.
- Megalofonou P (2000) Age and growth of Mediterranean albacore. *J Fish Biol* **57**: 700-715.
- Mesnick SL, Taylor BL, Archer FI, Martien KK, Treviño SE et al. (2011) Sperm whale population structure in the eastern and central North Pacific inferred by the use of single-nucleotide polymorphisms, microsatellites and mitochondrial DNA. *Mol Ecol Resour* **11**: 278-298.
- Metzker ML (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nat Rev Genet* **11**: 31-46.
- Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Simoni P, Baraldini M et al. (2007) One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *J Agr Food Chem* **55**: 7638-7647.
- Miller JM, Poissant J, Kijas JW, Coltman DW (2011) A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long range linkage disequilibrium in wild sheep. *Mol Ecol Resour* **11**: 314-322.

Miller JA, Gray A, Merz J (2010) Quantifying the contribution of juvenile migratory phenotypes in a population of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Mar Ecol-Prog Ser* **408**: 227-240.

Moen T, Hayes B, Nilsen F, Delghandi M, Fjalestad KT et al. (2008) Identification and characterisation of novel SNP markers in Atlantic cod: evidence for directional selection. *BMC Genet* **9**: 18.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Abreu AG, Albaina A, Alpermann TJ, Apkenas VE et al. (2012) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2011-30 November 2011. *Mol Ecol Resour* **12**: 374-376.

Montes I, Iriondo M, Manzano C, Arrizabalaga H, Jiménez E, et al.(2012) Worldwide genetic structure of albacore (*Thunnus alalunga*) revealed by microsatellite DNA markers. *Mar Ecol-Prog Ser* **471**: 183-191.

Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol* **19**: 208–216.

Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M, Hawkey PM (2004). Predominance and genetic diversity of community-and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemoth* **54**: 628-633.

Nakadate M, Viñas J, Corriero A, Clarke S, Suzuki N et al. (2005) Genetic isolation between Atlantic and Mediterranean albacore populations inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *J Fish Biol* **66**: 1545-1557.

Nakamura I (1965) Relationships of fishes referable to the subfamily Thunninae on the basis of the axial skeleton. *Bull Misaki Mar Biol Inst Kyoto Univ* **8**:7-38

Nakamura H (1969) Tuna distribution and migration *Fishing News Ltd, London*: 76

Nielsen EE, Hemmer-Hansen J, Larsen PF, Bekkevold D (2009) Population genomics of marine fishes: identifying adaptative variation in space and time. *Mol Ecol* **18**: 3128-3150.

Nielsen EE, Cariani A, Mac Aoidh E, Maes GE, Milano I et al.(2012) Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false ecocertification. *Nat Commun* **3**: 851. doi:10.1038/ncomms1845

Nishikawa Y, Honma M, Ueyanagi S, Kikawa S. (1985) Average distribution of larvae of oceanic species of scombrid fishes 1956–1981. *Nat Res I Far Seas Fish*, Shimizu: 99

Nomura S, Kobayashi T, Agawa Y, Margulies D, Scholey V et al. (2014) Genetic population structure of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and the yellowfin tuna *Thunnus albacares* in the North Pacific Ocean. *Fisheries Sci* **80**: 1193-1204.

Nunney L (1999) The effective size of a hierarchically structured population. *Evolution* **53**: 1-10.

Nunney L, Campbell KA (1993) Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends Ecol Evol* **8**: 234-239.

Ogden R (2011) Unlocking the potential of genomic technologies for wildlife forensics. *Mol Ecol Resour* **11**: 109-116.

Ogden R, Baird J, Senn H, McEwing R (2012) The use of cross-species genome-wide arrays to discover SNP markers for conservation genetics: a case study from Arabian and scimitar-horned oryx. *Conserv Genet Resour* **4**: 471-473.

O'Leary SJ, Hice LA, Feldheim KA, Frisk MG, McElroy AE et al. (2013) Severe Inbreeding and Small Effective Number of Breeders in a Formerly Abundant Marine Fish. *PLoS ONE* **8**: e66126.

Ortiz de Zárate V, Cort JL (1998) Albacore (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre) stock structure in the Atlantic Ocean, as inferred from distribution and migration patterns. Proceedings of the ICCAT Tuna Symposium. *ICCAT Tuna Symposium* **1**: 251-260.

Otsu T. y Uchida R.N. (1959) Sexual maturity of albacore in the Pacific ocean. *Fish Bull* **59**: 787-805

Ovenden JR (1990) Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust J Mar Freshw Res* **41**: 835-853

Palstra FP, Ruzzante DE (2008) Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for population persistence in the wild? *Mol Ecol* **17**: 3428-3447

Palumbi SR, Baker CS (1994) Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol Biol Evol* **11**: 426-435.

Pardo MA, Pérez-Villareal B (2004). Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chem* **86**: 143-150.

Pawson MG, Jennings S (1996) A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fish Res* **25**: 203-217.

Petit E, Balloux F, Goudet J (2001) Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* **55**: 635-640.

Piccinetti C, Manfrin GP (1993) Distribution of Thunnidae larvae in the Mediterranean. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **40**: 164-172

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* **95**: 536-539. doi:10.1093/jhered/esh074.

Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.

Poulsen NA, Nielsen EE, Schierup MH, Loeschcke V, Grønkjær P (2006) Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Mol Ecol* **15**: 321-331.

- Poulsen NA, Hemmer-Hansen J, Loeschcke V, Carvalho GR, Nielsen EE (2011) Microgeographical population structure and adaptation in Atlantic cod *Gadus morhua*: spatio-temporal insights from gene-associated DNA markers. *Mar Ecol-Prog Ser* **436**: 231-243.
- Primmer CR, Borge T, Lindell J, Saetre GP (2002) Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol Ecol* **11**: 603-612.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Pujolar JM, Roldan MI, Pla C (2003) Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus* and *Thunnus alalunga*. *Mar Biol* **143**: 613-621.
- Qiu F, Miyamoto MM (2011) Use of nuclear DNA data to estimate genetic diversity and population size in Pacific Bluefin and Yellowfin Tuna (*Thunnus orientalis* and *Thunnus albacares*). *Copeia* **2011**: 264-269.
- Qiu F, Kitchen A, Beerli P, Miyamoto MM (2013) A possible explanation for the population size discrepancy in tuna (genus *Thunnus*) estimated from mitochondrial DNA and microsatellite data. *Mol Phylogenet Evol* **66**: 463-468.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9197-9221. doi:10.1073/pnas.94.17.9197.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* **105**: 767-779.
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, Milano I, Cariani A et al. (2010) Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2102-2107.
- Richards WJ (1984) Kinds and abundances of fish larvae in the Caribbean Sea and adjacent areas. *US Dep Commer NOAA Tech Rep* **776**: 54

- Richter-Boix A, Quintela M, Segelbacher G, Laurila A (2011) Genetic analysis of differentiation among breeding ponds reveals a candidate gene for local adaptation in *Rana arvalis*. *Mol Ecol* **20**: 1582-1600.
- Ricker WE (1981) Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Can J Fish Aquat Sci* **38**: 1636-1656.
- Roest CH, Weissenbach J (2005). Fish genomics and biology. *Genome Res* **12**: 1675-1682.
- Rooker JR, Secor DH, De Metrio G, Rodríguez-Marín E (2006) Evaluation of population structure and mixing rates of Atlantic bluefin tuna from chemical signatures in otoliths. The International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. *Col Vol Sci Pap* **59**: 813-818.
- Rooker JR, Alvarado Bremer JR, Block BA, Dewar H, de Metrio G et al. (2007) Life history and stock structure of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*). Reviews in *Fisheries Sci* **15**: 265-310.
- Rooker JR, Secor DH, De Metrio G, Schloesser R, Block BA, Neilson JD (2008) Natal homing and connectivity in Atlantic bluefin tuna populations. *Science* **322**: 742-744.
- Rosenberg NA, Li LM, Ward R, Pritchard JK (2003) Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *Am J Hum Genet* **73**: 1402-1422.
- Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure *Mol Ecol Notes* **4**: 137-138.
- Rousset F (1996) Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* **142**: 1357-1362.
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* **8**: 103-106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.

- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Method Mol Biol* **132**: 365-386.
- Ruzzante DE, Mariani S, Bekkevold D, André C, Mosegaard H, et al. (2006) Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *P Roy Soc B-Biol Sci* **273**: 1459-1464.
- Ruzzante DE (1997) A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Can J Fish Aquat Sci* **55**: 1-14.
- Ryman N, Palm S, André C, Carvalho GR, Dahlgren TG et al. (2006) Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Mol Ecol* **15**: 2031-2045.
- Ryynänen HJ, Primmer CR (2006) Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in duplicated genomes: intron-primed exon-crossing (IPEC) as a strategy for avoiding amplification of duplicated loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and other salmonid fishes. *BMC Genomics* **7**: 192.
- Santaclara FJ, Velasco A, Pérez-Martín RI, Quinteiro J, Rey-Méndez M et al.(2014) Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* in food products. *Food Chem* **180**: 9-16.
- Santiago J (1993) A new length-weight relationship for the North Atlantic albacore. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **40**: 316-319.
- Santiago J, Arrizabalaga H (2005) An integrated growth study for North Atlantic albacore (*Thunnus alalunga* Bonn 1788) *ICES J Mar Sci: Journal du Conseil* **62**: 740-749.
- Schwartz MK, Tallmon DA, Luikart G (1998). Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Anim Conserv* **1**: 293-299.
- Seeb JE, Carvalho G, Hauser L, Naish K, Roberts S et al. (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Mol Ecol Resour* **11**: 1-8.

Serene PH (1969) Esterase of the north east Atlantic albacore stock. *ICES Special meeting on the biochemical and serological identification of fish stocks* **33**: 1-6

Sharp GD, Pirages S (1978) The distribution of red and white swimming muscles, their biochemistry, and the biochemical phylogeny of selected scombrid fishes. In: Sharp GD, Dizon AE (eds) *The physiological ecology of tunas. Academic Press, New York*: 41-78

Shiohama T (1985) Overall fishing intensity and length composition of albacore caught by long line fishery in the Indian Ocean, 1952-1982. *IPTP TWS/85/22* 91-109.

Shubitowski DM, Venta PJ, Douglass CL, Zhou RX, Ewart SL (2001). Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Anim Genet* **32**: 78-88.

Slate J, Gratten J, Beraldi D, Stapley J, Hale M et al.(2009) Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* **136**: 97-107.

Slatkin M, Hudson RR (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**: 555-562.

Smith CT, Elfstrom CM, Seeb L, Seeb JE (2005) Use of sequence data from rainbow trout and Atlantic salmon for SNP detection on Pacific salmon. *Mol Ecol* **14**: 4193-4203.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* **68**: 978-989.

Stepien CA, Faber JE. (1998). Population genetic structure, phylogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Mol Ecol* **7**: 1757-1769.

Sund PN, Blackburn M, Williams F (1981) Tunas and their environment in the Pacific Ocean: A review. *Oceanogr Mar Biol* **19**: 443-512.

Suzuki A (1962) Serological studies of the races of tuna VI Bigeye-3 antigen occurred in the albacore. *Rep Nankai Reg Fish Res Lab* **16**: 67-70.

- Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- Takagi M, Okamura T, Chow S, Taniguchi N (1999) PCR primers for microsatellite loci in tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study. *Fish Sci* **65**: 571-576.
- Takagi M, Okamura T, Chow S, Taniguchi N (2001) Preliminary study of albacore (*Thunnus alalunga*) stock differentiation inferred from microsatellite DNA analysis. *Fish Bull* **99**: 697-701.
- Takeyama H, Chow S, Tsuzuki H, Matsunaga T (2001) Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *J Fish Biol* **58**: 1646-1657.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:11030–11035
- Teo SLH, Boustany A, Dewar H, Stokesbury MJW, Weng KC et al. (2007) Annual migrations, diving behavior, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. *Mar Biol* **151**: 1-18.
- Therkildsen NO, Nielsen EE, Swain DP, Pedersen JS (2010) Large effective population size and temporal genetic stability in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St Lawrence. *Can J Fish Aquat Sci* **67**: 1585-1595
- Tseng MC, Jean CT, Smith PJ, Hung YH (2012). Interspecific and intraspecific genetic diversity of *Thunnus* species. INTECH Open Access Publisher.
- Turner S (1999) Review of the bluefin tuna release and recapture information from the ICCAT tagging data base. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **XLIX**: 360- 362.
- Turner TF, Wares JP, Gold JR (2002) Genetic effective size is three orders of magnitude smaller than adult census size in an abundant, estuarine-dependent marine fish (*Sciaenops ocellatus*). *Genetics* **162**: 1329-1339.

- Ueyanagi S (1969) Observations on the distribution of tuna larvae in the indo-pacific Ocean with emphasis on the delineation of the spawning areas of albacore, *Thunnus alalunga*. *Bull Far Seas Fish Res Lab* **2**: 177-256.
- Ueyanagi S (1971) Larval distribution of tunas and billfishes in the Atlantic Ocean. *FAO Fisheries report* **71**: 297-305
- Viñas J, Santiago J, Pla C (1999) Genetic characterization and Atlantic Mediterranean stock structure of Albacore, *Thunnus alalunga*. *ICCAT Col Vol Sci Pap* **49**: 188-191.
- Viñas J & Tudela S (2009) A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus *Thunnus*). *PLoS ONE*, **4**: e7606.
- Viñas J, Alvarado Bremer JR, Pla C (2004) Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Mar Biol* **145**: 225-232.
- Viñas J, Gordo A, Fernández-Cebrián R, Pla C, Vahdet U et al. (2011) Facts and uncertainties about the genetic population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. Implications for fishery management. *Reviews in Fish Biol Fish* **21**: 527-541.
- Vucetich JA, Waite TA, Nunney L (1997) Fluctuating population size and the ratio of effective to census population size (N_e/N). *Evolution* **51**: 2017-2021.
- Waldman JR, Richards RA, Schill WB, Wirgin I y Fabrizio MC (1997) An empirical comparison of stock identification techniques applied to striped bass. *Trans Am Fish Soc* **126**: 369-385
- Waldman JR (1999) The importance of comparative studies in stock analysis. *Fish Res* **43**: 237-246.
- Walli A, Teo SLH, Boustany A, Farwell CJ, Williams T et al. (2009) Seasonal Movements, Aggregations and Diving Behavior of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) Revealed with Archival Tags. *PLoS ONE* **4**: e6151.
- Wang J (2005) Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philos T Roy Soc B* **360**: 1395-1409.

- Wang IJ (2011) Choosing appropriate genetic markers and analytical methods for testing landscape genetic. *Mol Ecol* **20**: 2480–2482.
- Waples RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**: 379-391.
- Waples, RS (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Hered* **98**: 438-450.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) Invited review: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* **15**: 1419-1439.
- Waples RS, Naish KA (2009) Genetic and evolutionary considerations in fishery management: Research needs for the future. In: The Future of Fisheries Science in North America. *Fish Fish Ser* **31** (ed. by R. Beamish & B. Rothschild): 427-451. Springer, Netherlands.
- Waples RS, Yokota M (2007) Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* **175**: 219-233.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**: 191-201.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Whiteley AR, Hastings K, Wenburg JK, Frissell CA, Martin JC, Allendorf FW (2010) Genetic variation and effective population size in isolated populations of coastal cutthroat trout. *Conserv Genet* **11**: 1929-1943.
- Whitlock MC, Barton NH (1997) The effective size of a subdivided population. *Genetics* **146**: 427-441.

Yeh SY, Hui CF, Treng TD, Kuo CL (1996) Indian Ocean albacore stock structure studies by morphometric and DNA sequence methods. In: Anganuzzi A.A., Stobberup K.A., Webb N.J.e. (eds) *Proceedings of the sixth expert consultation on Indian ocean tunas*. IPTP, Colombo, Sri Lanka, 25-29 September 1995: 258-263

Yeh SY, Treng TD, Hui CF, Penney AJ (2007) Mitochondrial DNA sequence analysis on albacore, *Thunnus alalunga*, meat samples collected from the waters off western South Africa and the eastern Indian Ocean. *Col Vol Sci Pap*. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas **46**: 152-159.

Zarraonaindia I (2011) Estudio genético de la estructura poblacional de la anchoa europea (*Engraulis encrasicolus*). PhD thesis. University of the Basque Country (UPV/EHU), Genetics, Physical Anthropology & Animal Physiology Department.



Single nucleotide polymorphism discovery in albacore and Atlantic bluefin tuna provides insights into worldwide population structure

A. Albaina*, M. Iriondo*, I. Velado*, U. Laconcha*[¶], I. Zarronaindia*, H. Arrizabalaga[¶],
M. A. Pardo[†], M. Lutcavage[‡], W. S. Grant[§] and A. Estonba*

*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), P.O. Box 48940, Leioa, Spain. [†]AZTI Tecnalia, Food Research Unit, Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea, Edif. 609, Derio (Bizkaia), Spain. [‡]Environmental Conservation Department, Marine Fisheries Institute, University of Massachusetts Amherst, P.O. Box 3188, Gloucester, MA, 01931, USA. [§]Commercial Fisheries Division, Alaska Department of Fish and Game, Anchorage, AK, 99518, USA. [¶]AZTI Tecnalia, Herrera Kaia Portualdea z/g, P.O. Box 20110, Pasaia, Gipuzkoa, Spain.

Summary

The optimal management of the commercially important, but mostly over-exploited, pelagic tunas, albacore (*Thunnus alalunga* Bonn., 1788) and Atlantic bluefin tuna (BFT; *Thunnus thynnus* L., 1758), requires a better understanding of population structure than has been provided by previous molecular methods. Despite numerous studies of both species, their population structures remain controversial. This study reports the development of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in albacore and BFT and the application of these SNPs to survey genetic variability across the geographic ranges of these tunas. A total of 616 SNPs were discovered in 35 albacore tuna by comparing sequences of 54 nuclear DNA fragments. A panel of 53 SNPs yielded F_{ST} values ranging from 0.0 to 0.050 between samples after genotyping 460 albacore collected throughout the distribution of this species. No significant heterogeneity was detected within oceans, but between-ocean comparisons (Atlantic, Pacific and Indian oceans along with Mediterranean Sea) were significant. Additionally, a 17-SNP panel was developed in Atlantic BFT by cross-species amplification in 107 fish. This limited number of SNPs discriminated between samples from the two major spawning areas of Atlantic BFT ($F_{ST} = 0.116$). The SNP markers developed in this study can be used to genotype large numbers of fish without the need for standardizing alleles among laboratories.

Keywords fisheries management, population genetics, single nucleotide polymorphism (SNP), single nucleotide polymorphism discovery, *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*

Introduction

Molecular genetics has led to considerable progress in understanding the ecologies of marine species by providing new insights into the demographic and evolutionary dynamics of wild populations (Hauser & Carvalho 2008). Genetic markers are widely used to identify stocks, to estimate mixed stocks in a fishery, to monitor genetic diversity within populations and to measure connectivity between populations, among many other applications (e.g., Nielsen *et al.* 2009; Waples & Naish 2009). These studies have overturned the classic notion that large marine populations are genetically homogeneous with limited local

adaptation by showing extensive genetic population structure in many marine species (reviewed in Hauser & Carvalho 2008). Moreover, genetic structuring has been reported even across small spatial scales (e.g., Knutsen *et al.* 2003, 2007, 2011; Jørgensen *et al.* 2005). However, data are still rare for the vast majority of highly exploited species, even though a large number of studies on genetic population structure of marine fish have been published in the past decades. Genetic studies are needed to improve the management of species for which stock structure and migration patterns are still unclear. An improper management of these fishery resources can lead to the extirpation of small independent stocks or to the under-utilization of large stocks.

This study focuses on two widely distributed pelagic tunas: albacore (*Thunnus alalunga* Bonn., 1788) and Atlantic bluefin tuna (BFT; *Thunnus thynnus* L., 1758). Albacore is one of the smallest tunas and BFT one of the largest in the genus *Thunnus*. Although albacore is a widely distributed species, inhabiting both temperate and tropical pelagic waters of all oceans, the distribution of Atlantic BFT is

Address for correspondence

A. Estonba, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), P.O. Box 48940, Leioa, Spain.
E-mail: andone.estonba@ehu.es

Accepted for publication 18 March 2013

RESEARCH ARTICLE

New Nuclear SNP Markers Unravel the Genetic Structure and Effective Population Size of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*)

Urtzi Laconcha^{1,2}, Mikel Iriondo², Haritz Arrizabalaga^{1*}, Carmen Manzano², Pablo Markaide², Iratxe Montes², Iratxe Zarronaindia², Igor Velado², Eider Bilbao³, Nicolas Goñi¹, Josu Santiago⁴, Andrés Domingo⁵, Saadet Karakulak⁶, Işık Oray⁶, Andone Estonba^{2*}

1 AZTI, Marine Research Division, Herrera Kaia Portualdea z/g, Pasaia (Gipuzkoa), Spain, 2 Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Sarriena auzoa z/g, Leioa (Bizkaia), Spain, 3 Cell Biology & Environmental Toxicology Research Group, Research Centre for Experimental Marine Biology & Biotechnology (PIE) & Department of Zoology & Animal Cell Biology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Sarriena auzoa z/g, Leioa (Bizkaia), Spain, 4 AZTI, Marine Research Division, Txatxarramendi Ugarteia z/g, Sukarrieta (Bizkaia), Spain, 5 Laboratory of Pelagic Resources, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), Constituyente 1497, Montevideo, Uruguay, 6 Fisheries Faculty of Istanbul University, Laleli, Istanbul, Turkey



CrossMark
click for updates

* harri@azti.es (HA); andone.estonba@ehu.es (AE)

OPEN ACCESS

Citation: Laconcha U, Iriondo M, Arrizabalaga H, Manzano C, Markaide P, Montes I, et al. (2015) New Nuclear SNP Markers Unravel the Genetic Structure and Effective Population Size of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*). PLoS ONE 10(6): e0128247. doi:10.1371/journal.pone.0128247

Academic Editor: Roberta Cimmaruta, Tuscia University, ITALY

Received: December 4, 2014

Accepted: April 23, 2015

Published: June 19, 2015

Copyright: © 2015 Laconcha et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by the projects ATM2010 Hegaluze (351BI20090047) and TUNASNIP (SPE10UN92) funded by the Basque Government. Urtzi Laconcha's work was supported by a PhD grant by the Fundación Centros Tecnológicos Iñaki Goenaga. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

In the present study we have investigated the population genetic structure of albacore (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) and assessed the loss of genetic diversity, likely due to overfishing, of albacore population in the North Atlantic Ocean. For this purpose, 1,331 individuals from 26 worldwide locations were analyzed by genotyping 75 novel nuclear SNPs. Our results indicated the existence of four genetically homogeneous populations delimited within the Mediterranean Sea, the Atlantic Ocean, the Indian Ocean and the Pacific Ocean. Current definition of stocks allows the sustainable management of albacore since no stock includes more than one genetic entity. In addition, *short-* and *long-term* effective population sizes were estimated for the North Atlantic Ocean albacore population, and results showed no historical decline for this population. Therefore, the genetic diversity and, consequently, the adaptive potential of this population have not been significantly affected by overfishing.

Introduction

Albacore tuna (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre 1788) is distributed in the Atlantic, Pacific and Indian Oceans and in the Mediterranean Sea, extending from 50–55°N to 40–45°S [1]. This species is the fourth most important one of the *Thunnus* genus with regard to captures [2]. This fact reflects the high commercial value of the albacore and its related products, which makes this species likely to be exploited beyond its maximum sustainable yield [1]. Migrations on this species has been studied for several decades through tag-recapture experiments showing low rate of albacore migration between hemispheres [3], and no transoceanic [3,4,5]

