

Análisis de paternidad en la centolla *Maja* *brachydactyla*, Balss 1922



Elba Rodríguez Pena
Máster en Biología Marina

Directores:
Andrés Martínez Lage
Patricia Verísimo Amor



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA
CELULAR E MOLECULAR

Campus da Zapateira, s/n
15071 A Coruña. España – Spain
Teléfono: 981167000
Fax: 981167065

D Andrés Martínez Lage y Dña Patricia Verísimo Amor manifiestan que el trabajo de fin de máster “Análisis de paternidad en la centolla Maja brachydactyla, Balss 1922” ha sido desarrollado satisfactoriamente por Elba Rodríguez Pena con una calificación de 10 puntos. Por tanto, autorizan la presentación de dicho trabajo para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 28 Enero de 2015

Fdo.: Andrés Martínez Lage

Patricia Verísimo Amor

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	7
METODOLOGÍA.....	8
Ejemplares de estudio.....	8
Determinación del tejido óptimo para la extracción de ADN en adultos	9
Toma de muestras.....	9
Extracción de ADN.....	10
Cuantificación por espectrofotometría y análisis estadístico de los datos.....	11
Multipaternidad	12
Toma de muestras.....	12
Extracción de ADN.....	12
Amplificación y secuenciación del gen mitocondrial 16S	13
Amplificación y análisis de marcadores microsatélites.....	13
RESULTADOS	15
Comparación de la concentración de ADN obtenida a partir de diferentes tejidos.....	15
Amplificación del gen 16S y de los marcadores microsatélite	19
DISCUSIÓN.....	21
Determinación del tejido óptimo para la extracción de ADN materno	21
Multipaternidad	23
CONCLUSIONES	27
AGRADECIMIENTOS.....	28
REFERENCIAS.....	29
APÉNDICE 1	36
APÉNDICE 2	37

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el tamaño de las poblaciones de algunas especies marinas de interés comercial se ha visto reducido a pesar de la creación de medidas de gestión pesquera basadas en estudios sobre su biología. En Galicia, diferentes especies de interés comercial se encuentran intensamente explotadas, entre ellas la centolla *Maja brachydactyla* Balss, 1922. En torno a la centolla se desarrolla una importante actividad socioeconómica, siendo las costas gallegas su principal zona de explotación en España, tanto a nivel de producción (73%) como a nivel económico (más del 80% de los ingresos). Por este motivo, se han realizado numerosos estudios sobre diferentes aspectos de su biología, de especial interés para la regulación de su pesquería (González-Gurriarán, 1993, 1995, 1998; Sampedro *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2002; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Corgos, 2004; Corgos *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2009; Corgos & Freire, 2007; Sotelo *et al.*, 2008; Corgos, *et al.*, 2010; Corgos, *et al.*, 2011; Verísimo *et al.*, 2011).

M. brachydactyla es un crustáceo decápodo de la familia Majidae (Ng *et al.*, 2008; De Grave *et al.*, 2009) muy común en la costa atlántica europea. *M. brachydactyla* se clasificaba inicialmente dentro de la especie *Maja squinado* (Herbst, 1788), pero en los últimos años se han identificado diferencias morfológicas (Neumann, 1996, 1998) y moleculares (Sotelo *et al.*, 2008) entre las poblaciones del Atlántico y el Mediterráneo que han permitido confirmar que se trata de una especie diferente. Tras esta separación, se considera que su distribución se circunscribe al Atlántico Oriental, desde el Sur del Mar del Norte hasta Sudáfrica, incluyendo las islas de Madeira, Azores, Canarias y Cabo Verde (Clark, 1986; Hines *et al.*, 1995; Neumann, 1998; Udekem d'Acoz, 1999; Sotelo *et al.*, 2009).

En general, los crustáceos decápodos presentan ciclos vitales complejos, con fases larvarias planctónicas y fases postlarvarias bentónicas, lo que determina que su distribución y su dinámica de poblaciones estén estrechamente relacionadas tanto con procesos de dispersión larvaria, mediados por factores físicos, como de selección de hábitat, ligados a los movimientos y migraciones en estadios postlarvarios (Pardieck *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001).

El ciclo vital de *M. brachydactyla* consta de tres fases principales: fase larvaria, fase juvenil o de crecimiento y fase adulta o reproductiva.

La fase larvaria planctónica dura de 2 o 3 semanas y consiste en dos estados de zoea (zoea I y II) y un estado de megalopa (Iglesias *et al.*, 2002; Guerao *et al.*, 2008) (Figura 1).

Figura 1. Larvas zoea (I y II) y megalopa de *M. brachydactyla* (Guerao *et al.*, 2008; Andrés, 2010).

La fase juvenil comienza tras el asentamiento bentónico del primer estadio postlarvario, que tiene lugar desde finales de primavera hasta otoño (Corgos, 2004). Durante esta fase, que dura de 2 a 3 años (Le Foll, 1993), los juveniles habitan fondos someros (<15m) donde realizan movimientos limitados, no direccionales y a pequeña escala, con desplazamientos de menos de 10 m al día (Hines *et al.*, 1995; González-Gurriarán *et al.*, 2002; Bernárdez *et al.*, 2003). Su crecimiento se realiza mediante mudas sucesivas que siguen un patrón variable en función de la talla, siendo menor el número de mudas cuanto mayor es la talla del juvenil (González-Gurriarán *et al.*, 1995).

Tras la muda terminal, que tiene lugar en primavera y verano, los individuos alcanzan la madurez sexual y comienza la fase adulta. En las hembras se producen cambios en la morfología del abdomen, pasándose de un abdomen plano sin pleópodos desarrollados (juveniles) a un abdomen más ancho y abombado, con espacio disponible para la incubación de las puestas, y pleópodos completamente desarrollados (adultas). Mientras que, en los machos se produce un cambio en el tamaño relativo de los quelípedos con respecto al cuerpo (Sampedro *et al.*, 1999; Corgos & Freire, 2006).

Entre finales de verano y principios de otoño, los adultos empiezan la migración reproductiva hacia zonas más profundas (30-100m) con fondos de sustratos blandos (Freire & González-Gurriarán, 1998).

Los machos de menor talla realizan la migración antes, sin haber recuperado la condición fisiológica normal tras la muda terminal, para conseguir apareamientos que no conseguirían compitiendo con los machos de mayor tamaño, que llegan más tarde a las zonas de apareamiento, tras recuperarse fisiológicamente del proceso de muda (Corgos, 2004).

Antes del apareamiento, se producen interacciones agonísticas entre los machos (Stevens *et al.*, 1993; Sainte-Marie *et al.*, 1997; Rondeau & Sainte-Marie, 2001; Correa *et al.*, 2003) en las que los grandes excluyen a los pequeños. Otras veces, los machos pequeños son rechazados por las hembras (Goshima *et al.*, 2000). También es posible que los machos por debajo de cierta talla

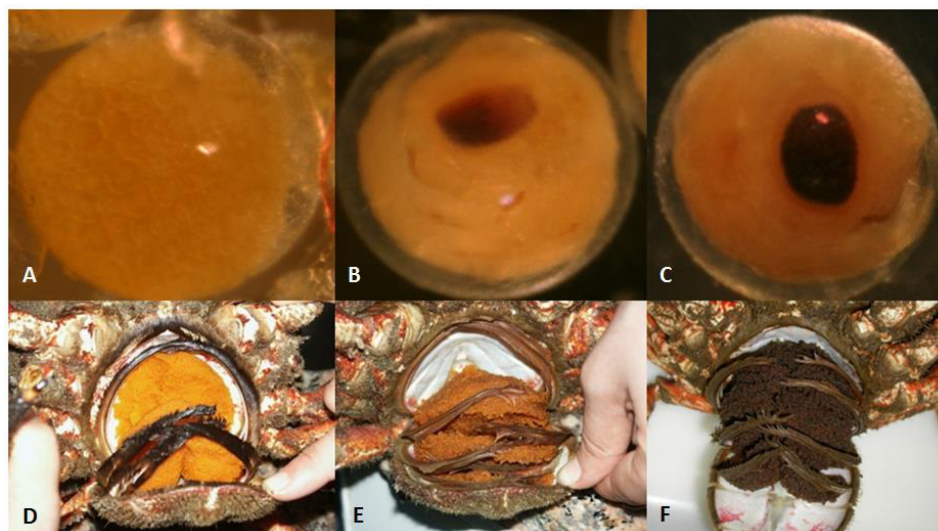
no sean capaces de aparearse con hembras grandes, ya que no dispondrán de quelípedos suficientemente grandes como para sujetar a las hembras durante el cortejo y el apareamiento (Brosnan, 1981; Rodhouse, 1984; Jivoff, 1997a). Por estas razones, los machos de mayor tamaño presentan mayores probabilidades de apareamiento que los de menor tamaño, hipótesis apoyada por observaciones de apareamientos de decápodos en el medio natural, en los cuales los machos suelen ser mayores que las hembras (Brosnan, 1981; Conan & Comeau, 1986; Ennis *et al.*, 1988; Paul, 1992). Tras el apareamiento, las hembras retornan a aguas someras para la incubación de la primera puesta del ciclo anual.

Estas migraciones y procesos de selección de hábitat determinan la existencia de poblaciones de juveniles y adultos postpubertales en aguas someras, poblaciones de machos y hembras adultos en aguas profundas (las hembras sólo en otoño e invierno), y hembras adultas en aguas someras (en primavera y verano), que regresan probablemente para acelerar la incubación de las puestas (Corgos, 2004).

La fecundación en la centolla es interna y tiene lugar simultáneamente a la extrusión de los huevos a la cavidad abdominal, quedando posteriormente adheridos a los apéndices abdominales de la hembra hasta su eclosión (Diesel, 1991).

En la Ría de Arousa, el ciclo de cría anual de las hembras de *M. brachydactyla* se inicia en diciembre y continúa hasta noviembre del año siguiente. Durante la incubación, proceso que dura entre 30 y 74 días dependiendo de la temperatura del agua (Brosnan, 1981; González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998; Iglesias *et al.*, 2002), los huevos pasan por tres estados de desarrollo diferentes (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998) (Figura 2): Estado A, con coloración naranja y gran cantidad de vitelo; Estado B, con coloración marrón y esbozo del ojo; Estado C, con coloración gris oscuro, presencia de cromatóforos, ojos bien desarrollados y sin apenas vitelo.

Figura 2. Estados de desarrollo por los que pasan los huevos de *M. brachydactyla* durante la incubación. Huevo en estado de desarrollo A (A), B (B) y C (C); puesta en estado de desarrollo A (D), B (E) y C (F).



Cada hembra puede fecundar varias puestas sucesivas sin necesidad de realizar nuevos apareamientos gracias a que disponen de receptáculos seminales o espermatecas. En estas espermatecas almacenan el esperma que, en forma de espermatozoides, reciben de las cópulas con uno o varios machos distintos. En Galicia, el número estimado de puestas que puede realizar una hembra en cada ciclo reproductivo anual es de tres (González-Gurriarán *et al.*, 1998). Por ejemplo, una hembra de tamaño medio (158 mm de longitud del cefalotórax) puede presentar aproximadamente unos 300000 huevos mientras que una hembra de tamaño grande (191 mm de longitud del cefalotórax) puede llegar a tener hasta 530000 huevos en su puesta (Verísimo *et al.*, 2011).

Se ha observado en otros decápodos majoideos, como *Chionoectes opilio* (Sainte-Marie *et al.*, 2000) e *Inachus phalangium* (Diesel, 1990), que las masas de esperma se almacenan dorsoventralmente en las espermatecas cuando no están muy llenas, es decir, la última masa de esperma se almacena más cerca del oviducto. Esta disposición favorece que sea el esperma del último macho que se aparea con la hembra el que fertilice la puesta y, por tanto, la paternidad de un solo macho. Sin embargo, en *M. brachydactyla* la disposición de las masas de esperma es diferente a la observada en estas especies: cuando hay varias masas, éstas se disponen paralelas al eje mayor de las espermatecas y, si éstas están muy llenas, la disposición no es estratificada (González-Gurriarán *et al.*, 1998). Estos resultados no implican una mayor probabilidad de paternidad de los últimos machos con los que se aparea la hembra, sino probablemente la paternidad de los machos de mayor tamaño, con más posibilidades de ser elegidos por las hembras y de desplazar a otros machos en las interacciones producidas.

Por otra parte, algunos machos (especialmente machos pequeños que copulan con hembras grandes) pueden no disponer de esperma suficiente para fecundar la puesta completa de una hembra (Nakatsuru & Kramer, 1982; Gage & Cook, 1994, Pitnick & Markow, 1994; Preston *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2005, 2006). Esto podría favorecer el que una hembra se aparease con varios machos para asegurar la fecundación completa de sus puestas.

La capacidad de *M. brachydactyla* para el almacenamiento a largo plazo de esperma en sus espermatecas, la disposición de los espermátóforos en las mismas (González-Gurriarán *et al.*, 1998) y la posible limitación de esperma provocada por el apareamiento con machos pequeños conducen a la sospecha de que las hembras poseen el potencial de usar el esperma de múltiples machos al mismo tiempo, es decir, de la posible existencia de paternidad múltiple en esta especie.

Sin embargo, a pesar de los estudios previamente realizados sobre la biología reproductiva de la centolla, la multipaternidad en esta especie es una cuestión que no se ha resuelto todavía, y que debería abordarse debido a su relevancia en cuestiones relacionadas con la sostenibilidad de las poblaciones naturales, como es el caso del tamaño efectivo y, por tanto, el potencial reproductivo de las mismas.

El tamaño efectivo de las poblaciones depende tanto de la capacidad de las hembras para producir oocitos, como de la capacidad de los machos para fecundarlos. Por esta razón, no es suficiente con conocer la proporción sexual y la distribución de tallas en las poblaciones, sino que es necesario también estimar la capacidad de los machos para fecundar las puestas de las hembras a través de estudios de paternidad.

Por esta razón, el tamaño efectivo de las poblaciones naturales, aunque resulte paradójico, podría verse afectado por algunas medidas de regulación pesquera, ya que si bien intentan controlar el efecto de la explotación pesquera sobre el tamaño poblacional, podrían llegar a alterar la estructura de las poblaciones naturales, fundamentalmente en cuanto al *sex-ratio* y a la distribución de las frecuencias de tallas. En Galicia, dado que la centolla presenta un ciclo reproductivo anual muy amplio y por tanto, un elevado porcentaje de hembras ovadas (prohibidas para la pesca) al menos seis meses al año, la pesquería legal se centra en la captura de los machos. Por otra parte, las capturas suelen estar centradas en los ejemplares de mayor tamaño, que son los que, por norma general, poseen un mayor potencial reproductivo (las hembras más grandes producen puestas de mayor tamaño y los machos más grandes tienen mayor capacidad de fecundación).

Este hecho podría llevar a una situación de desequilibrio, a nivel de la proporción sexual y de la estructura de tallas de ambos sexos, afectando al potencial reproductivo y al tamaño de las poblaciones naturales y, en definitiva, a la sostenibilidad de la pesca de la centolla.

OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es establecer las bases para el estudio de la posible paternidad múltiple en la centolla *M. brachydactyla*. Para este fin se procederá a:

- La determinación del tejido óptimo para la extracción de ADN en adultos.
- La amplificación y secuenciación del gen mitocondrial 16S para comprobar la calidad del ADN obtenido para posteriores pruebas de paternidad.
- La amplificación y el análisis de diversos marcadores microsatélite específicos de la especie para determinar la posible existencia de multipaternidad.

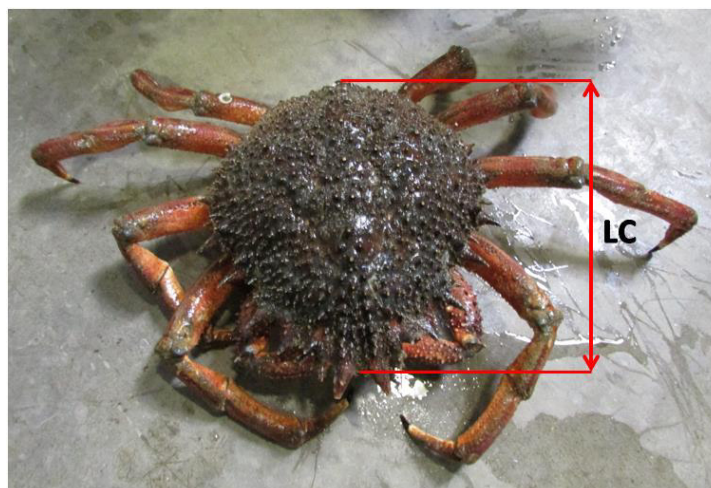
METODOLOGÍA

Ejemplares de estudio

Con el apoyo de buceadores del Aquarium Finisterrae, se llevaron a cabo muestreos para la captura de ejemplares de centolla, *Maja brachydactyla*, Balss 1922 dentro de la Ría de A Coruña. Durante estas inmersiones se capturaron 57 hembras de centolla que fueron trasladadas a las instalaciones del Aquarium Finisterrae en neveras portátiles a baja temperatura y con paños humedecidos en agua de mar.

Una vez trasladadas, se midió la longitud del caparazón (medida entre la unión de las espinas del rostro y el borde posterior del cefalotórax, Figura 3) con un calibre al 0.1 milímetro más cercano.

Figura 3. Medida de la longitud del caparazón (LC).



A continuación, se procedió a la identificación de las hembras mediante el marcaje de los pereiópodos con bridas de colores. Además, a cada hembra se le otorgó un identificador acorde a la clase de talla a la que pertenecía (Tabla 1). También se anotó la presencia de huevos en el abdomen de las hembras y su estado de desarrollo.

Tabla 1. Clases de talla de las hembras de *M. brachydactyla* mantenidas en cautividad en el Aquarium Finisterrae.

Longitud caparazón	Clase de talla	Inicial nombre
< 150 mm	Pequeña	P
150-170 mm	Mediana	M
> 170 mm	Grande	G

Una vez marcadas, las hembras se introdujeron en un tanque de 8000 L (Figura 4) conectado a una unidad de circuito abierto de agua de mar, para reproducir las condiciones ambientales de su hábitat natural.

Figura 4. Ejemplares de estudio en uno de los tanques de 8000L de capacidad del Aquarium Finisterrae.



Se probaron tres tipos diferentes de dieta: mejillón cocido congelado sin concha, mejillón crudo congelado con concha y caballa y arenque congelados. La dieta seleccionada fue la de mejillón crudo congelado con concha, tanto por la predilección que mostraron los ejemplares de centolla por este alimento en las observaciones realizadas, como por su amplia utilización en estudios anteriores (González-Gurriarán *et al.*, 1998; Corgos, 2004; Guerao & Rotllant, 2009; Simeó *et al.*, 2013). Además, la limpieza del tanque era más sencilla cuando las centollas eran alimentadas con mejillón que cuando eran alimentadas con pescado, y las puestas mostraban mejor pigmentación. Los ejemplares de estudio fueron alimentados tres veces por semana, proporcionando a cada individuo una ración aproximada de 100g en cada toma.

Además, se realizaron seguimientos semanales de los ejemplares, en los que se anotaron la presencia y el estado de desarrollo de la puesta en las hembras, así como otras incidencias observadas (muertes, presencia de heridas, etc.).

Determinación del tejido óptimo para la extracción de ADN en adultos

Toma de muestras

Las hembras que se encontraron muertas en los seguimientos periódicos, fueron diseccionadas para averiguar las posibles causas de la muerte. Asimismo, se recogieron piezas bucales, dos o tres pleópodos y uno o dos fragmentos de pereiópodos (preferiblemente de la zona distal que incluye el dactilo) de cada hembra.

En total, se tomaron 32 muestras de 8 hembras. Todas ellas fueron conservadas en etanol absoluto hasta el momento de su procesado. Se eligió este método porque se había comprobado en estudios anteriores (Rodríguez Pena, 2013) que era adecuado para la posterior obtención de ADN de las muestras almacenadas. Además, se trata de un método de conservación sencillo y poco agresivo con los tejidos comparado con otros métodos frecuentemente empleados (ej. liofilización, conservación en formol, etc.).

Extracción de ADN

El inicio del proceso de extracción varió en función del tejido de partida.

Piezas bucales. Se tomó un endito del segundo par de maxilípedos (Figura 5), se le cortó la base y se anotó su peso. A continuación, se cortó en pequeños fragmentos.

Figura 5. Detalle de las piezas bucales de un individuo de *M. brachydactyla*.



Sedas de pleópodo (Figura 6). Se recortaron 10mg de sedas de la rama externa de los pleópodos conservados en etanol y, a continuación, se cortaron en fragmentos más pequeños. Se eligieron las sedas de la rama externa de los pleópodos porque, además de ser más abundantes, las sedas de la rama interna cumplen una importante función proporcionando soporte a los paquetes de huevos.

Figura 6. Detalle de los pleópodos de una hembra de *M. brachydactyla* con huevos adheridos en sus sedas.



Pereiópodos. De estas estructuras se procesaron dos tipos de tejido:

- **Músculo.** Se tomaron 50mg de músculo de pereiópodo. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos antes de la extracción.
- **Sedas de pereiópodo** (Figura 7). Después de haberlos cepillado para minimizar la contaminación en la muestra, se raspó la superficie de 1-3 artejos de los pereiópodos extraídos con un bisturí. De las sedas obtenidas se pesó una cantidad de aproximada de 20mg.

Figura 7. Detalle de un pereiópodo de *M. brachydactyla* en el que se observan las sedas de su superficie.



La extracción de ADN se llevó a cabo empleando el kit comercial Realpure Spin Kit (Real Laboratory). El protocolo empleado fue el especificado por el fabricante para “*Extracción de ADN genómico a partir de 25mg de tejido animal*” con ligeras modificaciones: una vez añadidos el tampón de lisis y la proteinasa K a la muestra, ésta fue homogeneizada y, a continuación, se realizó una incubación a 55°C toda la noche.

Cuantificación por espectrofotometría y análisis estadístico de los datos

La concentración de ADN obtenida se midió mediante espectrofotometría empleando el NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). La posible contaminación del ADN se determinó gracias a los ratios 260/280 (contaminación por proteína) y 260/230 (contaminación por otros compuestos orgánicos e inorgánicos) proporcionados por el propio espectrofotómetro. Además, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% como comprobación de la cantidad y calidad del ADN extraído.

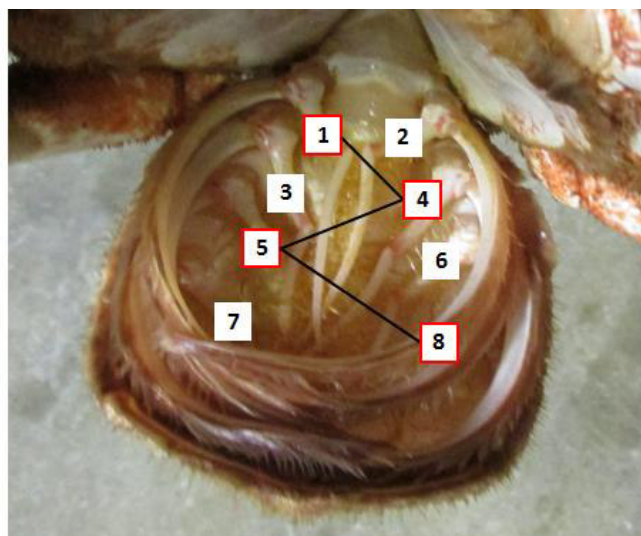
Los datos de concentración de ADN obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico con el fin de establecer posibles diferencias entre los diversos tejidos. Para ello, se realizaron los test pertinentes para comprobar si los datos cumplían las hipótesis necesarias y, a continuación, se llevó a cabo un análisis ANOVA con el factor de tratamiento “Tipo de tejido” y el factor de bloqueo “Hembra”, empleando el software R 3.0.2.

Multipaternidad

Toma de muestras

En un estudio anterior (Rodríguez Pena, 2013) se determinó que el estado de desarrollo medio o estado B de los huevos es el que permite obtener una mayor cantidad de ADN en la extracción. Por tanto, cuando en los seguimientos periódicos se detectó que alguna hembra ovada presentaba la puesta en este estado de desarrollo se procedió a extraerle la puesta. Para la extracción de la puesta, primero se numeraron los pleópodos tal y como muestra la Figura 8. Luego se recogieron muestras de aproximadamente 500 huevos de varios pleópodos seleccionados (pleópodo 1, 4, 5, 8), una muestra con la totalidad de la puesta restante y sedas de la rama externa de los pleópodos.

Figura 8. Parte interior del abdomen de una hembra mostrando los pleópodos numerados de izquierda a derecha (desde el punto de vista del observador) y de dentro a afuera. Recuadrados en rojo, aparecen los pleópodos de los que se tomaron muestras de huevos describiendo una Z.



Todas estas muestras fueron introducidas en botes herméticos y conservadas en etanol absoluto. La recogida de muestras se realizó en siete hembras.

Extracción de ADN

El inicio del proceso de extracción, varió en función del tejido de partida.

Huevos. Se extrajo el ADN de conjuntos de 20 huevos para poder detectar la presencia de múltiples alelos que permitiesen desvelar la existencia de multipaternidad. Por otro lado, se extrajo ADN de huevos individuales para la amplificación y secuenciación del gen mitocondrial 16S. Por cada una de las siete hembras analizadas, se extrajo ADN de un conjunto de 20 huevos y de 2 huevos individuales.

Sedas de pleópodo. Se utilizó este tejido de partida para extraer ADN materno para las pruebas de paternidad. Para ello, se tomaron directamente las sedas recortadas durante la toma de muestras en el *Aquarium Finisterrae* y se cortaron en fragmentos más pequeños.

La extracción de ADN se llevó a cabo con el mismo kit y siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior.

Amplificación y secuenciación del gen mitocondrial 16S

Para comprobar la calidad del ADN extraído de las muestras de huevos y de las sedas de los pleópodos de hembras adultas, se amplificó el gen mitocondrial del ARN ribosómico 16S. Para ello, se buscó en la bibliografía disponible una pareja de primers capaz de amplificar el gen diana. Los primers escogidos fueron 16L29-F (5'-YGCCTGTTTATCAAAAACA-3') y 16HLeu-R (5'-CATATTATCTGCCAAAATAG-3') (Schubart, 2009). La PCR se llevó a cabo empleando el kit comercial "NZYTaQ 2x Green Master Mix, separate MgCl₂" (Real Laboratory). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25µl que contenía aproximadamente 25ng de ADN, 12.5µL de Green Master Mix (con una concentración de dNTPs de 200µM), 4mM de MgCl₂ (incluyendo el MgCl₂ presente en la Master Mix) y 0.5µM de cada cebador. Inicialmente, se realizó una PCR en gradiente que consistió en una desnaturalización inicial 5min a 95°C seguida de 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a las temperaturas de hibridación del gradiente (43; 43.7; 45.1; 47; 49.6; 51.7; 53.1 y 54°C), y 45s a 72°C seguidos de una extensión final de 5min a 72°C. El objetivo de este programa de PCR era determinar la temperatura de hibridación óptima para, a continuación, crear el programa de PCR definitivo.

El éxito de la amplificación se comprobó realizando electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Los productos de PCR para los que se observó banda en el gel fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando la herramienta BLAST del NCBI, para comprobar que pertenecían al gen 16S de *M. brachydactyla*, y los programas ClustalX 2.1 y BioEdit 7.1.9 para detectar posibles diferencias entre las secuencias.

Amplificación y análisis de marcadores microsatélites

Para detectar posible multipaternidad en la centolla *M. brachydactyla*, se encargó a la Unidad de Biología Molecular del SAI la amplificación de marcadores microsatélite específicos de esta especie anteriormente descritos por Sotelo *et al.* (2007) (Tabla 2). Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas por estos autores. El análisis de los resultados obtenidos se realizó empleando el programa Geneious Pro 5.6.7, considerando la existencia de

multipaternidad cuando era posible distinguir en el pool de huevos más de 3 alelos ausentes en el genotipo de la madre.

Tabla 2. Características de los loci microsatélite anteriormente descritos por Sotelo *et al.* (2007) para la centolla *M. brachydactyla*. Los loci analizados en este trabajo son los que se encuentran recuadrados en rojo (Sotelo *et al.*, 2007).

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat unit	Size	Range	A	H _O	H _E	HWE
mMb9	CACGGAGACAAGTCCTGTA AGTAGGCACCCTTTGAACT	(AC) ₁₆	350	347-351	3	0.65	0.57	0.4448
mMb12	TGGAACCTCTCTTTTCAGGTAAC TGGACTAACAAATCGTTGGTAA	(AAC) ₁₄	182	168-204	10	0.60	0.76	0.3235
mMb15FAM	CCCTCCAGTCTGTATGAG CGTTCTGTTTTCCAGTTAC	(TG) ₁₉	137	132-190	8	0.60	0.79	0.0209
mMb15NED	AACGGTGTGTTGATGTGTGG GGTCCCCCTCTGATTTTGAT	(AC) ₂₃	250	239-293	20	1	0.95	1
mMb23	TAACTACACAGCAGTAT GGTATTTGTTGTGATAA	(AC) ₈ AAA (AC) ₅ AT(AC) ₆	242	238-244	4	0.45	0.58	0.1941
mMb33	GCTCGTGGTTTTGTCTTG TTACCTTATCCTTTGGGAGAGT	(CT) ₁₇ (CA) ₁₇	194	183-209	10	0.30	0.92	0.0000*
mMb307	GCCAGGCTACGAACATTGTA GTAACCCAGCATTTGTCAG	(AC) ₁₇	178	162-180	7	0.53	0.82	0.0051*
mMb339	GGAATCTCAAAGCGTTTATCAG TTGCTCAAGAAGGACAGTGA	(AC) ₁₈	205	195-229	12	1	0.89	0.7825
mMb403	GAGGCAAGTCCATTTTACCT AGATGCTAACCGCTCGTC	(GT) ₃₆	278	230-284	13	1	0.88	0.9149

A: número de alelos por locus; H_O: heterocigosidad observada; H_E: heterocigosidad esperada; HWE: p-valores del test para desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (los asteriscos indican valores significativos (P<0.05)).

También se llevó a cabo la amplificación de estos marcadores microsatélite de centolla utilizando el Microsatellite PCR Kit (Qiagen) y los correspondientes primers. El protocolo empleado, fue el especificado por el fabricante para “Primers marcados y sin colas”. El programa de PCR, también propuesto por el fabricante, consiste en una desnaturalización inicial 5min a 95°C seguida de 30 ciclos de 30s a 95°C, 90s a 57°C y 30s a 72°C seguidos de una extensión final de 30min a 68°C. A continuación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% para comprobar el éxito de la amplificación.

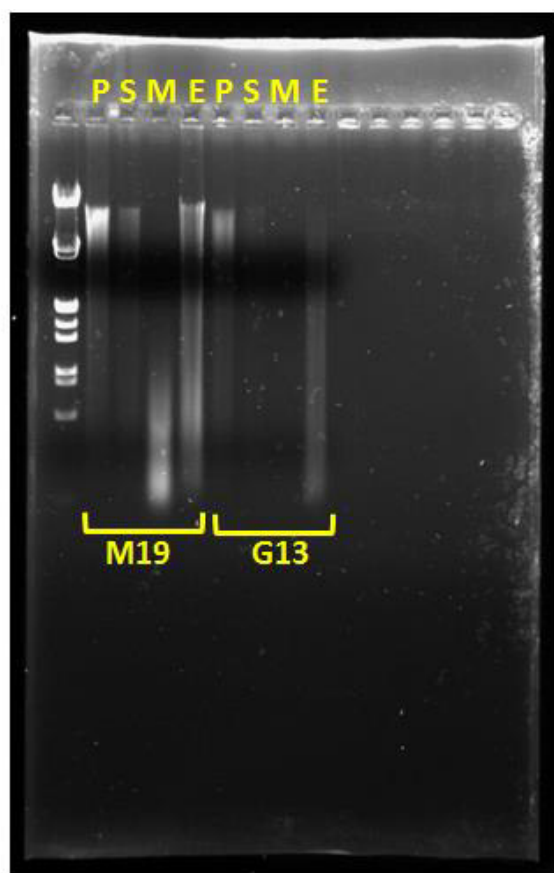
RESULTADOS

Comparación de la concentración de ADN obtenida a partir de diferentes tejidos

Los datos de concentración de ADN (en $\mu\text{g/g}$ tejido) obtenidos para los diferentes tejidos se muestran en el Apéndice 1.

Los datos obtenidos a partir de las muestras de músculo fueron eliminados del análisis debido a la alta variabilidad en las concentraciones de ADN ($\sigma = 306.698$) y a la escasa calidad de éste. Cuando las cantidades de ADN obtenidas a partir de músculo eran altas, se pudo ver en los geles de ADN genómico realizados que se trataba de fragmentos muy pequeños, esto es, el ADN estaba muy degradado (Figura 9). Por esta razón, se decidió eliminar del análisis los datos obtenidos para el músculo. Las posibles razones de estos resultados anómalos se discuten más adelante (Ver Discusión).

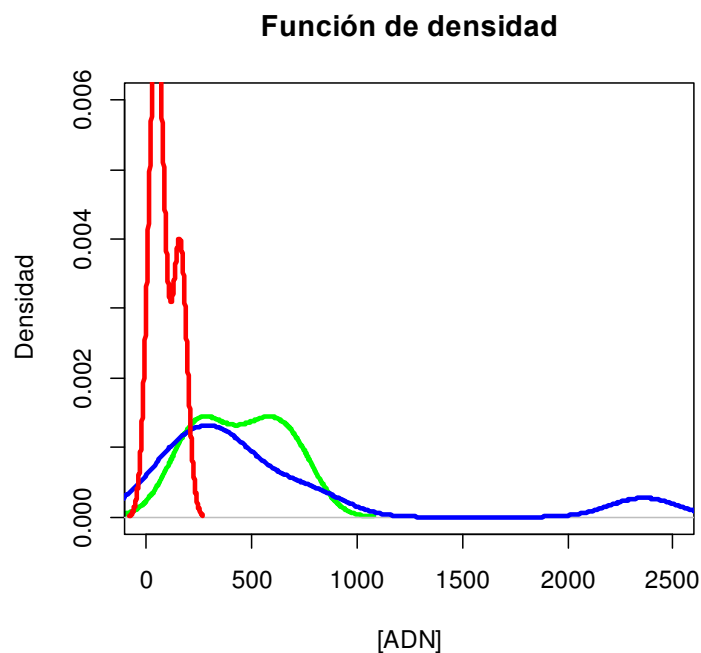
Figura 9. Gel de agarosa al 1% en el que se visualiza el ADN genómico de 4 tejidos (P: sedas de pleópodo, S: sedas de pereiópodo, M: músculo, E: endito de maxilípodo) de 2 hembras diferentes (M19 y G13). Se puede apreciar como el ADN de M19 extraído de músculo está degradado (los fragmentos que se observan en el gel son de bajo peso molecular).



Con los datos de concentración del ADN obtenido a partir de sedas de pleópodo, sedas de pereiópodo y endito de maxilípodo se realizó un análisis ANOVA con el factor de tratamiento “Tipo de Tejido” con el fin de determinar las posibles diferencias entre los diferentes tejidos. Puesto que se tomaron 4 muestras de cada una de las 8 hembras y podría existir entre éstas una diferencia en las concentraciones de ADN que no nos interesa analizar, se incluyó en el análisis el factor “Hembra” como factor de bloqueo.

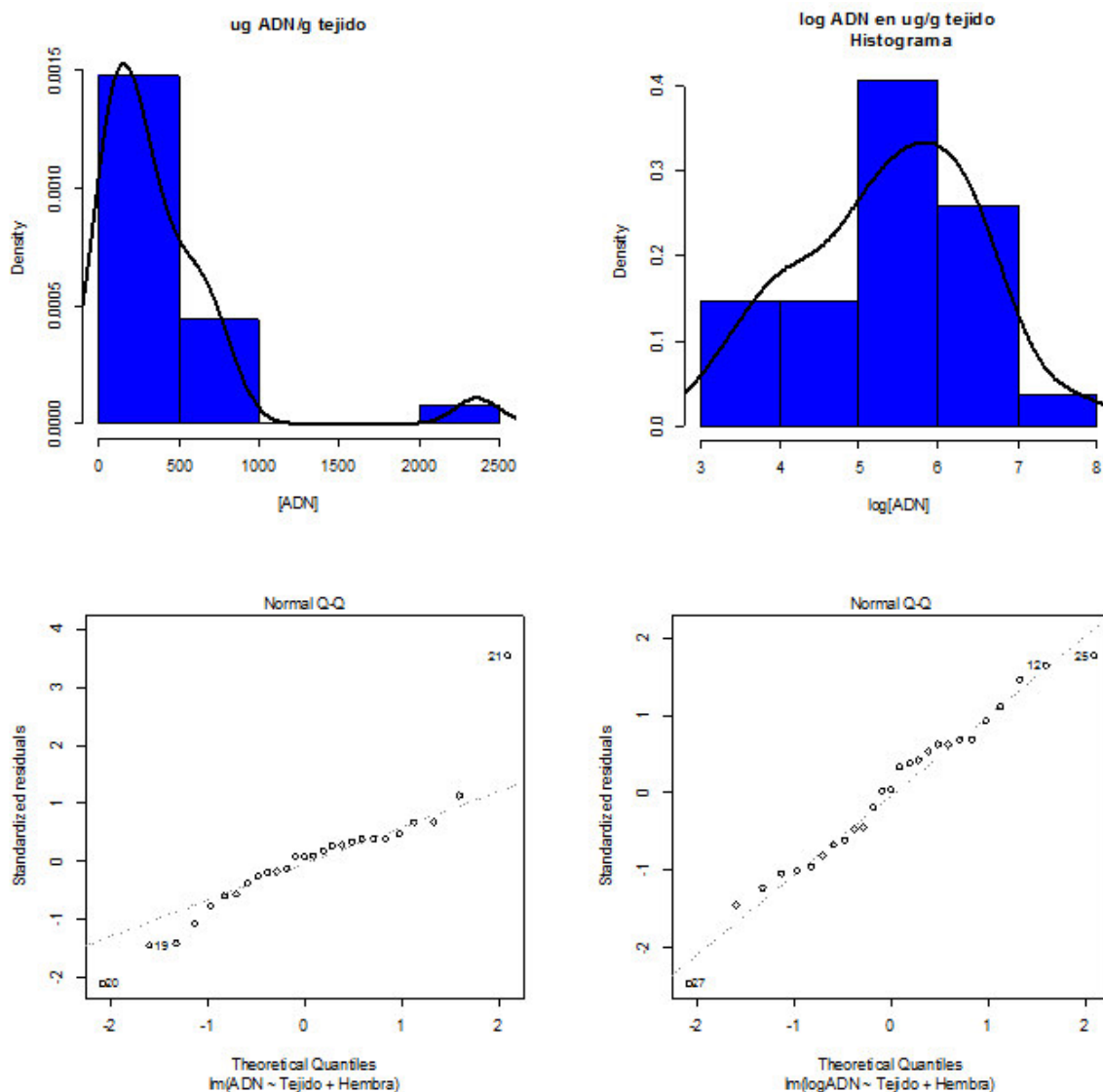
No se pudo trabajar con los datos originales ya que estos no cumplían las hipótesis de homocedasticidad (Figura 10) y normalidad (Figura 11) necesarias para realizar el ANOVA.

Figura 10. Función de densidad representada para cada tejido por separado (rojo: sedas de pereiópodo, verde: sedas de pleópodo, azul: endito de maxilípodo). Se observa claramente la ausencia de homocedasticidad, esto es, que la varianza de cada grupo es muy diferente de las demás.



Para solucionar los problemas de heterocedasticidad y ausencia de normalidad se aplicó a los datos una transformación logarítmica (Figura 11). También se comprobó que los datos cumplían la hipótesis de independencia empleando el test de Ljung-Box.

Figura 11. Arriba: histograma antes (izquierda) y después (derecha) de la transformación logarítmica de los datos; abajo: gráfico Q-Q antes (izquierda) y después (derecha) de la transformación logarítmica de los datos. Se puede observar cómo, las barras del histograma se ajustan mejor a una campana de Gauss y la nube de puntos del gráfico Q-Q se ajusta mejor a la recta después de la transformación.



A continuación, se repitió el análisis ANOVA con los datos modificados. En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis. Teniendo en cuenta que el p-valor correspondiente es menor que 0.001 ($\alpha = 0.05$), se puede afirmar que existen diferencias significativas en la concentración de ADN extraída de los diferentes tejidos. Por otra parte, a partir de los datos de sumas de cuadrados proporcionados por la tabla ANOVA, se calculó el porcentaje de la variable respuesta que explica el factor de bloqueo. Puesto que el porcentaje es de 22.75%, es recomendable incluir el factor de bloqueo hembra en el modelo. El factor de tratamiento “Tejido” explica un 55.13% de la variable respuesta “Concentración de ADN”. Esto supone que el modelo explica en total un 77.88% de la variable respuesta ($R^2 = 0.78$), o lo que es lo mismo, no consigue explicar el 22.12% de la variable “Concentración de ADN”.

Tabla 3. Tabla del análisis ANOVA con el factor de tratamiento “Tejido” y el factor de bloqueo “Hembra”.

Origen	gl	Suma de cuadrados tipo III	Media cuadrática	F	Significación
Tejido	2	17.391	8.695	19.934	0.000*
Hembra	8	7.178	0.897	2.057	0.104
Error	16	6.979	0.436		

*Significación menor de 0.001

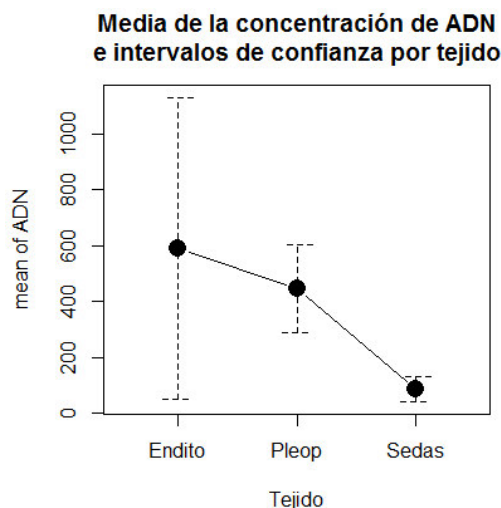
Una vez establecido que existen diferencias significativas entre los distintos tejidos, se llevó a cabo el test de Tukey para definir entre cuáles de ellos existen dichas diferencias. Los resultados del test pusieron de manifiesto que las diferencias en la concentración de ADN sólo eran significativas en los casos Sedas de pereiópodo-Endito de maxilípodo y Sedas de pereiópodo-Sedas de pleópodo (Ver tabla 4).

Tabla 4. Extracto de la tabla del test de Tukey obtenida que muestra los p-valores correspondientes a cada uno de los pares comparados.

Comparación por pares	p-valor
Sedas Pleop-Endito	0.969
Sedas Per-Endito	0.000*
Sedas Per-Sedas Pleop	0.000*

*Significación menor de 0.001

A continuación, se representaron los intervalos de confianza para las medias correspondientes (Figura 12) para determinar de cuál de los tejidos se obtiene una mayor cantidad de ADN. Observando el gráfico se concluyó que a partir de las sedas de pereiópodo se obtiene una menor cantidad de ADN que de las sedas de pleópodo o de los enditos.

Figura 12. Gráfico de medias de la concentración de ADN y sus intervalos de confianza al 95% para cada uno de los tejidos analizados. Endito: endito de maxilípodo, Pleop: sedas de pleópodo, Sedas: sedas de pereiópodo.

Amplificación del gen 16S y de los marcadores microsatélite

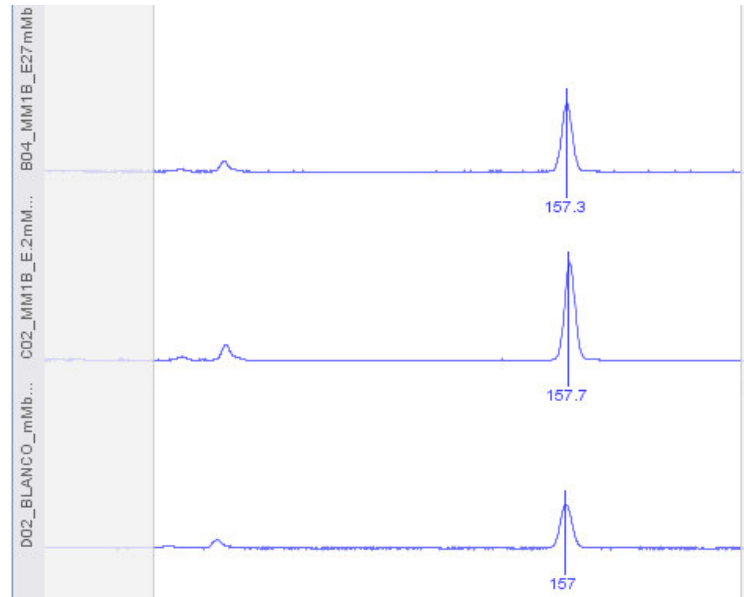
Se consiguió amplificar el gen mitocondrial 16S empleando una temperatura de hibridación de 53.1°C, tras lo cual los productos de PCR fueron enviados a la Unidad de Biología molecular del SAI. El alineamiento de las secuencias de los huevos individuales y de las correspondientes hembras con el programa ClustalX 2.1 permitió observar las diferencias existentes. De las 7 hembras estudiadas, sólo dos de ellas mostraron posiciones polimórficas con respecto a las secuencias de sus huevos: en la hembra P7 se observó una posición polimórfica (posición 580) y en la hembra M26, dos (posiciones 365 y 580) (Apéndice 2). Las diferencias entre la secuencia de las hembras M26 y P7, y sus correspondientes huevos probablemente se deban a mutaciones del genoma mitocondrial de una célula germinal.

De cada una de estas dos hembras se extrajo el ADN de cinco huevos más. Tras amplificar el gen 16S y enviar los productos de PCR a secuenciar, se pudo observar que todos los huevos de la hembra M26 mostraban una secuencia idéntica entre sí, mientras que los de la hembra P7 se dividían en dos grupos: dos de los huevos analizados tenían una secuencia igual a la de la hembra adulta y los otros cinco se diferenciaban de ésta en una base (Apéndice 2).

En cuanto a las pruebas de paternidad, no se han conseguido amplificar los microsatélites descritos por Sotelo *et al.* (2007), ni usando sus mismas condiciones de PCR (trabajo encargado al SAI), ni empleando el protocolo del Microsatellite PCR Kit (Qiagen).

La visualización con el programa Geneious Pro 5.6.7 de los datos enviados por la Unidad de Biología Molecular del SAI tras intentar amplificar los marcadores microsatélite, permitió observar picos de amplificación únicamente para el loci mMb15FAM. Estos picos, que podrían ser interpretados como alelos, aparecían también en el blanco incluido en el análisis (Figura 13), por lo que los datos obtenidos tuvieron que ser descartados.

Figura 13. Imagen obtenida con el software Genious en la que se observan los picos correspondientes al locus mMb15FAM. Se puede ver como el pico presente en las muestras (arriba y en el centro) también se encontró en el blanco (abajo).



Por lo tanto, no se han obtenido resultados de paternidad concluyentes en este trabajo.

DISCUSIÓN

Determinación del tejido óptimo para la extracción de ADN materno

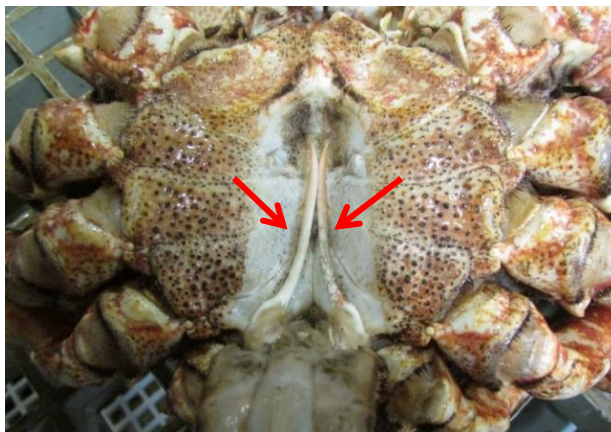
En un trabajo anterior (Rodríguez Pena, 2013) se había concluido que el estado de desarrollo óptimo de los huevos para la extracción de ADN en centolla era el estado de desarrollo medio, estado B. El presente trabajo permite completar el estudio metodológico referente a la extracción de ADN para estudios de paternidad en la centolla *M. brachydactyla*.

El músculo es un tejido muy empleado para la obtención de ADN para pruebas de paternidad en crustáceos (Sainte-Marie *et al.*, 1999; Streiff *et al.*, 2004; McKeown & Shaw, 2008; Baggio *et al.*, 2011) aunque también existen algunos autores que emplean piezas bucales (Urbani *et al.*, 1998) o pleópodos (Yue *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011) para la extracción de ADN. En este trabajo, se compara el rendimiento obtenido a partir de diferentes tejidos de ejemplares adultos de *M. brachydactyla* y se incluyen las sedas de pleópodo y pereiópodo como nuevos tejidos válidos para la obtención de ADN en centolla. Se ha incluido el músculo en el estudio debido a que los ejemplares ya se encontraban muertos en el momento de la toma de muestras; sin embargo, el objetivo de este trabajo es proporcionar tejidos alternativos que no supongan la muerte del animal o le provoquen graves daños. La extracción de ADN sin muerte supone una ventaja en cuanto a que permite seguir realizando otros estudios con los mismos ejemplares. Por otra parte, la extracción de ADN a partir de estructuras que permitan evitar la mutilación de los ejemplares (por ejemplo, sedas) reduce la probabilidad de una muerte provocada por la toma de muestras y evita el sufrimiento animal, un tema que hoy en día despierta especial preocupación. Otros autores han buscado alternativas al sacrificio de los ejemplares estimulando la autotomía de apéndices (Toonen, 2004), pero para que este fenómeno se produzca es necesario someter a los animales a condiciones de estrés.

De los tejidos de hembras adultas incluidos en el análisis estadístico, los que permiten obtener una mayor cantidad de ADN son los enditos del segundo par de maxilípedos y las sedas de pleópodo. No se obtuvieron datos válidos para incluir el músculo en el análisis, ya que existía una elevada variabilidad entre los datos proporcionados por el espectrofotómetro y el ADN obtenido estaba degradado. Puesto que el ADN fue extraído de ejemplares muertos y no de ejemplares sacrificados, es probable que el músculo estuviese en diferentes estados de degradación en las diferentes hembras en el momento de la toma de muestras o que el tejido estuviese más degradado a medida que nos desplazamos de la parte proximal a la parte distal del pereiópodo (en general, se observó que las muestras de músculo tomadas del dácilo proporcionaban una menor cantidad de ADN que las tomadas del propodio).

A pesar de que los enditos del segundo par de maxilípedos y las sedas de los pleópodos proporcionan una mayor cantidad de ADN que las sedas de los pereiópodos, estos tejidos muestran ciertos inconvenientes. Los machos presentan solamente dos pares de pleópodos transformados en apéndices copuladores (Figura 14), por lo que no se podría extraer ADN a partir de las sedas de pleópodos en machos.

Figura 14. Vista ventral de un macho de *M. brachydactyla* con el abdomen abierto. Las flechas rojas señalan los apéndices copuladores.



Por otra parte, la extracción de un endito en un ejemplar vivo puede ser una tarea complicada y que puede dejar secuelas al individuo, tanto por el estrés provocado durante la toma de muestras como por la dificultad para alimentarse que puede llegar a tener tras la extracción de esta pieza bucal. Por estas razones, las sedas de pereiópodo pueden ser un interesante tejido alternativo para la extracción de ADN para pruebas de paternidad (especialmente para la extracción de ADN paterno). De estas estructuras se han obtenido cantidades suficientes como para amplificar y secuenciar el gen 16S de *M. brachydactyla*, lo cual indica una buena calidad del ADN. Esto supone que las sedas de pereiópodo pueden ser un tejido adecuado para la extracción de ADN de ejemplares adultos sin causarles la muerte ni daños graves que puedan reducir sus probabilidades de supervivencia, como pueden ser la extracción de un dactilo o una pieza bucal.

Las sedas que recubren el caparazón y los pereiópodos de muchos decápodos tienen principalmente función sensorial (Derby, 1982, 1989; Laverack, 1988). Además, también cumplen un importante papel en el camuflaje de los individuos (Hartnoll, 1993; Wicksten, 1993; Woods, 1995; Fürböck & Patzner, 2005) sirviendo como punto de anclaje a algas, esponjas, poliquetos tubícolas, etc. que ayudan al animal a pasar desapercibido para los depredadores (Figura 15). Esto supone que la extracción de sedas de los pereiópodos podría afectar negativamente a los individuos estudiados; no obstante, el camuflaje se convierte en

una necesidad secundaria para ejemplares mantenidos en cautividad en ausencia de depredadores y, en cualquier caso, la toma de muestras afectaría a una superficie tan pequeña que apenas tendría repercusiones para el desarrollo normal de la vida del animal.

Figura 15. Juvenil de *M. brachydactyla* con algas adheridas a su superficie que cumplen una función de camuflaje.



Por otra parte, el modelo estadístico planteado en este trabajo sólo es capaz de explicar un 77.88% de la variable respuesta (“Concentración de ADN extraído”). Para intentar mejorar la resolución del modelo, sería necesario aumentar el tamaño muestral ($n=24$ en este estudio) y tener réplicas para cada hembra y tejido para poder incluir en el modelo la interacción entre el factor de tratamiento “Tipo de tejido” y el factor de bloqueo “Hembra”. Esto permitiría obtener unas conclusiones más fiables acerca de cuál es el tejido que proporciona una mayor cantidad de ADN en ejemplares adultos.

Multipaternidad

La ausencia de problemas en los procesos de amplificación y secuenciación del gen 16S pone de manifiesto que el ADN obtenido, tanto de los huevos en estado de desarrollo B como de las sedas de los pleópodos de las hembras, es de buena calidad. El alineamiento de estas secuencias permitió observar que el ADN mitocondrial se hereda en *M. brachydactyla* por vía materna, ya que las secuencias obtenidas para las hembras y sus correspondientes huevos eran iguales, a excepción de dos de las siete hembras en las que se detectaron diferencias.

Estas diferencias observadas entre las secuencias de huevos y las secuencias maternas se deben probablemente a mutaciones producidas en el genoma mitocondrial durante el desarrollo de las células germinales de las hembras correspondientes. Sin embargo, parecen existir diferencias en el momento en el que se produjo la mutación. En el caso de la hembra M26, las mutaciones

presentes debieron producirse en un estado de desarrollo de las células germinales muy temprano, puesto que todos los huevos analizados muestran la mutación. En cambio, en la hembra P7 la mutación debió producirse en un estado de desarrollo temprano pero posterior al del caso anterior, ya que varios de los huevos muestran diferencias con la secuencia materna, pero otros tienen una secuencia idéntica a la de la hembra adulta.

Teniendo en cuenta que el ADN obtenido mostró una buena calidad, la ausencia de resultados sobre multipaternidad en centolla empleando los marcadores microsatélite descritos por Sotelo *et al.* (2007) puede deberse a que los primers sólo funcionen en unas condiciones muy específicas, puesto que cada marcador fue amplificado por los autores en unas condiciones características (Tabla 5). A pesar de haber empleado las mismas concentraciones de polimerasa, primers y MgCl₂, y los mismos programas de PCR, es posible que las condiciones de amplificación de los microsatélites no fuesen idénticas a las utilizadas por Sotelo *et al.* (2007). Por ejemplo, errores de calibrado en los aparatos empleados podrían suponer pequeñas diferencias en las temperaturas que afectasen al éxito de amplificación.

Tabla 5. Características de PCR para la amplificación de los marcadores microsatélite aislados en la centolla *Maja brachydactyla* (Sotelo *et al.*, 2007). Recuadrados en rojo se resaltan los loci analizados en el presente trabajo.

Locus	Composition				Reaction volume	Cycle						Number of cycles
	DNA	Primers	MgCl ₂	Taq		D	t	A	t	E	t	
mMb12		0.5			20	95	20	50	20	72	20	35
mMb15FAM		0.7	0.5									
mMb23			0.75									
mMb33	0.7	0.5	0.75				10	45/48	10		12	10/20 ^a
mMb9							15	67	15		15	30
mMb15NED		0.5	0.5	0.1			10	52	10		12	
mMb307			0.25	0.08	10							
mMb339				0.05								
mMb403												

Los volúmenes de reacción aparecen expresados en µl, las temperaturas en °C y el tiempo en segundos.

D: temperatura desnaturalización, A: temperatura hibridación; E: temperatura extensión y t: tiempo.

^a El programa de PCR para mMb33 consistió en 10 ciclos a 45°C seguidos de 20 ciclos a 48°C.

Puesto que no se han obtenido resultados empleando los microsatélites específicos de *M. brachydactyla* descritos anteriormente, conviene diseñar nuevos marcadores microsatélite que puedan ser amplificados conjuntamente bajo unas mismas condiciones de PCR más generalistas. El análisis de estos nuevos marcadores permitirá determinar si la puesta de una hembra de centolla puede ser fecundada por más de un macho.

La multipaternidad es un fenómeno que ha sido estudiado en diferentes especies de crustáceos (Urbani *et al.*, 1998; Roy, 2003; Toonen, 2004; Gosselin *et al.*, 2005; Hua Yue & Chang, 2010; Baggio *et al.*, 2011; Bailie *et al.*, 2011; MacKeown & Shaw, 2008; Wang *et al.*, 2011; Reaney *et al.*, 2012), aunque parece ser un fenómeno poco frecuente (por ejemplo Diesel, 1991; Koga

et al., 1993; Jensen *et al.*, 1996; Urbani, *et al.*, 1998). En los casos en los que se ha detectado este fenómeno, se han observado importantes diferencias entre especies: la incidencia de la multipaternidad en el cangrejo de río *Orconectes placidus* es del 60% (Walker *et al.*, 2002), en la cigala *Nephrops norvegicus* del 54.6% (Streiff *et al.*, 2004), en el cangrejo de porcelana *Petrolisthes cinctipes* del 80% (Toonen, 2004) y en la langosta *Homarus americanus* del 13% (Gosselin *et al.*, 2005). En hembras primíparas del cangrejo *Chionoecetes opilio* se han detectado distintos niveles de multipaternidad en diferentes trabajos realizados (0%, Urbani *et al.*, 1998; 0%, Sainte-Marie, *et al.* 1999; 3.8%, Roy, 2003).

En especies en las que existe guardia post-copulatoria (Hartnoll, 1969; Nelson & Hedgecock, 1977; Atema *et al.*, 1979; Claxton *et al.*, 1994; Goshima *et al.*, 1996; Jivoff, 1997b, Reaney *et al.*, 2012), el macho vigila a la hembra tras la cópula para evitar que otro macho fecunde sus huevos, reduciéndose así las probabilidades de paternidad múltiple en la puesta de la hembra. Pero incluso en los casos en los que se observan múltiples apareamientos, existen mecanismos que favorecen la paternidad de un solo macho, como la extracción del esperma o la estratificación del esperma (Birkhead & Hunter, 1990). La primera categoría implica la eliminación del esperma previamente depositado en el tracto reproductor femenino (por ejemplo, Waage, 1979; Rubenstein, 1989). En el segundo caso, el esperma del último macho desplaza el esperma de los machos anteriores hacia el extremo ciego de la espermateca, lejos de los conductos eferentes que salen del ovario (por ejemplo, Smith 1979). Este último mecanismo que favorece la paternidad del último de los machos que se aparean con la hembra, se observa en especies como *Chionoecetes opilio* (Sainte-Marie *et al.*, 2000) o *Inachus phalangium* (Diesel, 1990). Sin embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, este no es el caso de *M. brachydactyla* (González-Gurriarán *et al.*, 1998), por lo que cabría sospechar de la existencia de paternidad múltiple en la centolla.

La aparición del fenómeno de la paternidad múltiple puede deberse en algunos casos a que los machos pequeños no poseen suficiente esperma como para fecundar la puesta completa de una hembra. En las poblaciones muy explotadas, la proporción de machos grandes en relación a las hembras receptivas puede ser menor, obligando a las hembras, quizás especialmente a las hembras más pequeñas y, por tanto, menos fecundas (menos atractivas para los machos) a aparearse con machos pequeños que proporcionan cantidades de esperma insuficientes para fertilizar la totalidad de la puesta (Gosselin *et al.*, 2005). Bajo estas circunstancias, las hembras pueden intentar aparearse con otros machos (Easton, 1976; Gosselin *et al.*, 2003).

Los apareamientos múltiples suponen numerosos beneficios para la especie: vigilancia de las hembras vulnerables por su pareja (por ejemplo, Jensen *et al.*, 1996); garantizar la fertilización, bien porque algunos machos sean estériles, bien porque algunos machos invierten menos esperma en las hembras que el necesario para fecundar toda la puesta, o bien por la reducción del esperma activo que se produce en los órganos de almacenamiento debido a pérdida pasiva o la mortalidad del esperma en el tiempo (Jennions & Petrie, 2000); y el aumento de la diversidad genética entre la descendencia (Schneider & Elgar, 1998, Jennions & Petrie, 2000), entre otros.

Se ha demostrado que la paternidad múltiple aumenta el tamaño efectivo de las poblaciones (Sugg & Chesser, 1994). Se trata de una estrategia reproductiva que permite mantener la diversidad en las poblaciones pequeñas (Morán & García-Vázquez, 1998) o reducir la endogamia (Stockley *et al.*, 1993). Por esta razón, la incidencia de la paternidad múltiple puede verse incrementada a medida que aumenta el nivel de explotación de las poblaciones (Gosselin *et al.*, 2005) como mecanismo de recuperación. Estas características demuestran el interés de los estudios de sistemas de apareamiento y, en particular de la paternidad múltiple, para la gestión de la pesca.

En estudios futuros, se procederá a la identificación de nuevos loci microsatélite en la centolla *M. brachydactyla* y al diseño de los primers necesarios para su amplificación con el fin de desvelar la posible multipaternidad en esta especie.

En caso de confirmarse la existencia de paternidad múltiple en *M. brachydactyla*, sería interesante estudiar otros aspectos relacionados con este fenómeno: tamaño relativo del macho con respecto a la hembra en los apareamientos, tiempo de transferencia de esperma y número de cópulas, relación entre la disposición de los espermatozoides y la disposición de los huevos fecundados en los pleópodos de la hembra, porcentaje de contribución de cada uno de los machos a la fecundación de la puesta, etc. Estas cuestiones ayudarán a tener una visión global de la biología reproductiva de la especie con la que poder introducir cambios y mejoras en las medidas de regulación pesquera en el caso de ser necesario.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen de la realización del presente trabajo son las siguientes:

- De los tejidos de individuos adultos que fueron analizados, los tejidos de los que se obtiene una mayor concentración de ADN son las sedas de los pleópodos y los enditos de los maxilípedos. No obstante, no es viable la extracción de ADN de sedas de pleópodo en machos y la extracción de piezas bucales (así como de músculo de pereiópodo) es un método que provoca lesiones que pueden llegar a afectar a la supervivencia del animal. Por esta razón, las sedas de pereiópodo posiblemente sean el tejido más adecuado para la extracción de ADN en machos, ya que es un método menos agresivo y el ADN que se obtiene tiene una calidad suficientemente buena como para ser empleado en pruebas de paternidad. En el caso de las hembras, las sedas de la rama externa de los pleópodos parecen ser indiscutiblemente el tejido óptimo para la extracción de ADN sin dañar a los ejemplares.
- Las diferencias observadas en las secuencias del gen mitocondrial 16S entre las hembras analizadas y sus huevos probablemente se deban a mutaciones del genoma mitocondrial en un estado de desarrollo temprano de las células germinales. En la hembra M26 la mutación se produjo en un estado de desarrollo anterior al de la hembra P7.
- Aunque en este trabajo no se ha logrado resolver la cuestión de la multipaternidad en centolla, los resultados metodológicos obtenidos acerca de la extracción de ADN tanto de tejidos de ejemplares adultos como de huevos, suponen una importante puesta a punto de la técnica que precede a las pruebas de paternidad.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al *Aquarium Finisterrae* por ceder sus instalaciones para este proyecto y a sus buceadores por su apoyo en el muestreo de los ejemplares de estudio. También agradezco a Doña Graciela Estévez Pérez su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

REFERENCIAS

- Andrés, M. (2010). El cultiu de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*: aspectes zootécnicos, bioquímics i nutricionals del desenvolupament larvari. Departament de Fisiologia (Biologia), Universitat de Barcelona. Barcelona, IRTA Sant Carles de la Ràpita, 211.
- Atema, J., Jacobson, S., Karnofsky, E., Oleszkosuts, S., & Stein, L. (1979). Pair formation in the lobster, *Homarus americanus*: behavioral-development, pheromones and mating. *Marine Behaviour and Physiology*, 6, 277-296.
- Baggio, R. A., Pil, M. W., Boeger, W. A., Patella, L. A., Ostrensky, A., & Pie, M. R. (2011). Genetic evidence for multiple paternity in the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Biology Research*, 7, 520-524.
- Bailie, D. A., Hynes, R., & Prodoehl, P. A. (2011). Genetic parentage in the squat lobsters *Munida rugosa* and *M. sarsi* (Crustacea, Anomura, Galatheididae). *Marine Ecology Progress Series*, 421, 173-182.
- Balss, H. (1922). Crustacea VII: Decapoda Brachyura (Oxyrhyncha und Brachyrhyncha) und geographische Übersicht über Crustacea Decapoda. In: W. Michaelsen, editor. Beiträge zur Kenntnis der Meeresfauna Westaflicas, Hamburg: Friederichsen and Co., 69-110.
- Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., García-Calvo, B., Corgos, A. & Freire, J. (2003). Movements of juvenile and adult spider crab (*Maja squinado*) in the Ría da Coruña (N-W Spain). Aquatic telemetry: advances and applications. *Proceedings of the Fifth Conference on Fish Telemetry held in Europe*, Ustica, Italy, Rome, 133-139.
- Birkhead, T., & Hunter, F. (1990). Mechanisms of sperm competition. *Trends in Ecology & Evolution*, 5, 48-52.
- Brosnan, D., M. (1981). Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maja squinado* Herbst (1768) of the west coast of Ireland. Department of Zoology. University College Galway, Ireland, 133
- Clark, P.F. (1986). The larval stages of *Maja squinado* (Herbst, 1768) (Crustacea: Brachyura: Majidae) reared in the laboratory. *Journal of Natural History*, 20, 825-836.
- Claxton, W. T., Govind, C. K., & Elner, R. W. (1994). Chela function, morphometric maturity, and the mating embrace in male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1110-1118.
- Conan, G., & Comeau, M. (1986). Functional maturity and terminal molt of male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 1710-1719.
- Corgos, A. (2004). Estrategia vital, estructura espacial y dinámica poblacional de la centolla, *Maja squinado* (Decapoda: Majidae). Tesis doctoral, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de A Coruña.
- Corgos, A., Verísimo, P. & Freire, J. (2006). Timing and seasonality of the terminal molt and mating migration in the spider crab, *Maja brachydactyla*: evidence of alternative mating strategies. *Journal of Shellfish Research* 25, 577-587.

- Corgos, A. & Freire J (2007). Assessment of methods to estimate abundance and population structure of the spider crab *Maja brachydactyla* in soft substrates. *Fisheries Research*, 83, 297-305.
- Corgos, A., Sánchez, N. & Freire, J. (2010). Dynamics of the small-scale spatial structure of a population of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Journal of Shellfish Research*, 29, 25-36.
- Corgos, A., Bernárdez, C. Sampedro, M. P., Verísimo, P. & Freire, J. (2011). Spatial structure of the spider crab, *Maja brachydactyla* population: Evidence of metapopulation structure. *Journal of Sea Research*, 66, 9-19.
- Correa, C., Baeza, J., Hinojosa, I., & Thiel, M. (2003). Male dominance hierarchy and mating tactics in the rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea). *Journal of Crustacean Biology*, 23, 33-45.
- De Grave, S., Pentcheff, N. D., Ahyong, S. T., Chan, T. Y., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., *et al.* (11 others) (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *The Raffles Bulletin of Zoology*, Suppl. 21, 109 pp.
- Derby, C. D. (1982). Structure and function of cuticular sensilla of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology* 2, 1-21.
- Derby, C. D. (1989). Physiology of sensory neurons in morphologically identified cuticular sensilla of crustaceans, pp. 27-47. In: B. E. Felgenhauer, L. Watling, and A. A. Thistle (eds.), *Functional Morphology of Feeding and Grooming in Crustacea. Crustacean Issues* 6. Balkema, Rotterdam.
- Diesel, R. (1990). Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae): a male ghost spider crab that seals off rivals sperm. *Journal of Zoology*, 220, 213-223.
- Diesel, R. (1991). Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). In: *Crustacean Sexual Biology*. Bauer, R.T. & J.W. Martin (eds.). New York, Columbia University Press, 145-163.
- Easton, M. D. L. (1976). Lobster population modelling. Annual Report Fisheries Marine Service, Biological Station St. John's, Newfoundland, 14.
- Ennis, G., Hooper, R., & Taylor, D. (1988). Functional maturity in small male snow crabs (*Chionoecetes opilio*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 2106-2109.
- Freire, J., & González-Gurriarán, E. (1998). New approaches to the behavioural ecology of decapod crustaceans using telemetry and electronic tags. *Hydrobiologia*, 372, 123-132.
- Freire, J., Bernárdez, C., Corgos, A., Fernández, L., González-Gurriarán, E., Sampedro, M. P. & Verísimo, P. (2002). Management strategies for sustainable invertebrate fisheries in coastal ecosystems of Galicia (NW Spain). *Aquatic Ecology*, 36, 41-50.
- Freire, J., Carabel, S., Verísimo, P., Bernárdez, C. & Fernández, L. (2009). Patterns of juvenile habitat use by the spider crab *Maja brachydactyla* as revealed by stable isotope analyses. *Scientia Marina* 73, 39-49.

- Fürböck, S., & Patzner, R. A. (2005). Decoration preferences of *Maja crispata* Risso 1827 (Brachyura, Majidae). *Natura Croatica*, 14, 175-184.
- Gage, M., & Cook, P. (1994). Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Functional Ecology*, 8, 594-599.
- González-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J., Muiño, R. & Parapar, J. (1993). Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the Southern Galician coast (NW Spain). ICES, Shellfish Committee. C.M. 1993/K:19:15.
- González-Gurriarán, E., Freire, J., Parapar, J., Sampedro, M.P. & Urcera, M. (1995). Growth at moult and moulting seasonality of the spider crab, *Maja squinado* (Herbst) (Decapoda: Majidae) in experimental conditions: implications for juvenile life history. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189, 183-203.
- González-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J., & Muíño, R. (1998). Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220, 269-285.
- González-Gurriarán, E., Freire J. & Bernárdez C. (2002). Migratory patterns in female spider crabs *Maja squinado* using electronic tags and telemetry. *Journal of Crustacean Biology*, 22, 91-97.
- Goshima, S., Koga, T., & Murai, M. (1996). Mate acceptance and guarding by male fiddler crabs *Uca tetragonon* (Herbst). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 196, 131-143.
- Goshima, S., Kanazawa, M., Yoshino, K., & Wada, S. (2000). Maturity in male stone crab *Hapalogaster dentata* (Anomura: Lithodidae) and its application for fishery management. *Journal of Crustacean Biology*, 20, 641-646.
- Gosselin, T., Sainte-Marie, B., & Bernatchez, L. (2003). Patterns of sexual cohabitation and female ejaculate storage in the *American lobster* (*Homarus americanus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 151-160.
- Gosselin, T., Sainte-Marie, B., & Bernatchez, L. (2005). Geographic variation of multiple paternity in the *American lobster*, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology*, 14, 1517-1525.
- Guerao, G., Pastor, E., Martín, J., Andrés, M., Estévez A., Grau, A., Duran, J. & Rotllant, G. (2008). The larval development of *Maja squinado* and *M. brachydactyla* (Decapoda, Brachyura, Majidae) described from plankton collected and laboratory-reared material. *Journal of Natural History*, 42, 2257-2276.
- Guerao, G. & Rotllant, G. (2009). Post-larval development and sexual dimorphism of the spider crab *Maja brachydactyla* (Brachyura, Majidae). *Scientia Marina*, 73, 797-808.
- Hartnoll, R. G. (1969). Mating in the Brachyura. *Crustaceana* 16, 161-181.
- Hartnoll, R. G. (1993). The epibiota of spider crabs. *Scientific Annals of the School of Biology*, 1, 163-176.

- Herbst, J.F.W. (1788). Versuch einer Naturgeschichte der Krabben und Krebse nebst einer systematischen Beschreibung ihrer verschiedenen Arten. G. A. Lange, Berlin and Stralsund, 207-238.
- Hines, A., Wolcott, T. G., Gonzalez-Gurriaran, E., Gonzalez-Escalante, J. L., & Freire, J. (1995). Movement patterns and migrations in crabs: Telemetry of juvenile and adult behaviour in *Callinectes sapidus* and *Maja squinado*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *75*, 27-42.
- Iglesias, J., Sanchez, F. J., Moxica, C., Fuentes, L., Otero, J. J., & Perez, J. L. (2002). Preliminary data on rearing larvae and juveniles of the spider crab *Maja squinado* Herbst, 1788 at the Instituto Español de Oceanografía Vigo Oceanographic Centre (Northwest Spain). *Boletín Del Instituto Español De Oceanografía*, *18*, 25-30.
- Jennions, M.D., & Petrie, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *75*, 21-64.
- Jensen, P.C., Orensanz, J. M. & Armstrong, D. A. (1996). Structure of the female reproductive tract in the Dungeness crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *Biological Bulletin* (Woods Hole) *190*, 336-349
- Jivoff, P. (1997a). Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biological Bulletin*, *193*, 368-380.
- Jivoff, P. (1997b). The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *40*, 175-185.
- Koga, T., Henmi, Y., & Murai, M. (1993). Sperm competition and the assurance of underground copulation in the sand-bubbler crab *Scopimera globosa* (Brachyura: Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology*, *Washington DC*, *13*, 134-137.
- Laverack, M. S. (1988). The diversity of chemoreceptors, pp. 287-317. In, J. Atema, R. R. Fay, A. N. Popper, and W. N. Tavolga (eds.), *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer, New York, NY.
- Le Foll, D. (1993). Biology and exploitation of the western channel spider crab *Maja squinado*, Ifremer Centre de Brest, Plouzane (France).
- McKeown, N. J., & Shaw, P. W. (2008). Single paternity within broods of the brown crab *Cancer pagurus*: A highly fecund species with long-term sperm storage. *Marine Ecology Progress Series*, *368*, 209-215.
- Morán, P., & García-Vázquez, E. (1998). Multiple paternity in atlantic salmon: A way to maintain genetic variability in relict populations. *Journal of Heredity*, *89*, 551-553.
- Nakatsuru, K., & Kramer, D. (1982). Is sperm cheap? Limited male-fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae). *Science*, *216*, 753-755.
- Nelson, K., & Hedgecock, D. (1977). Electrophoretic evidence of multiple paternity in lobster *Homarus americanus* (Milne-Edwards). *American Naturalist*, *111*, 361-365.
- Neumann, V. (1996). Comparative investigations on the systematics and taxonomy of European *Maja* species (Decapoda, Brachyura, Majidae). *Crustaceana*, *69*, 821-852.

- Neumann, V. (1998). A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* 32, 1667–1684
- Ng, P. K. L, Guinot, D. & Davie, P. J. F. (2008). Systema brachyurorum: Part I: An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, Suppl. 17, 286pp.
- Pardieck, R., Orth, R., Diaz, R., & Lipcius, R. (1999). Ontogenetic changes in habitat use by postlarvae and young juveniles of the blue crab. *Marine Ecology Progress Series*, 186, 227-238.
- Pascual, M. S., Zampatti E. A. & Iribarne, O. O. (2001) Population structure and demography of the puelche oyster (*Ostrea puelchana*, d'Orbigny, 1841) grounds in northern Patagonia, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 20, 1003-1010
- Paul, A. J. (1992). A review of size at maturity in male tanner (*Chionoecetes bairdi*) and king (*Paralithodes camtschaticus*) crabs and the methods used to determine maturity. *American Zoologist*, 32, 534-540.
- Pitnick, S., & Markow, T. (1994). Male gametic strategies: sperm size, testes size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila pachea* and its relatives. *American Naturalist*, 143, 785-819.
- Preston, B., Stevenson, I., Pemberton, J., & Wilson, K. (2001). Dominant rams lose out by sperm depletion - A waning success in siring counters a ram's high score in competition for ewes. *Nature*, 409, 681-682.
- Reaney, L. T., Maurer, G., Backwell, P. R. Y., & Linde, C. C. (2012). Paternity analysis of two male mating tactics in the fiddler crab, *Uca mjoebergi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 1017-1024.
- Rodhouse, D. (1984). Experimental fishing for the spider crab, *Maia squinado*: sea and laboratory trials. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 64, 251-259.
- Rodríguez Pena, E. (2013). Extracción de DNA para análisis de paternidad en la centolla *Maja brachydactyla* Balss, 1922. Trabajo Fin de Grado, Departamento de Biología Celular y Molecular y Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Universidad de A Coruña.
- Rondeau, A., & Sainte-Marie, B. (2001). Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 201, 204-217.
- Roy, N. (2003). Incidence de la polyandrie chez le crabe des neiges, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae), MSc Thesis, Université du Québec à Rimouski, Rimouski.
- Rubenstein, D. I. (1989). Sperm competition in the water strider, *Gerris remigis*. *Animal Behaviour*, 38, 631–636.

- Sainte-Marie, B., Sevigny, J. M., & Gauthier, Y. (1997). Laboratory behavior of adolescent and adult males of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae) mated non competitively and competitively with primiparous females. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 239-248.
- Sainte-Marie, B., Urbani, N., Sevigny, J. M., Hazel, F., & Kuhnlein, U. (1999). Multiple choice criteria and the dynamics of assortative mating during the first breeding season of female snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Marine Ecology Progress Series*, 181, 141-153.
- Sainte-Marie, G., Sainte-Marie, B., & Sevigny, J. M. (2000). Ejaculate-storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 78, 1902-1917.
- Sampedro, M., Gonzalez-Gurriaran, E., Freire, J., & Muíño, R. (1999). Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *Journal of Crustacean Biology*, 19, 578-592.
- Sampedro, M. P., González-Gurriarán, E., & Freire, J. (2003). Moults cycle and growth of *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in coastal habitats of Galicia, north-west Spain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83, 995-1005.
- Sato, T., Ashidate, M., Wada, S., & Goshima, S. (2005). Effects of male mating frequency and male size on ejaculate size and reproductive success of female spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 251-262.
- Sato, T., Ashidate, M., Jinbo, T., & Goshima, S. (2006). Variation of sperm allocation with male size and recovery rate of sperm numbers in spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 189-199.
- Schneider, J., & Elgar, M. (1998). Spiders hedge genetic bets. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 218-219.
- Schubart, C. D. (2009). Mitochondrial DNA and decapod phylogenies; the importance of pseudogenes and primer optimization. *Crustacean Issues*, 18, 47-65.
- Simeó, C.G., Andrés, M., Estevez, A. & Rotllant, G. (2013). The effect of male absence on the larval production of the spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922. *Aquaculture Research*. 1-8.
- Sotelo, G., Moran, P., & Posada, D. (2007). Identification and characterization of microsatellite loci in the spiny spider crab *Maja brachydactyla*. *Conservation Genetics*, 8, 245-247.
- Sotelo, G., Moran, P., & Posada, D. (2008). Genetic identification of the northeastern atlantic spiny spider crab as *Maja brachydactyla* balss, 1922. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 76-81.
- Sotelo, G., P. Morán & D. Posada (2009). Molecular phylogeny and biogeographic history of the European *Maja* spider crabs (Decapoda, Majidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 314-319.

- Stevens, B., Donaldson, W., Haaga, J., & Munk, J. (1993). Morphometry and maturity of paired tanner crabs, *Chionoecetes bairdi*, from shallow-water and deep-water environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 1504-1516.
- Stockley, P., Searle, J., Macdonald, D., & Jones, C. (1993). Female multiple mating-behavior in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 254, 173-179.
- Streiff, R., Mira, S., Castro, M., & Cancela, M. (2004). Multiple paternity in norway lobster (*Nephrops norvegicus* L.) assessed with microsatellite markers. *Marine Biotechnology*, 6, 60-66.
- Sugg, D., & Chesser, R. (1994). Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics*, 137, 1147-1155.
- Toonen, R. J. (2004). Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 270, 259-263.
- Udekem d'Acoz, C. (1999). Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. *Patrimoines naturels (M.N.H.N./S.P.N.)*, 40, 1-383.
- Urbani, N., Sainte-Marie, B., Sevigny, J. M., Zadworny, D., & Kuhnlein, U. (1998). Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55, 1104-1113.
- Verisimo, P., Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., Freire, J., Muíño, R., & Fernández, L. (2011). Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. *ICES Journal of Marine Science*, 68, 472-478.
- Waage, J. (1979). Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. *Science*, 203, 916-918.
- Walker, D., Porter, B., & Avise, J. (2002). Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Molecular Ecology*, 11, 2115-2122.
- Wang, H., Cui, Z., Wu, D., Guo, E., Liu, Y., Wang, C. & Su X. (2011). Application of microsatellite DNA parentage markers in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture International*, 20, 649-656.
- Wicksten, M. K. (1993). A review and a model of decorating behavior in spider crabs (Decapoda, Brachyura, Majidae). *Crustaceana*, 314-325.
- Woods, C. M. (1995). Masking in the spider crab *Trichoplatus huttoni* (Brachyura; Majidae). *New Zealand Natural Sciences*, 22, 75-80.
- Yue, G. H., & Chang, A. (2010). Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *PloS one*, 5, e12721.
- Yue, T. L., G. H., Li, J., Wang, C., Xia, J., Wang, G., & Feng, J. (2010). High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *International Journal of Biological Sciences*, 6, 107-115.

APÉNDICE 1

Tabla A1. Valores de concentración de ADN en μg ADN/g tejido obtenidos por espectrofotometría para los diferentes tejidos de las hembras analizadas.

Hembra	Tipo de tejido	μg ADN/g tejido
G13	Sedas pleópodo	477.50
G13	Sedas pereiópodo	156.36
G13	Músculo	14.24
G13	Endito	811.46
M17	Sedas pleópodo	252.90
M17	Sedas pereiópodo	50.60
M17	Músculo	74.72
M17	Endito	402.67
M19	Sedas pleópodo	726.50
M19	Sedas pereiópodo	168.38
M19	Músculo	625.66
M19	Endito	2359.82
M21	Sedas pleópodo	607.40
M21	Sedas pereiópodo	158.50
M21	Músculo	10.36
M21	Endito	229.80
M27	Sedas pleópodo	329.20
M27	Sedas pereiópodo	23.75
M27	Músculo	15.52
M27	Endito	330.60
M6	Sedas pleópodo	250.70
M6	Sedas pereiópodo	69.65
M6	Músculo	4.38
M6	Endito	141.69
P2	Sedas pleópodo	165.40
P2	Sedas pereiópodo	36.25
P2	Músculo	731.94
P2	Endito	602.75
P6	Sedas pleópodo	527.60
P6	Sedas pereiópodo	48.15
P6	Músculo	6.24
P6	Endito	365.00
G14	Sedas pleópodo	684.31
G14	Sedas pereiópodo	69.15
G14	Músculo	85.77
G14	Endito	73.85

APÉNDICE 2

Figura A2. Alineamientos de las secuencias del gen mitocondrial 16S de las 7 hembras analizadas y sus huevos. En este tipo de representación, los guiones indican *gaps* y los puntos posiciones comunes a la primera secuencia (M2_Pleop). Las diferencias con respecto a M2_Pleop aparecen marcadas con la letra de la base correspondiente (detectadas diferencias en las posiciones 365 y 580).

```

          *           20           *           40           *           60
M2_Pleop : GTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTTTAATTG : 60
M2_1     : ..... : 60
M2_2     : ..... : 60
M3_Pleop : ..... : 60
M3_1     : ..... : 60
M3_2     : ..... : 60
M26_Pleop : ..... : 60
M26_1    : ..... : 60
M26_2    : ..... : 60
M26_3    : ..... : 60
M26_4    : ..... : 60
M26_5    : ..... : 60
M26_6    : ..... : 60
M26_7    : ..... : 60
P6_Pleop : ..... : 60
P6_1     : ..... : 60
P6_2     : ..... : 60
P7_Pleop : ..... : 60
P7_1     : ..... : 60
P7_2     : ..... : 60
P7_3     : ..... : 60
P7_4     : ..... : 60
P7_5     : ..... : 60
P7_6     : ..... : 60
P7_7     : ..... : 60
P8_Pleop : ..... : 60
P8_1     : ..... : 60
P8_2     : ..... : 60
G6_Pleop : ----- : -
G6_1     : ..... : 60
G6_2     : ..... : 60

```


	*	80	*	100	*	120	
M2_Pleop	:	AGAACTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTAAATTTA	:		:	120	
M2_1	:	:		:	120	
M2_2	:	:		:	120	
M3_Pleop	:	:		:	120	
M3_1	:	:		:	120	
M3_2	:	:		:	120	
M26_Pleop	:	:		:	120	
M26_1	:	:		:	120	
M26_2	:	:		:	120	
M26_3	:	:		:	120	
M26_4	:	:		:	120	
M26_5	:	:		:	120	
M26_6	:	:		:	120	
M26_7	:	:		:	120	
P6_Pleop	:	:		:	120	
P6_1	:	:		:	120	
P6_2	:	:		:	120	
P7_Pleop	:	:		:	120	
P7_1	:	:		:	120	
P7_2	:	:		:	120	
P7_3	:	:		:	120	
P7_4	:	:		:	120	
P7_5	:	:		:	120	
P7_6	:	:		:	120	
P7_7	:	:		:	120	
P8_Pleop	:	:		:	120	
P8_1	:	:		:	120	
P8_2	:	:		:	120	
G6_Pleop	:	-----	:		:	41	
G6_1	:	:		:	120	
G6_2	:	:		:	120	

	*	140	*	160	*	180	
M2_Pleop	:	ACTTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTTAT	:		:	180	
M2_1	:	:		:	180	
M2_2	:	:		:	180	
M3_Pleop	:	:		:	180	
M3_1	:	:		:	180	
M3_2	:	:		:	180	
M26_Pleop	:	:		:	180	
M26_1	:	:		:	180	
M26_2	:	:		:	180	
M26_3	:	:		:	180	
M26_4	:	:		:	180	
M26_5	:	:		:	180	
M26_6	:	:		:	180	
M26_7	:	:		:	180	
P6_Pleop	:	:		:	180	
P6_1	:	:		:	180	
P6_2	:	:		:	180	
P7_Pleop	:	:		:	180	
P7_1	:	:		:	180	
P7_2	:	:		:	180	
P7_3	:	:		:	180	
P7_4	:	:		:	180	
P7_5	:	:		:	180	
P7_6	:	:		:	180	
P7_7	:	:		:	180	
P8_Pleop	:	:		:	180	
P8_1	:	:		:	180	
P8_2	:	:		:	180	
G6_Pleop	:	:		:	101	
G6_1	:	:		:	180	
G6_2	:	:		:	180	

	*	200	*	220	*	240		
M2_Pleop	:	AAGTAAGTAGAAATTTATTGAATTA	AAAAATTGAAA	ACTATATTTCTATTGTCTTATTGTG	:	240		
M2_1	:					240	
M2_2	:					240	
M3_Pleop	:					240	
M3_1	:					240	
M3_2	:					240	
M26_Pleop	:					240	
M26_1	:					240	
M26_2	:					240	
M26_3	:					240	
M26_4	:					240	
M26_5	:					240	
M26_6	:					240	
M26_7	:					240	
P6_Pleop	:					240	
P6_1	:					240	
P6_2	:					240	
P7_Pleop	:					240	
P7_1	:					240	
P7_2	:					240	
P7_3	:					240	
P7_4	:					240	
P7_5	:					240	
P7_6	:					240	
P7_7	:					240	
P8_Pleop	:					240	
P8_1	:					240	
P8_2	:					240	
G6_Pleop	:					161	
G6_1	:					240	
G6_2	:					240	

	*	260	*	280	*	300		
M2_Pleop	:	TTGGGGCGACATAAAATATAAATTATTTAACTGTTT	GAGAATAAGACATAAAATTTATGAAT	:	300			
M2_1	:					300	
M2_2	:					300	
M3_Pleop	:					300	
M3_1	:					300	
M3_2	:					300	
M26_Pleop	:					300	
M26_1	:					300	
M26_2	:					300	
M26_3	:					300	
M26_4	:					300	
M26_5	:					300	
M26_6	:					300	
M26_7	:					300	
P6_Pleop	:					300	
P6_1	:					300	
P6_2	:					300	
P7_Pleop	:					300	
P7_1	:					300	
P7_2	:					300	
P7_3	:					300	
P7_4	:					300	
P7_5	:					300	
P7_6	:					300	
P7_7	:					300	
P8_Pleop	:					300	
P8_1	:					300	
P8_2	:					300	
G6_Pleop	:					221	
G6_1	:					300	
G6_2	:					300	

	*	320	*	340	*	360	
M2_Pleop	:	TAAAATTAATTGATCCTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTT	:		:		360
M2_1	:	:		:		360
M2_2	:	:		:		360
M3_Pleop	:	:		:		360
M3_1	:	:		:		360
M3_2	:	:		:		360
M26_Pleop	:	:		:		360
M26_1	:	:		:		360
M26_2	:	:		:		360
M26_3	:	:		:		360
M26_4	:	:		:		360
M26_5	:	:		:		360
M26_6	:	:		:		360
M26_7	:	:		:		360
P6_Pleop	:	:		:		360
P6_1	:	:		:		360
P6_2	:	:		:		360
P7_Pleop	:	:		:		360
P7_1	:	:		:		360
P7_2	:	:		:		360
P7_3	:	:		:		360
P7_4	:	:		:		360
P7_5	:	:		:		360
P7_6	:	:		:		360
P7_7	:	:		:		360
P8_Pleop	:	:		:		360
P8_1	:	:		:		360
P8_2	:	:		:		360
G6_Pleop	:	:		:		281
G6_1	:	:		:		360
G6_2	:	:		:		360

	*	380	*	400	*	420	
M2_Pleop	:	ATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAACTA	:		:		420
M2_1	:	:		:		420
M2_2	:	:		:		420
M3_Pleop	:	:		:		420
M3_1	:	:		:		420
M3_2	:	:		:		420
M26_Pleop	:	...T.....	:		:		420
M26_1	:	:		:		420
M26_2	:	:		:		420
M26_3	:	:		:		420
M26_4	:	:		:		420
M26_5	:	:		:		420
M26_6	:	:		:		420
M26_7	:	:		:		420
P6_Pleop	:	...T.....	:		:		420
P6_1	:	...T.....	:		:		420
P6_2	:	...T.....	:		:		420
P7_Pleop	:	:		:		420
P7_1	:	:		:		420
P7_2	:	:		:		420
P7_3	:	:		:		420
P7_4	:	:		:		420
P7_5	:	:		:		420
P7_6	:	:		:		420
P7_7	:	:		:		420
P8_Pleop	:	:		:		420
P8_1	:	:		:		420
P8_2	:	:		:		420
G6_Pleop	:	:		:		341
G6_1	:	:		:		420
G6_2	:	:		:		420

```

                *           440           *           460           *           480
M2_Pleop : TCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTACATGATT : 480
M2_1      : ..... : 480
M2_2      : ..... : 480
M3_Pleop  : ..... : 480
M3_1      : ..... : 480
M3_2      : ..... : 480
M26_Pleop : ..... : 480
M26_1     : ..... : 480
M26_2     : ..... : 480
M26_3     : ..... : 480
M26_4     : ..... : 480
M26_5     : ..... : 480
M26_6     : ..... : 480
M26_7     : ..... : 480
P6_Pleop  : ..... : 480
P6_1     : ..... : 480
P6_2     : ..... : 480
P7_Pleop  : ..... : 480
P7_1     : ..... : 480
P7_2     : ..... : 480
P7_3     : ..... : 480
P7_4     : ..... : 480
P7_5     : ..... : 480
P7_6     : ..... : 480
P7_7     : ..... : 480
P8_Pleop  : ..... : 480
P8_1     : ..... : 480
P8_2     : ..... : 480
G6_Pleop  : ..... : 401
G6_1     : ..... : 480
G6_2     : ..... : 480
    
```

```

                *           500           *           520           *           540
M2_Pleop : TGAGTTCAGACCGGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAATTGCTTT : 540
M2_1     : ..... : 540
M2_2     : ..... : 540
M3_Pleop : ..... : 540
M3_1     : ..... : 540
M3_2     : ..... : 540
M26_Pleop : ..... : 540
M26_1    : ..... : 540
M26_2    : ..... : 540
M26_3    : ..... : 540
M26_4    : ..... : 540
M26_5    : ..... : 540
M26_6    : ..... : 540
M26_7    : ..... : 540
P6_Pleop : ..... : 540
P6_1     : ..... : 540
P6_2     : ..... : 540
P7_Pleop : ..... : 540
P7_1     : ..... : 540
P7_2     : ..... : 540
P7_3     : ..... : 540
P7_4     : ..... : 540
P7_5     : ..... : 540
P7_6     : ..... : 540
P7_7     : ..... : 540
P8_Pleop : ..... : 540
P8_1     : ..... : 540
P8_2     : ..... : 540
G6_Pleop : ..... : 461
G6_1     : ..... : 540
G6_2     : ..... : 540
    
```

	*	560	*	580	
M2_Pleop	:	AGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAATATTTTGTGATTACCAG	:		585
M2_1	:	:		585
M2_2	:	:		585
M3_Pleop	:	:		585
M3_1	:	:		585
M3_2	:	:		585
M26_Pleop	:	:	A.....	585
M26_1	:	:		585
M26_2	:	:		585
M26_3	:	:		585
M26_4	:	:		585
M26_5	:	:		585
M26_6	:	:		585
M26_7	:	:		585
P6_Pleop	:	:	A.....	585
P6_1	:	:	A.....	585
P6_2	:	:	A.....	585
P7_Pleop	:	:		585
P7_1	:	:	A.....	585
P7_2	:	:	A.....	585
P7_3	:	:		585
P7_4	:	:		585
P7_5	:	:	A.....	585
P7_6	:	:	A.....	585
P7_7	:	:	A.....	585
P8_Pleop	:	:		585
P8_1	:	:		585
P8_2	:	:		585
G6_Pleop	:	:		506
G6_1	:	:		585
G6_2	:	:		585