

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Elaboración del proyecto: Empleo de marcadores moleculares como método de detección de *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) en los estómagos de depredadores y su aplicación en la gestión pesquera de la especie

Elaboración do proxecto: Emprego de marcadores moleculares como método de detección de *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) nos estómagos de depredadores e a súa aplicación na xestión pesqueira da especie

Grant development: Use of molecular markers as a detection method of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) in the stomachs of predators and their application in the fisheries management of the species



Leopoldo Máximo Álvarez Bianchín

Diciembre, 2021

Andrés Martínez Lage Profesor Titular de la Universidad del Departamento de Biología expone que el Trabajo de Fin de Grado realizado por Leopoldo Máximo Álvarez Bianchín con título " Elaboración del proyecto: Empleo de marcadores moleculares como método de detección de *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) en los estómagos de depredadores y su aplicación en la gestión pesquera de la especie" ha sido realizado bajo mi dirección y considero que es apto de ser enviado al tribunal calificador.

En A Coruña a 7 de Diciembre de 2021

ÍNDICE

Resumen

Resumo

Summary

1. Contenido del proyecto: estado del tema de investigación propuesto	9
○ 1.1. Antecedentes	9
○ 1.2. Situación actual	10
○ 1.3. Características de la especie estudiada	10
○ 1.4 .Características de las especies depredadoras	12
2. Contenido del proyecto: objetivos del proyecto	17
3. Contenido del proyecto: interés para el avance del conocimiento y de la sociedad	18
4. Contenido del proyecto: plan de difusión y explotación de resultados	18
5. Viabilidad del proyecto: metodología	19
○ 5.1. Obtención de ejemplares.....	19
○ 5.2. Toma de muestras y creación de los estómagos artificiales	19
○ 5.3. Extracción de ADN de los estómagos artificiales.....	21
○ 5.4. Diseño de <i>primers</i>	23
○ 5.5. Amplificación del ADN extraído de los estómagos artificiales.....	23
○ 5.6. Obtención de resultados	24
6. Viabilidad del proyecto: plan de trabajo	25
7. Estimación presupuestaria	26
8. Implicaciones éticas y de bioseguridad	26
9. Conclusiones o hitos que se pretende alcanzar	27
Bibliografía	28

RESUMEN

Octopus vulgaris es una especie abundante en Galicia y actualmente es considerado como una especie de gran importancia pesquera a nivel mundial. Sin embargo, en los últimos años las capturas de pulpos en el Mediterráneo y en el Atlántico nororiental se están viendo reducidas y por ello su demanda comercial y valor económico están en alza. Asimismo, comprender las relaciones tróficas entre depredadores y presas es vital para conocer que procesos están detrás de los cambios en ambas poblaciones. La finalidad de este estudio es el empleo de la PCR para evaluar la presencia de este cefalópodo en los estómagos de posibles depredadores. Para ello, se realizarán PCRs con *primers* específicos de *O. vulgaris* en DNAs obtenidos de los estómagos de estos posibles depredadores. Este estudio facilitará conocer los depredadores potenciales de esta especie y tendrá, por lo tanto, una aplicación en modelos de gestión pesquera.

PALABRAS CLAVE: PCR, marcador molecular, pulpo, estómago, depredador, COI, 16S

RESUMO

Octopus vulgaris é unha especie abundante en Galicia e actualmente é considerado como unha especie de grande importancia pesqueira a nivel mundial. Con todo, nos últimos anos as capturas de polbos no Mediterráneo e no Atlántico nororiental están a verse reducidas e por iso a súa demanda comercial e valor económico están en alza. Así mesmo, comprender as relacións tróficas entre depredadores e presas é vital para coñecer que procesos están detrás dos cambios en ambas as poboacións. A finalidade deste estudo é o emprego da PCR para avaliar a presenza deste cefalópodo nos estómagos destes posibles depredadores. Para iso, realizaranse PCRs con *primers* específicos de *O. vulgaris* en DNAs obtidos dos estómagos destes posibles depredadores. Este estudo facilitará coñecer os depredadores potenciais desta especie e terá, polo tanto, unha aplicación en modelos de xestión pesqueira.

PALABRAS CRAVE: PCR, marcador molecular, pulpo, estómago, depredador, COI, 16S

SUMMARY

Octopus vulgaris is an abundant species in Galicia and is currently considered a species of great fishing importance worldwide. However, in recent years the catches of octopus in the Mediterranean and the Northeast Atlantic have been reduced and therefore their commercial demand and economic value are on the rise. Likewise, understanding the trophic relationships between predators and prey is vital to know what processes are behind the changes in both populations. The purpose of this study is the use of PCR to evaluate the presence of this cephalopod in the stomachs of possible predators. To do this, PCRs with specific primers of *O. vulgaris* will be carried out on DNAs obtained from the stomachs of these possible predators. This study will facilitate knowing the potential predators of this species and will therefore have an application in fisheries management models.

KEY WORDS: PCR, molecular marker, octopus, stomach, predator, COI, 16S

1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN PROPUESTO

1.1. Antecedentes

Siglos de impacto antropogénico sobre los ecosistemas marinos y las especies que los conforman, al igual que las actividades humanas como la sobrepesca, demuestran lo perjudicial que puede llegar a ser la acción humana para la conservación de la biodiversidad marina. Un claro ejemplo de ello es el caso del bacalao de profundidad (*Dissostichus eleginoides*; Smitt, 1898), en el que podemos ver un escenario desfavorable de reducción mostrando disminuciones en la biomasa total y desove que alcanzan unos valores del 21% y 24% respectivamente, mientras que la biomasa media vulnerable industrial bordea un porcentaje de reducción del 18% (Quiroz Espinosa et al., 2013). Otro ejemplo sería la disminución del tamaño poblacional de numerosas especies de cetáceos ocasionada por el auge de la industria ballenera, siendo una de las especies más afectadas la yubarta (*Megaptera novaeangliae*; Borowski, 1781), que pasó de presentar una población mundial de unos 150.000 individuos al inicio de dicha actividad a una población de unos 25.000 ejemplares a comienzos de este siglo, esto es el 17% de la población original (Quiroga, 2002). Un ejemplo más reciente es el de la marsopa común del Atlántico Norte (*Phocoena phocoena*; Linnaeus, 1758). La mortalidad por captura accidental en artes de pesca representa una gran amenaza para los cetáceos en todo el mundo en general y para la marsopa en las aguas gallegas en particular, por ser la pesca una actividad constante en el espacio y en el tiempo, y con tendencia a ser una presión más intensiva. La fuerte sobrepesca ejercida en las cercanías de las islas atlánticas de Galicia actúa negativamente sobre esta especie, dado que es uno de los hábitats más frecuentados por ella. En lo relativo a la proporción de ejemplares con indicios de captura con respeto a los animales examinados varados, la marsopa presenta un 20,9%. El impacto de la captura accidental está por arriba del 2% de su población por lo que está bajo una situación de amenaza (López et al., 2008; López & Cedeira, 2011). Asimismo, el estado en el que se encuentran los océanos a nivel global ha provocado que desde multitud de instituciones y organismos internacionales así como desde el ámbito científico se reclame un cambio en la gestión de las pesquerías que priorice al ecosistema en su conjunto frente a unas determinadas especies de importancia pesquera (Farmery et al., 2014). Conseguir alcanzar la sustentabilidad de los recursos pesqueros depende de estrategias de gestión apropiadas (Barbieri et al., 2014). Por ello, la aplicación de tales medidas requiere de un conocimiento científico adecuado, tanto sobre la dinámica de las pesquerías, como de la biología y ecología de las especies, sin importar que éstas sean especies objetivo o especies accesorias. Por lo tanto, conocer el papel que desempeñaba cada especie en el ecosistema era imprescindible para poder desarrollar nuevos modelos de gestión fundamentados en las relaciones ecológicas existentes entre las diversas especies marinas. Dichos modelos pasaron a convertirse en la mejor alternativa a los modelos tradicionales de gestión que se basaban simplemente en el estudio de unas pocas especies (Curtin & Prellezo, 2010).

1.2. Situación actual

La sobrepesca supone una grave alteración de los equilibrios ecológicos entre presas y depredadores. Según la FAO las poblaciones de peces que se encuentran dentro de niveles biológicamente sostenibles han mostrado una tendencia a la baja del 90% desde los últimos 50 años, y el porcentaje de las poblaciones explotadas a niveles biológicamente insostenibles se incrementó hasta el 33,1% en el 2015 (González, 2020). La sobreexplotación pesquera ha afectado sobre todo a las grandes especies depredadoras pelágicas como tiburones, atunes y peces espada, y en consecuencia, se ha producido un aumento desproporcionado de las poblaciones de sus presas. Dichas presas, ante la falta de suficientes depredadores, disminuyen rápidamente sus fuentes de alimento ocasionando así una mayor alteración de este equilibrio. Como consecuencia del declive de las especies depredadoras se ha ido produciendo a su vez un descenso en el nivel trófico de las especies capturadas. A este fenómeno se le conoce con el nombre de *fishing down*. Si bien es cierto que cada vez existe una mayor concienciación acerca de la problemática que supone este declive de las diferentes especies de interés comercial; la explotación de las comunidades marinas y sus efectos sobre los ecosistemas todavía siguen constituyendo un problema que no presenta una solución clara y sobre el cual se están poniendo muchos esfuerzos para intentar revertir dicha situación (Naranjo, 2009). Pero pese a todos estos esfuerzos, el *fishing down* sigue teniendo lugar. Por lo tanto, alcanzar la sostenibilidad de las pesquerías requiere transformar los procesos de gestión de los recursos. Esto conlleva a adoptar varias medidas, entre las que cabrían destacar: la reducción drástica de la presión por obtener mayores rendimientos; el respeto escrupuloso de las medidas de gestión ya adoptadas; introducir el ecosistema y a la especie humana como parte del mismo como base para la gestión y revisar los derechos de pesca y el acceso a los caladeros (Pérez, 2016).

1.3. Características de la especie estudiada

El pulpo común u *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) es un molusco cefalópodo solitario y muy territorial. De gran envergadura (de 1,2 a 1,3 m), los adultos pueden llegar a pesar hasta 10 kg, pero lo más común es que su peso se sitúe en torno a los 2-3 kg.

Se trata de una especie bentónica que habita en multitud de hábitats, que abarcan desde la misma línea de costa, en la zona intermareal, hasta el borde de la plataforma continental (200 m aproximadamente), aunque su rango de distribución más habitual oscila entre las zonas intermareales y los 20 metros de profundidad (Roper & Sweeney, 1981). *O. vulgaris* es asimismo considerado como una especie cosmopolita. Además se sabe que esta especie realiza migraciones estacionales, observándose desplazamientos hacia la costa durante la época reproductiva, así como hacia zonas más profundas donde llevan a cabo su desarrollo y maduración (Carvajal et al., 2003).

En lo referente a su alimentación, se trata de una especie carnívora, siendo un depredador activo y voraz ya desde el mismo momento de su eclosión. Se alimentan de presas vivas como peces y diversos invertebrados marinos. Además, como en otras especies de pulpos, *O. vulgaris* practica el canibalismo (Naranjo, 2009). Un pulpo suele atraer a sus víctimas moviendo rápidamente la punta de un brazo como si fuera un gusano. También puede aproximarse deslizándose y precipitarse sobre el animal, llevando a la presa hacia su boca con la ayuda de sus tentáculos y abdomen. Además se sirve de un veneno paralizante, la denominada cefalotoxina, con el que logra inmovilizarla.

Dicho veneno no es inyectado en el cuerpo de la presa, sino que penetra a través de los orificios naturales del animal (Guerra, 1978).

En cuanto a su anatomía, presentan ocho brazos robustos en la base y con dos filas de ventosas; los laterales son más largos y los dos primeros tentáculos son algo más cortos que el resto. El tercer brazo derecho de los machos, el hectocótilo, es un brazo modificado para la reproducción que tiene como función la transferencia de los paquetes de esperma (es una especie que presenta fecundación interna) (Naranjo, 2009). Los pulpos son organismos dioicos que exhiben un claro dimorfismo sexual. Aparte del ya citado hectocótilo de los machos, otras diferencias morfológicas notables entre machos y hembras son la diferencia de tamaño, ya que en esta especie las hembras son generalmente mayores que los machos, y el número de ventosas, ya que los machos poseen unas pocas ventosas de tamaño destacado en los segundos y terceros pares de brazos, mientras que en las hembras las ventosas son de tamaño más uniforme a lo largo de todo el brazo (Fernandes, 2009).

En lo concerniente a la reproducción, se trata de una especie semélpara (único episodio reproductivo antes de su muerte) cuya puesta ocurre al final del ciclo de vida del animal, que dura en torno a 9 meses - 2 años. Presentan además fecundación interna. Otra característica de su reproducción es su elevada fecundidad, dado que produce entre 100.000 y 500.000 huevos por hembra, algo que va a depender del tamaño que ésta posea. Los huevos son pequeños ($\approx 2,5 \times 1$ mm) y están dispuestos en racimos que pueden contener varios centenares de crías. Las hembras los adhieren a oquedades de las rocas generalmente y protegen y cuidan de la puesta hasta el momento de su eclosión. Los recién nacidos miden unos 2 mm de longitud y se encuentran en la fase planctónica durante unos 30 - 40 días en función de la temperatura del agua. Transcurrido dicho tiempo alcanzan un tamaño comprendido entre los 6 y los 7 mm, y pasan a la fase bentónica.

La piel de *O. vulgaris* muestra una notable capacidad para cambiar de color, a veces instantáneamente (Naranjo, 2009). Este cambio de color es debido a la presencia de unas células especializadas denominadas cromatóforos, las cuales poseen diversos pigmentos. Dichos cromatóforos se encuentran superpuestos en 4 o 5 capas y sus pigmentos pueden ser amarillos, anaranjados o rojos, aunque algunas especies pueden presentar también pigmentos pardos y negros. En el caso de *O. vulgaris* los cinco pigmentos están presentes (Messenger, 2001). La disposición de las células pigmentarias parece ligada a otras células subyacentes, que pueden provocar distintos efectos cromáticos según su estado de contracción. Estas células son los iridóforos y los leucóforos, cuyo tamaño no varía. El pulpo sólo posee 65 cromatóforos en estado larvario, pero a la edad de un año ya cuenta con 1 o 2 millones.

El sistema nervioso y los órganos de los sentidos de los pulpos están concentrados en la región cefálica. El pulpo se caracteriza por una visión muy desarrollada, ya que al contrario de lo que ocurre en muchos invertebrados, los ojos tienen la misma estructura básica que los mamíferos: córnea, iris, cristalino, retina (aunque algo menos compleja) y dos párpados. La visión se adapta fácilmente a los cambios de luminosidad, pero el pulpo no distingue bien los colores. En cambio, sí posee percepción de la profundidad.

En cuanto a su comportamiento, los pulpos son animales de fondo, por el que se desplazan con ayuda de sus tentáculos, pero en caso de peligro pueden desplazarse

mediante la expulsión de un chorro de agua a través de la cavidad respiratoria, la cual la pueden orientar en diversas direcciones (Fischer, 1995).

1.4. Características de las especies depredadoras

El material empleado para la realización del presente trabajo provendrá en parte de varias especies piscícolas depredadoras que son, en su mayoría, de gran interés comercial en nuestra comunidad, lo cual facilitará enormemente la obtención de los estómagos necesarios para la toma de muestras. En el caso de los mamíferos marinos, pese a las grandes limitaciones en la obtención de muestras estomacales por escasez de especímenes, se tomarán aquellas especies que por su abundancia en el área de estudio o por su condición de depredadores teutófagos (se alimentan de calamares y otros cefalópodos) puedan resultar útiles a la hora de determinar la presencia de *O. vulgaris*. Dicho esto, las especies utilizadas en este proyecto serán: la pintarroja y la raya rubia (elasmobranquios), la lubina, el congrio, el rodaballo y el sargo (teleósteos) y el delfín mular y el calderón gris (cetáceos odontocetos).

Pintarroja

La pintarroja o *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) es un pequeño tiburón alargado y delgado que puede llegar a medir unos 70 cm de longitud en estado adulto. Es la especie más abundante de la familia Scyliorhinidae en las aguas costeras del Atlántico nororiental, distribuyéndose desde Senegal hasta las Islas Británicas y Noruega (Ebert & Stehmann, 2013). Puede encontrarse además en el Mar Mediterráneo y en el Mar Adriático (Rodríguez-Cabello et al., 2004). A lo largo de su área de distribución, los individuos de esta especie pueden encontrarse en gran variedad de fondos, desde bancos de arena hasta fondos rocosos. Son más frecuentes en la región costera y hasta los 100 m de profundidad, y raramente hasta los 400 m (Compagno et al., 2005). Asimismo, se ha constatado que los machos adultos prefieren aguas más cálidas y poco profundas próximas a la costa, las hembras sin embargo prefieren aguas con mayor salinidad (más alejadas de la costa) y por el contrario los juveniles se distribuyen en zonas intermedias. Esta segregación sexual podría relacionarse con una estrategia para evitar el canibalismo durante la época de cría (Capapé et al., 2014).

Se considera que la pintarroja es una especie oportunista, que se alimenta de una gran variedad de fauna bentónica. Aun así, los decápodos y los pequeños peces constituyen los elementos más importantes de su dieta (Rodríguez-Cabello et al., 2007).

Se trata de una especie ovípara con fecundación interna. Su época de cría tiene lugar durante todo el año. Las hembras liberan sus huevos en forma de cápsula por parejas en aguas superficiales principalmente, y estos huevos se fijan sobre algas y otros sustratos. Se estima que durante un período de cría pueden producir hasta 240 cápsulas.

Raya rubia

La raya rubia o *Raja brachyura* (Lafont, 1873) es una raya perteneciente a la familia Rajidae que presenta un tamaño que ronda los 120 cm de longitud en estado adulto. Se trata de una especie bentónica que muestra una clara preferencia por los fondos arenosos de la plataforma continental superior (Serena, 2005). Se distribuye por el Atlántico nororiental desde Noruega hasta Marruecos, siendo menos común en el Mediterráneo.

Se alimenta de todo tipo de animales bentónicos, principalmente de crustáceos (anfípodos, decápodos y braquiuros) y poliquetos, y en menor proporción de moluscos, entre los que se incluyen los cefalópodos, y peces pequeños.

Son animales ovíparos con puestas de hasta 90 huevos por ciclo reproductivo. Su período de cría va desde Febrero hasta Agosto. Los huevos son cápsulas oblongas con cuernos puntiagudos rígidos. Éstos son depositados normalmente en fondos arenosos o fangosos.

Lubina

La lubina o *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) es un teleósteo marino perteneciente a la familia Moronidae que puede alcanzar tamaños de hasta 100 cm en su estado adulto. Se distribuye principalmente por el mar Mediterráneo y las costas del océano Atlántico, desde el norte de Noruega hasta Marruecos. Vive en un amplio rango de ambientes gracias a su capacidad eurihalina (3-38‰) y euriterma (2-32 °C) (Pickett & Pawson, 1994; Carrillo et al., 1995). La lubina habita tanto en costas rocosas como en estuarios y puede encontrarse también en puertos y dársenas. Los ejemplares jóvenes viven en bancos, volviéndose solitarias cuando alcanzan el estado adulto. Normalmente pueden encontrarse a profundidades que van desde los 0 a los 15 metros.

Se trata de un depredador voraz con una dieta muy diversa que se compone de crustáceos, poliquetos, pequeños peces, erizos de mar, moluscos y otros animales marinos.

La lubina es una especie gonocorista, con sexos separados, pero carece de caracteres sexuales externos para identificarlos. No obstante, las hembras alcanzan mayor tamaño que los machos. Se reproduce en invierno (Diciembre-Marzo) y la mayoría de los machos alcanzan la primera maduración sexual al segundo año de vida mientras que las hembras maduran un año después. En esta especie la época de puesta transcurre entre Enero y Marzo. Las hembras de lubina presentan un desarrollo ovárico de tipo sincrónico por grupos, de manera que producen 3-4 puestas consecutivas durante el periodo de puesta (1-2 meses) (Carrillo et al., 1995). El desarrollo del embrión dura en torno a unos 4 días a 15 °C y el desarrollo larvario dura unos 40 días a 19 °C. Los juveniles viven en la costa y en estuarios donde crecen hasta alcanzar la edad adulta.

Congrio

El congrio común o *Conger conger* (Linnaeus, 1758) es un pez anguiliforme perteneciente a la familia Congridae que puede alcanzar envergaduras de hasta 300 cm una vez llegado al estado adulto. Tiene una amplia distribución en el Atlántico nororiental. Esta distribución va desde Noruega hasta Senegal, incluyendo también las Islas Canarias, Azores y Madeira, así como el Mediterráneo. Los congrios son peces bentónicos que habitan en la plataforma continental sobre fondos rocosos y arenosos, desde la costa hasta profundidades de 500 m (Bauchot, 1987).

Son peces carnívoros que se alimentan principalmente de noche y su dieta incluye desde peces pelágicos hasta crustáceos decápodos y cefalópodos. Aunque no se encontraron variaciones estacionales significativas en su patrón alimentario, la dieta de *C. conger* se ve modificada a medida que aumenta la profundidad y probablemente esto se deba a las diferencias de disponibilidad de presas (Levy et al., 1988). Cuando caza arranca trozos de carne de sus presas con unos movimientos giratorios que realiza con su cuerpo.

La reproducción tiene lugar una vez el congrio ha alcanzado un determinado tamaño. Los machos a los 5 años con una medida de 57 cm y las hembras al medir 2 m pasados 15 años. En ese momento la hembra tiene una masa gonadal que puede superar la mitad de su peso. Realizan migraciones horizontales y verticales más o menos largas dónde encuentran a los machos (Sullivan et al., 2003). Sólo se reproducen una vez en su vida, ya que después se descalcifican y mueren. Su puesta está constituida de unos 3 a 8 millones de huevos (Lythgoe & Lythgoe, 1971; Wheeler, 1985) y su desarrollo desde la eclosión hasta su fase juvenil pasa por diversas fases larvarias de diferentes tamaños y formas. El juvenil llegará a los 8 cm y continuará creciendo hasta adquirir el estadio adulto.

Rodaballo

El rodaballo o *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758) pertenece al grupo de los teleósteos y se clasifica dentro del orden Pleuronectiformes. Dentro de los Pleuronectiformes, pertenece a la familia Scophthalmidae (Gibson, 2005; Pardo et al., 2005). Los rodaballos adultos presentan tamaños comprendidos entre los 50 cm hasta los 100 cm de longitud. El rodaballo es una especie marina bentónica que vive en fondos arenosos, rocosos o mixtos, en un rango de profundidad de 20 a 100 m, siendo los individuos más jóvenes los que suelen habitar las áreas menos profundas. Presenta una amplia distribución geográfica a lo largo de las costas del Atlántico nororiental: desde Marruecos recorre toda la costa europea hasta el Círculo Polar Ártico y el Mar Báltico; en el área mediterránea se encuentra tanto en las costas norafricanas como en las del sur europeo (Blanquer et al., 1992).

Son animales carnívoros, los ejemplares jóvenes se alimentan de bivalvos y crustáceos, mientras que el alimento principal de los individuos adultos son otros peces del fondo y los cefalópodos (González, 2008).

No presentan dimorfismo sexual, pero los machos son de menor tamaño y crecen más lentamente. Alcanzan la madurez sexual entre el tercer y quinto año de vida, dependiendo de la temperatura del agua. El desove ocurre entre Febrero y Abril en el área mediterránea y entre Mayo y Agosto en el Atlántico. Concretamente en Galicia, la freza

tiene lugar en los meses de Mayo, Junio y Julio, respondiendo a un fotoperíodo creciente y a un aumento de la temperatura del agua. Los huevos de esta especie son pelágicos. Tras un período de incubación de 5 a 7 días eclosionan las larvas, de vida pelágica y simetría bilateral. La migración ocular que dará lugar a la fase post-larvaria tiene lugar aproximadamente a los 50 días de la eclosión (González, 2008).

Sargo

El sargo o *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758) es un pez perteneciente a la familia Sparidae de hábitos costeros bento-demersales. Los adultos alcanzan longitudes de hasta 40 cm. Esta especie se encuentra distribuida por toda la costa oriental del Océano Atlántico, desde el Golfo de Vizcaya hasta Senegal y en los archipiélagos de Madeira y Canarias, estando ausente en el Archipiélago de Cabo Verde (Bauchot et al., 1981; Queró et al., 1990). Ocupa zonas litorales de fondo rocoso o arenoso cercano a zonas rocosas. También son frecuentes sobre praderas de algas o refugiados en grietas (González et al., 1994) y pueden habitar hasta profundidades próximas a los 150 m, aunque son especialmente abundantes cerca de las zonas de rompiente (Bauchot et al., 1981; Queró et al., 1990).

En cuanto a la dieta, los juveniles son omnívoros, alimentándose de algas e invertebrados (González et al., 1994), mientras que los adultos son carnívoros.

Son hermafroditas proterándricos y alcanzan la madurez sexual a los dos años (Bauchot & Pras, 1997).

Delfín mular

El delfín mular, arroaz o *Tursiops truncatus* (Gervais, 1855) es un cetáceo odontoceto englobado dentro de la familia Delphinidae, familia que comprende a los delfines oceánicos o delfines en sentido estricto. Los ejemplares adultos alcanzan tamaños que van desde los 190 a los 380 cm. Son animales gregarios que forman sociedades complejas, si bien su estructura social puede presentar una gran variabilidad (Gowans, 2019). El delfín mular ocupa tanto la plataforma y el talud continental como las aguas oceánicas profundas, además de estar presente en bahías, lagunas, canales, desembocaduras de ríos y estuarios (Wang et al., 2014). Uno de los factores limitantes de la especie es la temperatura del agua, seleccionando temperaturas superficiales entre 10 y 32 °C (Wells & Scott, 1999; Wang et al., 2014), aunque es muy probable que dicha restricción se asocie con la presencia de sus presas. En cuanto a la profundidad, se considera un residente habitual tanto en aguas profundas (Scott & Chivers, 1990) como de zonas someras. Al igual que sucedía con la temperatura, parece que la selección de la profundidad está directamente relacionada con la abundancia de alimento. Especie de distribución cosmopolita, el delfín mular común está presente en la mayoría de los mares templados y tropicales, tanto en aguas litorales como oceánicas, no superando generalmente los 45° de latitud hacia ambos polos (Wells & Scott, 1999, 2018). En lo referente a la costa Atlántica, puede encontrarse desde Galicia hasta la provincia de Cádiz, ocupando las rías gallegas e incluso las desembocaduras de los ríos.

Se considera a *T. truncatus* como un depredador oportunista. Aunque muestra preferencia por los peces, también puede consumir otros tipos de presas como cefalópodos y otros moluscos, crustáceos o anélidos poliquetos (Santos et al., 2007). En cuanto a los peces que consume, varían enormemente a lo largo y ancho de su área de distribución, aunque todos los estudios al respecto coinciden en la gran variedad de especies consumidas. No obstante, en la mayor parte de estudios sobre la alimentación del delfín mular, las presas principales son aquellas especies de peces más abundantes en la región (Blanco et al., 2001; Santos et al., 2007; Fernández et al., 2011). Aun siendo los peces las presas principales del delfín mular; los cefalópodos, como se ha dicho, también se encuentran presentes en su dieta en mayor o menor medida. Un estudio de los contenidos digestivos de delfines mulares en Galicia mostró que el 57,14% contenían solo peces, el 7,14% solo cefalópodos, el 28,57% peces y cefalópodos y el 7,14% el estómago vacío (González et al., 1994).

El delfín mular es una especie de reproducción marcadamente promiscua (Reynolds et al., 2013). El ciclo ovárico dura 36 días, seguidos de una gestación de unos 12 meses (Wang et al., 2014). Los nacimientos pueden ocurrir durante todo el año a largo de su área de distribución, pero existe cierta estacionalidad (Ferreti et al., 1999). A juzgar por los avistamientos de hembras con crías, en España la mayor parte de los partos se producen en verano, aunque pueden extenderse desde la primavera al otoño. La lactancia suele durar un año y medio, pudiendo prolongarse varios años más (Wells & Scott, 2018), con un intervalo entre partos de unos 3-6 años (Wang et al., 2014). Las crías son fuertemente dependientes de sus madres durante los 3 o 4 primeros años de su vida (Mann et al., 2000).

Calderón gris

El calderón gris o *Grampus griseus* (Cuvier, 1812) es un cetáceo odontoceto perteneciente a la familia Delphinidae. Los calderones grises se caracterizan por presentar cambios en la coloración a medida que los individuos alcanzan la edad adulta. Así, los ejemplares recién nacidos y juveniles hasta 210 cm de longitud presentan un patrón de color gris oscuro en el lomo, con color claro y canela en la cabeza, anterior al espiráculo. Los ejemplares de 230 a 250 cm presentan un color marrón oscuro achocolatado, casi negro, en los que destaca la contrastada ancla blanca del pecho y la mancha genital (López, 2011). En la etapa juvenil se empiezan a observar rosetas grises a lo largo del cuerpo, empezándosele a marcar las cicatrices. Los ejemplares de 290 a 300 cm son grises con marcas blancas de cicatrices, manteniendo un gris uniforme algo más oscuro en el lomo y en las aletas. Finalmente, el patrón característico de los ejemplares de más de 300 cm es blanquecino muy típico en la parte anterior del cuerpo y marcado de cicatrices, con tendencia a aclarar la cabeza totalmente, y manteniendo las aletas oscuras. Esta especie se distribuye por mares de regiones templadas y tropicales de todo el mundo, hasta 60° Norte y Sur. En el Atlántico está presente desde el Mar del Norte hasta Sudáfrica; se encuentra también en el Mediterráneo (Baird, 2002). En España se encuentra en aguas del Atlántico de las islas Canarias y de la Península, en aguas del Cantábrico y también en el Mediterráneo. Los calderones grises se encuentran en aguas de la plataforma continental y áreas próximas (Kruse et al., 1998). En las áreas litorales con estrecha plataforma continental y en el Atlántico europeo parecen estar asociados a las aguas costeras e islas oceánicas donde el fondo es abrupto (Carwardine, 1995; Harwood & Wilson, 2001).

G. griseus se alimenta casi exclusivamente de cefalópodos, especialmente calamares mesopelágicos. En tres ejemplares de Galicia se encontraron restos de *Sepiola atlantica*, pota común (*Todarodes sagittatus*), pulpo común (*O. vulgaris*) y pulpo blanco (*Eledone cirrhosa*) (González et al., 1994). Además en otros 16 ejemplares examinados, también en Galicia, se registraron cefalópodos en los estómagos de todos ellos. Las presas registradas fueron por orden de importancia: pulpo común (*O. vulgaris*), calamar común (*Loligo vulgaris*) y pulpo blanco (*Eledone cirrhosa*) (López, Benavente, 1993; Santos et al., 1996).

En cuanto a su biología reproductiva, decir que es poco conocida. Se estima un período de gestación de 13-14 meses. El período de nacimientos tiene lugar en la época estival en el Atlántico. El tamaño al nacer es de 110-150 cm (Casinos & Filella, 1994; Kruse, et al., 1998; Evans & Stirling, 2001).

2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DEL PROYECTO

Los pulpos juegan un doble papel en las redes tróficas marinas ya que en el ecosistema actúan como depredadores subdominantes (Roper et al., 1984). Son activos cazadores de una gran multitud de especies, que incluyen desde crustáceos y otros moluscos (incluidos otros pulpos y cefalópodos) a peces y otros invertebrados marinos. Pero también conforman la dieta de numerosas especies de mamíferos marinos y aves (Clarke et al., 1976; Arata & Xavier, 2003), así como de gran variedad de peces óseos y cartilaginosos (Ibáñez et al., 2004; Markaida & Hochberg, 2005; Castillo et al., 2007). Por tanto, este papel de depredadores subdominantes resulta muy útil para estudiar los cambios en la dinámica de las cadenas tróficas, ya que permite seguir dos líneas de investigación distintas: una en la que se analizan los cambios que puedan tener lugar en torno a las interacciones existentes entre ellos y sus depredadores, y otra línea de investigación acerca de los cambios en las relaciones con sus presas.

Además, la alta demanda de los cefalópodos por parte de los consumidores, el alto valor económico en el mercado internacional, las características biológicas (elevada conversión del alimento, rápido crecimiento, alto contenido proteico y elevada fecundidad), hacen de esta especie un claro objetivo para ser estudiada (Naranjo, 2009).

El principal objetivo del presente trabajo es el empleo de marcadores moleculares para detectar restos biológicos de *O. vulgaris* en los estómagos de sus depredadores como un método para evaluar su presencia en el área de estudio. Para ello se diseñarán unos *primers* específicos que amplifiquen de forma selectiva una región de ADN de la especie y no de otras. Posteriormente se procederá a analizar el contenido estomacal de las diferentes especies depredadoras. Esto implicará una determinación de la efectividad de este método para la detección de una especie en función de la cantidad de tejido presente de ésta. Para ello emplearemos estómagos artificiales que contengan diferentes cantidades de esta especie. Con esto se determinará la cantidad mínima de pulpo que ha de haber dentro del estómago de un depredador para que este método pueda detectar su presencia.

Asimismo, la toma de muestras a partir de estómagos de cetáceos, dada la dificultad que supone su obtención, pasará a considerarse un objetivo secundario, siendo empleados

únicamente en el caso de producirse varamientos en el período de tiempo que dure este estudio. Por tanto nuestro trabajo se centrará básicamente en el contenido estomacal de las especies piscícolas.

3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERÉS PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA SOCIEDAD

Este proyecto presenta varios puntos clave y de interés para la conservación de recursos y la investigación científica:

1- Conservación de recursos. El estudio arrojará nuevos datos y aportará nuevos conocimientos sobre la abundancia del pulpo en nuestras costas, y en función de los resultados obtenidos, se podrán desarrollar nuevas estrategias de conservación de la especie, como son una mayor inversión en técnicas que mejoren su cultivo o una mayor regulación del acceso a los caladeros, con el fin de conseguir una disminución de su sobrepesca.

2- Investigación. Podremos constatar la presencia en un área específica de una determinada especie de interés sin tener que recurrir para ello a la captura de individuos. Además, los resultados de este trabajo abrirán la puerta a la aplicación de este método en la identificación de depredadores potenciales de las especies estudiadas.

4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto serán enviados al MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad), al IEO (Instituto Español de Oceanografía) y a los Gobiernos Autonómicos de cada comunidad con zona de mar. Además, serán publicados en revistas de índole científico, tanto a nivel escrito como electrónico, y podrán ser utilizados por futuros estudiantes en sus TFG u otros documentos científicos. También cabe reseñar, la posibilidad de contacto con otras universidades y centros de investigación interesados. Por otro lado, dada la ubicación geográfica en la que nos encontramos, las conclusiones del estudio pueden servir como base para trabajos de divulgación a nivel de empresas por lo que también serán enviadas a las cofradías de pescadores.

5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA

Como se ha indicado previamente, se emplearán muestras de tejido estomacal a los que se les efectuará una extracción de ADN. De estos conjuntos de ADN se amplificarán fragmentos de la secuencia de la citocromo C oxidasa I mitocondrial que se emplearán como biomarcadores de la presencia de pulpo común.

Para ello se realizarán varios pasos: (1) obtención de ejemplares; (2) toma de muestras y creación de los estómagos artificiales; (3) extracción de ADN de los estómagos artificiales; (4) diseño y puesta a punto de los *primers*; (5) amplificación del ADN y (6) obtención de resultados.

5.1. Obtención de ejemplares

En este proyecto todos los ejemplares, tanto los de la especie de interés como de las especies depredadoras, procederán de individuos adquiridos en la Lonja de A Coruña. En el caso de los cetáceos los individuos empleados serán aquellos ejemplares muertos que aparezcan varados en la costa gallega durante la realización del estudio. En este caso contaremos con la colaboración del CEMMA (Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños) que monitorizará dichos varamientos y nos enviará las correspondientes muestras estomacales cuando aparezcan varadas las especies objetivo de nuestro estudio. Tomaremos diez ejemplares de cada especie en el caso de peces y cefalópodos y cinco ejemplares en el caso de los mamíferos. Asimismo tomaremos diez ejemplares de otras seis especies (**Figuras 01-06**) que podrían ser presas potenciales de dichos depredadores para añadirlas a los estómagos artificiales, a fin de comprobar la fiabilidad del método en casos reales (disparidad de presas, los depredadores estudiados no suelen ser depredadores especialistas y por tanto su contenido estomacal puede reunir muestras de diferentes especies). Las muestras de estas especies acompañantes provendrán también de ejemplares capturados en la Lonja de A Coruña.

5.2. Toma de muestras y creación de los estómagos artificiales

De cada especie seleccionada (**Tabla 1**) tomaremos fragmentos de tejido estomacal. Se procurará evitar cualquier tipo de contaminación, para lo cual limpiaremos tanto pinzas como tijeras entre la toma de muestras de una especie y otra. Todas las muestras obtenidas permanecerán congeladas hasta el momento de su utilización.

Tabla 1: Especies que conformarán los estómagos artificiales.

Grupo funcional	Especie	Clave
Cefalópodos	<i>Octopus vulgaris</i>	OCVU
Cefalópodos	<i>Eledone cirrhosa</i>	ELCI
Cefalópodos	<i>Sepia officinalis</i>	SEOF
Cefalópodos	<i>Loligo vulgaris</i>	LOVU
Peces	<i>Sardina pilchardus</i>	SAPI
Peces	<i>Merluccius merluccius</i>	MEME
Peces	<i>Solea solea</i>	SOSO



Figuras 01-06. Arriba y de izquierda a derecha: Ejemplares de *Eledone cirrhosa* (Imagen tomada de “Creative commons” por Natural England bajo licencia CC BY-NC-ND 2.0), *Sepia officinalis* (Imagen tomada de “Creative commons” por Hans Hillewaert bajo licencia CC BY-SA 4.0) y *Loligo vulgaris* (Imagen tomada de “Creative commons” por Hans Hillewaert bajo licencia CC BY-NC-ND 2.0). Abajo y de izquierda a derecha: ejemplares de *Sardina pilchardus* (Imagen tomada de “Creative commons” por Etrusco25 bajo licencia CC BY 3.0), *Merluccius merluccius* (Imagen tomada de “Creative commons” por Drow male bajo licencia CC BY-SA 4.0) y *Solea solea* (Imagen tomada de “Creative commons” por Citron bajo licencia CC BY-SA 3.0).

Para la realización del estudio se crearán 10 estómagos, teniendo cada uno de ellos un peso húmedo comprendido entre 15 y 45 gramos (tal como se muestra en la **tabla 2**), que estarán conformados por cantidades variables de pulpo y cantidades fijas de las seis especies acompañantes. Asimismo, cada estómago contendrá una cantidad fija de tejido del depredador, ya que de comprobar la eficacia de este método en estómagos de depredadores reales habrá de esperarse también que contengan muestras de su propio material genético, por lo cual esto ha de ser tenido en cuenta para la correcta interpretación de los resultados. Se emplearán además las muestras de una única especie depredadora durante la preparación de los estómagos con el fin de comprobar que el método es factible. Cuando la fiabilidad del experimento quede demostrada entonces pasaremos a emplear muestras de todos los potenciales depredadores.

Una vez se hayan realizado las disecciones, se procederá a pesar todas las especies. Como ya se ha comentado anteriormente, se realizarán diversas preparaciones con distintas cantidades de *O. vulgaris*. Las preparaciones se efectuarán en concentraciones diferentes, desde un 0% hasta un 100 % de pulpo (**Tabla 2**).

Tabla 2: Contenido de cada estómago artificial donde se muestra la cantidad de pulpo común y del resto de especies acompañantes presente en cada uno de ellos.

Estómagos artificiales	<i>Octopus vulgaris</i> (g)	Depredador (g)	Resto especies (g)
EA0	0	10	5
EA1	0,3	10	5
EA2	0,6	10	5
EA5	1,5	10	5
EA10	3	10	5
EA20	6	10	5
EA30	9	10	5
EA40	12	10	5
EA50	15	10	5
EA100	30	10	5

Finalmente, se procederá a triturar los estómagos con la máquina Mixer Mill (MM 400, Restch, Haam, Germany), la cual permitirá homogenizar el contenido estomacal (Andón, 2019).

Se seguirá el siguiente procedimiento:

1. Cada estómago artificial va a ser envuelto, intentando así que quede todo bien separado para facilitar el proceso de trituración. Seguidamente, se introducirá en nitrógeno líquido, manteniéndolo en él durante 1 min.
2. Se extraerá la muestra y se le aplicará presión, mediante golpes, para disgregarla. A continuación, se introducirá con ayuda de las pinzas en cápsulas.
3. Dichas cápsulas se introducirán en la máquina de trituración.
4. Las muestras se sacarán de las cápsulas y se introducirán en tubos con la ayuda de una cuchara.

5.3. Extracción de ADN de los estómagos artificiales

Para la extracción del ADN se empleará el kit NZYTech de aislamiento de ADN genómico a partir de tejido. Los kits de aislamiento de ADN de tejido NZY están diseñados para la preparación simple, rápida y a pequeña escala de ADN genómico de alta pureza a partir de una gran variedad de fuentes de muestras. El método está basado en una columna de centrifugado en sílice y no requiere extracción con fenol o cloroformo. Este kit utiliza tampones de lisis optimizados que contienen proteinasa K y SDS para liberar el ADN de las células. Después de preparar el lisado, el ADN se absorbe selectivamente en la columna de tejido NZYSpin y las impurezas, como proteínas y sales, se eliminan durante los pasos de lavado. El ADN genómico eluido ya puede ser usado entonces en procesos de secuenciación, PCR, multiplex-PCR, genotipado...

Protocolo método NZY

1. Preparar secciones pequeñas (hasta 25 mg) de bloques de tejido incrustado fijo (si es posible, recortar el exceso de parafina del bloque antes de cortarlo). Manejar las secciones con pinzas o mondadientes y coloque las muestras en tubos de microcentrífuga.

2. Prelisis de la muestra

Añadir 180 μL de tampón NT1 y 25 μL de solución de proteinasa K a la muestra. Mezclar bien. Incubar a 56 °C durante 1-3 horas y agitar ocasionalmente durante la incubación.

3. Lisis de la muestra

Agitar la muestra. Agregar 200 μL de tampón NL a la muestra y mezclar durante 10 segundos.

4. Adición de etanol

Agregar 210 μL de etanol al 100% a la muestra y mezclar inmediatamente.

5. Unión al ADN

Transferir la mezcla del paso anterior a una columna de tejido NZYSpin colocada en una colección de tubos de 2 mL. Centrifugar durante 1 min a $>11.000 \text{ xg}$. Desechar el flujo continuo y coloque la columna en un nuevo tubo de recogida.

6. Lavar la membrana de sílice

Agregar 500 μL de tampón NW1 a la columna. Centrifugar durante 1 min a $>11.000 \text{ xg}$. Desechar el flujo continuo y vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección. Agregar 600 μL de Buffer NW2 (asegurándose de que se haya agregado etanol previamente) a la columna y centrifugar durante 1 min a $>11.000 \text{ g}$. Desechar el flujo continuo.

7. Membrana de sílice seca

Volver a colocar la columna de tejido NZYSpin en el tubo de recogida y centrifugar durante 2 min a $>11.000 \text{ xg}$.

8. Eluir el ADN

Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga limpio y agregar 100 μL de tampón NE, tampón TE o agua esterilizada (el precalentamiento del tampón de elución a 70 °C puede mejorar el rendimiento) directamente en la columna de membrana. Incubar 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a $>11.000 \text{ xg}$ durante 2 min para eluir el ADN. El ADN genómico se puede almacenar a 4 °C o -20 °C.

Una vez finalizado el protocolo de extracción de ADN, se comprobará si las muestras obtenidas presentan ADN, para comprobar que dicha extracción ha sido realizada correctamente. Para ello se empleará el NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo

Scientific, Barrington, IL, USA), un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral que permite realizar una medición rápida y fiable de la pureza y de la cantidad de ADN que contiene la muestra.

5.4. Diseño de *primers*

El diseño de un *primer* está orientado a obtener un equilibrio entre dos objetivos: especificidad (tendencia de un *primer* a hibridarse con su objetivo previsto y no con otros, no específicos) y eficiencia (proporción de plantillas utilizadas para sintetizar nuevas cadenas con cada ciclo de PCR, dando por asumido que los *primers* son abundantes) de la amplificación (Hyndman & Mitsunashi, 2003).

El diseño se realizaría con el programa PRIMER3Plus (Untergasser et al., 2007). A partir de la secuencia de citocromo C oxidasa I de pulpo depositada en el GenBank (KC789330.1) se diseñarían unos *primers* internos para que el producto de amplificación sea de alrededor de 100 pb. Se propone este reducido tamaño del producto de amplificación para minimizar los efectos de la digestión del tejido de pulpo en el estómago del predador. Como ejemplo se muestran cinco parejas de *primers* que serían las que inicialmente se enviarían a sintetizar (**Tabla 3**).

Tabla 3: Ejemplos de parejas de *primers* a ensayar.

	Primer forward	Primer reverse	Tm	Tamaño amplificado
Pareja 1	AGCACCAGATATAGCATTCCCA	CACCTCTTTCAACTGCTGCA	55 °C	101 pb
Pareja 2	ACCAGATATAGCATTCCCACGA	CCTGCACCTCTTTCAACTGC	55 °C	102 pb
Pareja 3	TCGAACAGAACTAGGACAACC	AGAGGTGGGTAACGGTTCA	54 °C	285 pb
Pareja 4	CCCCTTCTCTCACTCTTCTCC	GGCTAGATCAACAGAAGGTCC	55 °C	122 pb
Pareja 5	CCAGGATCCCTCTTAAATGACG	GGAGAAGAGTGAGAGAAGGGG	54 °C	208 pb

Además se emplearán como control positivo de las amplificaciones los *primers* universales diseñados por Palumbi (1996) para la amplificación de un fragmento del ADNr 16S mitocondrial.

5.5. Amplificación del ADN extraído de los estómagos artificiales

Aplicaremos la técnica de la PCR para amplificar el ADN extraído de los estómagos. La PCR se basa en el uso de una enzima polimerasa termoestable. Durante una PCR, los cambios de temperatura se utilizan para controlar la actividad de la polimerasa y la unión de cebadores. Después de la amplificación de su gen es posible aplicar el ADN amplificado en un gel de agarosa y tinarlo con un colorante que hace que sea visible. Cuanto más brillante sea la banda visible, más copias de la diana elegida se habrán creado (Andón, 2019).

A partir de las parejas de *primers* diseñadas en la tabla 3 se realizará un PCR en gradiente con temperaturas entre 49 y 55 °C. Además se realizarán tres concentraciones de Mg²⁺ para comprobar la efectividad y claridad de las bandas. Una vez comprobadas las amplificaciones se realizará una prueba multiplex incluyendo los *primers* de Palumbi (1996) que, como ya se ha comentado anteriormente, se emplearán como controles positivos de la amplificación.

5.6. Obtención de resultados

Una vez finalizadas las PCRs de los estómagos artificiales, se creará una tabla en base a las bandas observadas en los geles de agarosa. Asimismo, se considerará, 0 = no detección (ausencia de banda) y 1 = detección (presencia de banda), es decir, se tratará como a una variable cualitativa binaria.

Para realizar el análisis estadístico se creará un modelo de regresión logística binomial con el software R v3.5.1. (R Core Team, 2016) para predecir el resultado de una variable categórica, frecuencia de detección de pulpo, en función de la variable independiente, tipos de estómagos artificiales. Por tanto, se convertirá la variable de salida, detección de pulpo, en una numérica, la probabilidad.

Lo que se pretende con este estudio es verificar que estos *primers* funcionen y que puedan servir en futuros estudios de campo, permitiendo así detectar tanto la especie de interés en este proyecto como cualquier otra, desde otras presas potenciales hasta las especies depredadoras.

Por la misma razón, será necesario comprobar que los *primers* universales 16S empleados sirvan realmente como control positivo de la presencia de pulpo en los estómagos, dado que en condiciones naturales los otros *primers* utilizados podrían fallar por múltiples factores (por ejemplo que no se detecte presencia de pulpo debido a que el individuo utilizado no se haya alimentado de éste durante un largo período de tiempo), por lo que en estos casos se necesita contar siempre con un método fiable que nos permita asegurar que el resultado obtenido de no ser el esperado se deba a cualquiera de esos factores y no a un fallo en la extracción y preparación de las muestras.

Por último, se comprobará la validez de los estómagos artificiales con el fin de verificar que este método de obtención de muestras genéticas a partir del contenido gástrico del estómago de otra especie es verdaderamente útil para la identificación de *O. vulgaris*.

7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA. DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA

CONCEPTOS	2021	2022
Equipamiento científico-técnico	1.500€	1.500€
Material bibliográfico indispensable para la realización del proyecto	600€	-----
Material fungible	4.200€	4.200€
Ayudas de coste por desplazamiento	800€	400€
Ayudas para la realización de estadias de investigación	2.500€	2.500€
Costes indirectos o gastos generales que reglamentariamente exige la Universidad al grupo solicitante	3.000€	3.000€
Subtotal	12.600€	11.600€
TOTAL	24.200€	

8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

En lo que respecta a los aspectos éticos referidos a la investigación que se propone, al no ser necesaria la utilización de animales vivos, y dado que tampoco se emplearán OMG ni personas ni los datos de éstas, no es necesario que estas implicaciones sean evaluadas por un comité de ética. Además durante la realización del presente estudio no se vulnerará de ninguna forma cualquiera de los principios incluidos dentro del Protocolo de Nagoya. Por otro lado, en lo referido a la bioseguridad, no existen riesgos que el personal pueda asumir en la manipulación de las muestras y/o materiales. Asimismo, ante un hipotético riesgo, éste podrá ser solventado con el uso del equipamiento e instrumental de laboratorio adecuados, cumpliendo en todo momento con las medidas de higiene y seguridad recogidas en el Servicio de Prevención de Riesgos de la UDC. En adición a ello, se debe destacar que los investigadores componentes del equipo poseen una amplia experiencia de cara al trabajo en condiciones de seguridad.

9. CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR

Con este proyecto se pretende apoyar a la investigación del pulpo común en la costa gallega así como colaborar en la mejora de la gestión pesquera de este animal. En concreto:

1- Conocer nuevos datos sobre la abundancia del pulpo en nuestras costas y en función de los resultados obtenidos proceder al desarrollo de nuevas estrategias de conservación de la especie.

2- Se avanzará en el conocimiento de la propia especie ya que permitirá constatar su presencia en un área específica sin tener que recurrir para ello a la captura de individuos. Además, los resultados de este trabajo abrirán la puerta a la aplicación de este método en la identificación de depredadores potenciales de ésta y de otras especies estudiadas.

3- Se contribuirá al estudio de las redes tróficas marinas de Galicia, concretamente al estudio de su complejidad y de cómo éstas se ven afectadas por la pesca, sirviendo este trabajo además como un indicador de su estado actual.

CONCLUSIONS OU FITOS QUE SE PRETENDE ACADAR

Con este proxecto preténdese apoiar á investigación do polbo común na costa galega así como colaborar na mellora da xestión pesqueira deste animal. En concreto:

1- Coñecer novos datos sobre a abundancia do polbo nas nosas costas e en función dos resultados obtidos proceder ao desenvolvemento de novas estratexias de conservación da especie.

2- Avanzarase no coñecemento da propia especie xa que permitirá constatar a súa presenza nunha área específica sen ter que recorrer para iso á captura de individuos. Ademais, os resultados deste traballo abrirán a porta á aplicación deste método na identificación de depredadores potenciais desta e doutras especies estudadas.

3- Contribuirase ao estudo das redes tróficas mariñas de Galicia, concretamente ao estudo da súa complexidade e de como estas vense afectadas pola pesca, servindo este traballo ademais como un indicador do seu estado actual.

CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED

The aim of this project is to support the research of the common octopus on the Galician coast as well as to collaborate in the improvement of the fishing management of this animal. Specific:

1- To know new data on the abundance of the octopus on our coasts and based on the results obtained, proceed to the development of new conservation strategies for the species.

2- It will advance in the knowledge of the species itself since it will allow to verify its presence in a specific area without having to resort to the capture of individuals. Furthermore, the results of this work will open the door to the application of this method in the identification of potential predators of this and other studied species.

3- It will contribute to the study of the marine trophic networks of Galicia, specifically to the study of their complexity and how they are affected by fishing, this work also serving as an indicator of their current state.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDN N. (2019). Avaluaci de l's de marcadors moleculars per detectar la presença d'escamarl (*Nephrops norvegicus*) en la dieta dels seus depredadors. Trabajo de fin de grado dirigido por el Dr. Joan Navarro Bernab, el Dr. Guiomar Rotllant Estelrich y el Dr. Francisco José Ramírez Benítez. Facultat de Ciències de la Terra, Universitat de Barcelona con la colaboración del CSIC. Pp: 21.
- ARATA J., XAVIER J.C. (2003). The diet of black-browed albatrosses at the Diego Ramirez Islands, Chile. *Polar Biology*, 26: 638-647.
- BAIRD R.W. (2002). Rissos's dolphin, *Grampus griseus*. *Encyclopedia of marine mammals*. Second Edition. Academic Press, San Diego. Pp: 1037-1039.
- BARBIERI M., YNEZ E., SILVA C., TRUJILLO H. (2014). Socio-ecological analysis of the artisanal fishing system on Easter Island. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42: 803-813.
- BAUCHOT M.L., (1987). Poissons osseaux, Congridae. Fiches FAO d'identificación des espèces pour les besoins de la pche, Méditerranée et Mer Noire. Zone de Pche 37, FAO, Rome. 2: 1065–1069.
- BAUCHOT M.L., HUREAU J.C., MIQUEL J.C. (1981). "Sparidae". FAO species identification sheets for fishery purpose. Eastern Central Atlantic; fishing areas 34, 47 (in part). Canada funds-in-Trust. Ottawa, Department of fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food Agriculture and Organization of the United Nations. 4: 326.
- BAUCHOT M.L., PRAS A. (1997). Guía de los peces de mar de España y de Europa. Neuchâtel: Omega. Pp: 432.
- BLANCO C., SALOMN O., RAGA J.A. (2001). Diet of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 81:1053-1058.

- BLANQUER A., ALAYSE J.P., BERRADA-RKHAMI O., BERREBI S. (1992). Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (*Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae*) throughout their range in Europe. *Journal of Fish Biology*. 41:725-736.
- CAPAPÉ C., MNASRI-SIOUDI N., OLFA E., BOUMAIZA M., AMOR M.M., REYNAUD C. (2014). Production, maturity, reproductive cycle and fecundity of small-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (*Chondrichthyes: Scyliorhinidae*) from the northern coast of Tunisia (Central Mediterranean). *Journal of Ichthyology*. 54:111-126.
- CARRILLO M., ZANUY S., PRAT F., CERDÀ J., MAÑANÓS E., BROMAGE N.R. (1995). Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. *Blackwell Science*, London. Pp: 138-168.
- CARVAJAL W., RAMÍREZ P., DE LA CRUZ J., CASTRO J. (2003). Evaluación del recurso pulpo *Octopus mimus* en las islas Lobos de Tierra Y de Afuera – Lambayeque. Informe de evaluación Instituto del Mar de Perú. Pp: 27.
- CARWARDINE M. (1995). Ballenas, delfines y marsopas. Ed. Omega, Barcelona. Pp: 256.
- CASINOS A., FILELLA S. (1994). *Grampus griseus* (G. Cuvier, 1812) Rundkopfdelphin, Risso Delphin. Meeressäuger. Teil I: Wale und Delphine – Cetacea. Teil IA: Einführung, Monodontidae, Phocoenidae, Delphinidae. Handbuch der Säugetiere Europas. Aula Verlag, Wiesbaden. 6: 395-405.
- CASTILLO K., IBAÑEZ C.M., GONZÁLEZ C., CHONG J. (2007). Dieta del pez espada *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758) en distintas zonas de pesca frente a Chile central durante otoño de 2004. *Revista de Biología Marina & Oceanografía*, Valparaíso. 42: 149-156.
- CLARKE M.R., MACLEOD N., PALIZA O. (1976). Cephalopod remains from the stomachs of sperm whales caught off Peru and Chile. *Journal of Zoology*. 180: 477-493.
- COMPAGNO L.J.V., DANDO M., FOWLER S.L. (2005). Sharks of the world. Princeton University Press. Nueva York. Pp: 480.
- CURTIN R., PRELLEZO R. (2010). Understanding marine ecosystem based management: A literature review. *Marine Policy*. 34: 821-830.
- EBERT D.A., STEHMANN M.F.W. (2013). Sharks, batoids, and chimaeras of the North Atlantic. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. Rome, FAO. 7: 523.
- EVANS W.E., STIRLING I. (2001). Life history strategies of marine mammals. *Marine Mammals: Biology and Conservation*. Kluwer Academic/Plenum Press, London. 1: 7-62.
- FARMERY A., GARDNER C., GREEN B.S., JENNINGS S. (2014). Managing fisheries for environmental performance: the effects of marine resource decision-making on the footprint of seafood. *Journal of Cleaner Production*. 64: 368-376.
- FERNANDES P. (2009). Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. Tesis doctoral dirigida por el Dr. Manuel Rey Méndez, la Dra. Ana María Otero Casal y la Dra. Luísa Maria Pinheiro Valente. Universidade de Santiago de Compostela y CIIMAR (Portugal). Pp: 255.

- FERNÁNDEZ R., SANTOS M. B., PIERCE G.J., LLAVONA A., LÓPEZ A., SILVA M.A., FERREIRA M., CARRILLO M., CERMEÑO P., LENS S., PIERTNEY S.B. (2011). Fine-scale genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*. 670: 111-115.
- FERRETTI S., BEARZI G., POLITI E. (1999). Comparing behavior of inshore bottlenose and common dolphins in the eastern Ionian Sea through focal group surfacing pattern analysis. *European Research Cetaceans*. 12: 209.
- FISCHER W. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca, Pacífico Oriental Plantas e invertebrados. 1: 664.
- GIBSON R.N. (2005). Flatfishes. Biology and Exploitation. Blackwell Publishing. Oxford. Pp: 391.
- GONZÁLEZ A.F., LÓPEZ A., GUERRA A., BARREIRO A. (1994). Diets of marine mammals stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast with special reference to Cephalopoda. *Fisheries Research*. 21: 179-191.
- GONZÁLEZ C. (2020). El papel de las áreas marinas protegidas en alta mar en la protección de grandes pelágicos. Caso práctico: Parque Nacional Isla del Coco (Costa Rica). Tesis doctoral dirigida por la Dra. María Grazia Pennino, el Dr. José Luis Sanchez Lizaso y el Dr. Jorge Cortés. Universidad de Alicante. Pp: 134.
- GONZÁLEZ M.G. (2008). Desarrollo de un mapa genético con marcadores aifp y microsatélite en rodaballo (*Scophthalmus maximus L.*). Tesis doctoral dirigida por la Dra. Carmen Bouza Fernández, el Dr. Paulino Martínez Portela y la Dra. Laura Sánchez Piñón. Universidade de Santiago de Compostela. Pp: 228.
- GONZÁLEZ, J., HERNÁNDEZ C., MARRERO P., RAPP E. (1994). Peces de Canarias. Guía submarina. Sta. Cruz de Tenerife. Ed. Francisco Lemus. Pp: 256.
- GOWANS S. (2019). Grouping behaviors of Dolphins and Other Toothed Whales. Ethology and Behavioral Ecology of Odontocetes. *Springer Nature Switzerland*. Pp: 3-24.
- GUERRA Á. (1978). Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. Instituto de Investigaciones Pesqueras, Laboratorio de Vigo, muelle de Bouzas. *Investigación Pesquera*. Pp: 351-364.
- HARWOOD J., WILSON B. (2001). The implications of developments on the Atlantic Frontier. *Continental Shelf Research*. 21:1073-1093.
- HYNDMAN D.L., MITSUHASHI M. (2003). PCR primer design. PCR protocols. Pp: 81-88.
- IBÁÑEZ C.M., GONZÁLEZ C., CUBILLOS L. (2004). Dieta del pez espada *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758) en aguas oceánicas de Chile central en invierno de 2003. *Investigación Marina*, Valparaíso. 32: 113-120.
- KRUSE D., CALDWELL D.K., CALDWELL M.C. (1998). Risso's dolphin *Grampus griseus* (G. Cuvier, 1812). Handbook of marine mammals. The second book of dolphins and the porpoises. Academic Press, London. 6: 183-212.
- LEVY A., ABLE K.W., GRIMES C.B., HOOD P. (1988). Biology of the conger eel *Conger oceanicus* in the Mid-Atlantic Bight: II Foods and feeding ecology. *Marine Biology*. 98: 597-600.
- LÓPEZ A., BENAVENTE P. (1993). Varamento dun exemplar xuvenil de arroaz boto (*Grampus griseus*, C.) no Grove (Pontevedra) Galicia. *Eubalaena*. 2: 17-25.

- LÓPEZ A., CEDEIRA J.A.M. (2011). Marsopa –*Phocoena phocoena*. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Pp: 16.
- LÓPEZ A., CEDEIRA J.A.M., FERNÁNDEZ R., SANTOS M.B. (2008). Recopilación da información dispoñible para a toniña, *Phocoena phocoena*, en Galicia. Informe técnico Xunta de Galicia. En: LÓPEZ A., CEDEIRA J.A.M. (2011). Marsopa – *Phocoena phocoena*. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Pp: 16.
- LÓPEZ, A. (2011). Guía de identificación de cetáceos. CEMMA LIFE+INDEMARES. Pp: 56.
- LYTHGOE J., LYTHGOE G. (1971). Fishes of The Sea: The Coastal Waters of The British Isles. Northern Europe and the Mediterranean. Blandford Press, London. Pp: 320.
- MANN J., CONNOR R.C., BARRE L.M., HEITHAUS M.R. (2000). Female reproductive success in bottlenose dolphins (*Tursiops spp.*): life history, habitat, provisioning, and group size effects. *Behavioral Ecology*. 11:210-219.
- MARKAIDA U., HOCHBERG F.G. (2005). Cephalopods in the diet of swordfish (*Xiphias gladius*) caught off the west coast of Baja California, Mexico. *Pacific Science*. 59: 25-41.
- MESSENGER, J.B. (2001). Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biological Reviews*. 76: 473-528.
- NARANJO J.R. (2009). Biometría, ecología, situación actual y pesca del pulpo común (*Octopus vulgaris Cuvier 1797*) en el cantón Salinas – Santa Elena durante noviembre 2008 – mayo 2009. Tesis de grado dirigida por la Dra. Tanya González. Universidad Estatal “Península de Santa Elena”. Pp: 197.
- PALUMBI S.R. (1996). Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. Molecular systematics. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Pp: 205–247.
- PARDO B.G., CASAS L., FORTES G.G., BOUZA C., MARTÍNEZ P., CLARK M.S., SÁNCHEZ L. (2005). New microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) derived from an enriched genomic library and sequence databases. *Molecular Ecology Notes*. 5: 62-64.
- PÉREZ R. (2016). Elaboración del proyecto: Efecto de los factores abióticos en *Octopus vulgaris (Cuvier 1797)*. Trabajo de fin de grado dirigido por el Dr. Andrés Martínez Lage. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña. Pp: 27.
- PICKETT G.D., PAWSON M. G. (1994). Sea bass: biology, exploitation and conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 5:167-168.
- QUERÓ J.C., HUREAU J.C., KARRER C., POST A., SALDANHA L. (1990). Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic. Clófeta. UNESCO, SEI and JNICT Portugal. 2: 1081-1330.
- QUIROGA H. (2002). La caza de ballenas en aguas ibéricas. Diputación de A Coruña. Pp: 153.
- QUIROZ ESPINOSA J.C., WILL ONETTO R. (2013). Informe final bacalao de profundidad. Instituto de Fomento Pesquero. Pp: 179.
- R CORE TEAM. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing. Pp: 2673.
- REYNOLDS III J.E., WELLS R.S., EIDE S.D. (2013). The Bottlenose Dolphin Biology and Conservation. University Press of Florida, Gainesville. Pp: 306.

- RODRÍGUEZ-CABELLO C., SÁNCHEZ F., FERNÁNDEZ, A., OLASO I. (2004). Is the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) population from the Cantabrian Sea a unique stock? *Fisheries Research*. 69: 57-71.
- RODRÍGUEZ-CABELLO C., SÁNCHEZ F., OLASO I. (2007). Distribution patterns and sexual segregations of *Scyliorhinus canicula* (L.) in the Cantabrian Sea. *Journal of Fish Biology*. 70: 1568 - 1586.
- ROPER C.F.E., SWEENEY M.J. (1981). Cephalopods. FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic, fishing areas 34, 47 (in part). Funds-in-trust. Ottawa, Dept. fisheries and Oceans Canada by arrangement with FAO of United Nations. 6: 326.
- ROPER C.F.E., SWEENEY M.J., NAUEN C.E. (1984). FAO Species Catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis. 3:125-277.
- SANTOS M.B., FERNÁNDEZ R., LÓPEZ A., MARTÍNEZ J.A., PIERCE G.J. (2007). Variability in the diet of bottlenose Dolphin, *Tursiops truncatus*, in Galician waters, north-western Spain, 1990-2005. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 87: 231-241.
- SANTOS M.B., PIERCE G.J., LÓPEZ A., BARREIRO A., GUERRA A. (1996). Diets of small cetaceans stranded NW Spain 1994-95. ICES Council Meeting 1996/N. Pp: 11.
- SCOTT M.D., CHIVERS S.J. (1990). Distribution and Herd Structure of Bottlenose Dolphins in the Eastern Tropical Pacific Ocean. The Bottlenose Dolphin. Academic Press, New York. Pp: 387-402.
- SERENA F. (2005). Field Identification Guide to the Sharks and Rays of the Mediterranean and Black Sea. FAO, Rome. Pp: 96.
- SULLIVAN S.O., MORIARTY C., FITSGERARD R.D., DAVENPORT J., MULCAHY M.F. (2003). Age, growth and reproductive status of the European conger eel. *Conger conger* (L.) in Irish coastal waters. *Fisheries Research*. 6: 55-69.
- UNTERGASSER A., NIJVEEN H., RAO X., BISSELING T., GEURTS R., LEUNISSEN J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*. 35: W71-W74.
- WANG J.Y., RIEHL K.N., DUNGAN S.Z. (2014). Family Delphinidae. Handbook of the Mammals of the World: Sea Mammals. Lynx Edicions, Barcelona. 4: 410-526.
- WELLS R.S., SCOTT M.D. (1999). Bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Handbook of marine mammals. The second book of dolphins and the porpoises. Academic Press, San Diego. 6: 137-182.
- WELLS R.S., SCOTT M.D. (2018). Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, common bottlenose dolphin. Encyclopedia of Marine Mammals. Third Edition. Academic Press, London. Pp: 118-125.
- WHEELER A. (1985). The World Encyclopedia of Fishes. Macdonald, London. Pp: 368.