

Trabajo de Fin de Máster

Análisis de la heteroplasmia y la variación genética del ADNmt en la centolla *Maja brachydactyla*, Balss 1922

Analysis of heteroplasmy and genetic variation of mtDNA in spider crab *Maja brachydactyla*, Balss 1922

Análise da heteroplasmia e a variación xenética do ADNmt na centola *Maja brachydactyla*, Balss 1922

Wendy Fernández Pujó

Febrero, 2022

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

BIOLOGÍA MARINA

D.^a Elba Rodríguez Pena y D. Andrés Martínez Lage autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster “Análisis de la heteroplasmia y la variación genética del ADNmt en la centolla *Maja brachydactyla*, Balss 1922” presentado por Wendy Fernández Pujó para su defensa ante el tribunal calificador.

**RODRIGUEZ
Z PENA
ELBA -
53309195W**

Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ
PENA ELBA -
53309195W
Fecha: 2022.02.17
17:18:03 +01'00'

Fdo: Elba Rodríguez Pena

**MARTINEZ
LAGE
ANDRES - DNI
32428140A**

Firmado digitalmente por
MARTINEZ LAGE
ANDRES - DNI
32428140A
Fecha: 2022.02.17
09:46:57 +01'00'

Fdo: Andrés Martínez Lage

RESUMEN

La heteroplasma mitocondrial es un fenómeno por el cual dos secuencias diferentes de ADN mitocondrial coexisten en una misma célula o individuo. Recientemente se ha descubierto una alta incidencia de este fenómeno en la centolla (*Maja brachydactyla* Balss, 1922) en una población de Galicia. Se creía que el origen de esta heteroplasma podría estar relacionada con cruces interespecíficos entre *Maja brachydactyla* y *Maja squinado* al sur de la Península Ibérica. Estas hibridaciones provocarían fallos en los sistemas de eliminación de las mitocondrias paternas generándose heteroplasma. Además, se debería formar un gradiente positivo N-S de incidencia de heteroplasma a lo largo de la costa europea. Sin embargo, los resultados de este estudio rechazan la hipótesis al no encontrar una incidencia menor en una región más al norte no Galicia. Por tanto, se plantea la posibilidad de que estos fallos deban a errores en los mecanismos de eliminación de las mitocondrias paternas provocados por un factor desconocido. Además, debido a la elevada diversidad detectada y la ausencia de zonación en las redes haplotípicas, se ha detectado que esta especie se comporta como una única unidad de apareamiento aleatoria en el Atlántico norte.

ABSTRACT

Mitochondrial heteroplasmy is a phenomenon by which two different mitochondrial DNA sequences coexist in the same cell or individual. A high incidence of this phenomenon has recently been discovered in the spider crab (*Maja brachydactyla* Balss, 1922) in a population of Galicia. It was believed that the origin of this heteroplasmy could be related to interspecific crosses between *Maja brachydactyla* and *Maja squinado* in the south of the Iberian Peninsula. These hybridizations would cause failures in the paternal mitochondria elimination systems, generating heteroplasmy. In addition, a positive N-S gradient of heteroplasmy incidence should form along the European coast. However, the results of this study reject the hypothesis by not finding a lower incidence in a region further north than Galicia. Therefore, the possibility arises that these failures are due to errors in the mechanisms of elimination of paternal mitochondria caused by an unknown factor. In addition, due to the high diversity detected and the absence of zonation in the haplotype networks, it has been detected that this species behaves as a single random mating unit in the North Atlantic.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. ADN mitocondrial	2
1.2. Heteroplasmia en el ADN mitocondrial	2
1.3. Origen de la heteroplasmia	3
1.4. <i>Maja brachydactyla</i>	4
1.5. Heteroplasmia en <i>Maja brachydactyla</i>	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Obtención de las muestras y extracción de ADN	6
3.2. Amplificación y secuenciación del COI	6
3.3. Análisis de variabilidad genética	7
3.4. Análisis de la heteroplasmia	8
4. RESULTADOS	9
4.1. Análisis de la heteroplasmia	9
4.2. Análisis de variabilidad genética y neutralidad	9
5. DISCUSIÓN	13
5.1. Heteroplasmia	13
5.2. Variación genética	14
5.3. Origen de la heteroplasmia en <i>M. brachydactyla</i>	16
6. CONCLUSIONES	20
7. REFERENCIAS	20

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es el material genético localizado en las mitocondrias que forma un pequeño cromosoma circular. El tamaño del genoma mitocondrial en cualquier metazoo comprende tamaños de entre 16 y 20 kb, donde se encuentran generalmente 13 genes codificantes de proteínas, 22 genes de ARNt, dos genes de ARNr y una región no codificante llamada región control (Bernt *et al.*, 2013). El ADNmt posee unas características generales que lo convierten en una herramienta muy útil para el estudio de los organismos. Se asume que tiene una herencia uniparental sin recombinación, por lo que un individuo debería portar un único alelo de ADNmt (White *et al.*, 2008). Esta condición, conocida como homoplasmia, puede tener diferentes orígenes independientes y supone una fuerte ventaja evolutiva frente a la transmisión biparental del ADNmt (Zouros, 2013).

En los metazoos, a excepción de los bivalvos (Breton *et al.*, 2007), la herencia del ADNmt se produce habitualmente por vía materna, de forma que la descendencia debería portar el mismo haplotipo que su madre. Este modelo de herencia ha permitido el uso del ADNmt para trazar el origen del humano moderno (Ingman *et al.*, 2000), del mismo modo que para identificar los stocks animales (Xiang *et al.*, 2017). Diferentes regiones de esta secuencia de ADN han sido ampliamente utilizadas en análisis genéticos evolutivos y poblacionales. Entre otras, destaca la secuencia del gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI), que se utiliza como marcador mitocondrial (Wang *et al.*, 2021). Cabe destacar que estas aplicaciones son válidas siempre y cuando se mantenga la condición de homoplasmia mitocondrial, ya que existen diversos estudios que demuestran que las características generales del ADNmt que se mencionaban anteriormente, no se cumplen en todos los organismos (Barr *et al.*, 2005; Tsaousis *et al.*, 2005).

1.2. Heteroplasmia en el ADN mitocondrial

Durante las últimas décadas, muchos estudios han reportado observaciones de heteroplasmia mitocondrial, condición en la que una célula o individuo contiene una mezcla de haplotipos de ADNmt. Estos avances en el conocimiento de la heteroplasmia han sido posibles gracias a técnicas modernas de detección basadas en NGS (Next-Generation Sequencing) o qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) y han demostrado que esta condición del ADNmt está más extendida de lo que se pensaba (Mitrofanov *et al.*, 2018;

Santibanez-Koref *et al.*, 2019). Entre los organismos en los que se ha observado heteroplasma mitocondrial en la naturaleza, encontramos el ser humano (Payne *et al.*, 2013), el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792) (Wolff *et al.*, 2011), el cangrejo azul (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) (Williams *et al.*, 2017) o la centolla (*Maja brachydactyla* Balss, 1922) (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020), entre otros. La presencia de heteroplasma en el ADNmt de un individuo, puede afectar al fitness del organismo y complicar el uso de marcadores de ADN mitocondrial en análisis genéticos poblacionales (Koolkarnkhai *et al.*, 2019).

1.3. Origen de la heteroplasma

La heteroplasma puede originarse por mutagénesis durante la vida de un organismo, por recombinación o por la transmisión del ADNmt paterno al cigoto durante la fecundación.

La heteroplasma que se origina por mutagénesis puede darse en células somáticas o en células germinales. En el primer caso, debido a la elevada tasa de mutación en el ADNmt y la gran cantidad de copias de este, sería de esperar que se creasen variantes del ADNmt que coexistieran con el haplotipo materno. Estas variantes deberían diferir en uno o unos pocos SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) y aparecer con una frecuencia extremadamente baja (Payne *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Además, al ocurrir en la línea somática no se transmiten a la descendencia.

Otro factor que puede derivar en heteroplasma mitocondrial son los eventos de recombinación. Sin embargo, a pesar del gran número de moléculas de ADNmt en un individuo, la detección de este tipo de heteroplasma es limitada ya que su frecuencia es muy baja (Breton y Stewart, 2015).

De entre los diferentes tipos de heteroplasma, la más común es la originada por la transmisión del ADNmt paterno. Este proceso se puede considerar como un fallo en los estrictos mecanismos que protegen el ADNmt materno (Rokas *et al.*, 2003). Existen diversos mecanismos para prevenir la transmisión de ADNmt paterno a la descendencia en animales: degradación del ADNmt paterno antes y después de la fecundación, bloqueo de la entrada de las mitocondrias paternas al oocito y eliminación de las mitocondrias paternas por autofagia o por la vía ubiquitina-proteosoma (Politi *et al.*, 2014; Sato y Sato, 2017). El motivo de la existencia de estos mecanismos no se conoce bien. Sin embargo, se

piensa que puede deberse a que la coexistencia de dos ADNmts diferentes y funcionalmente individuales en una célula, podría causar disfunción mitocondrial (Sharpley *et al.*, 2012). No obstante, en algunos casos el ADNmt paterno puede escapar a estos mecanismos y quedar en el oocito en una condición heteroplásmica.

Por último, se ha descrito un tipo particular de heteroplasmia en moluscos bivalvos que se caracteriza por una herencia doble uniparental (DUI) del ADNmt. En este caso los espermatozoides son homoplásmicos para un tipo de ADNmt llamado M, y los huevos son homoplásmicos para un tipo de ADNmt llamado F. Durante la fecundación y el consiguiente desarrollo, el ADNmt tipo F se propaga por los tejidos somáticos de machos y hembras, así como en el tejido germinal de las hembras. Sin embargo, el ADNmt tipo M está restringido únicamente al tejido germinal de los machos, de forma que se producen machos mosaicos con el ADNmt tipo F en los tejidos somáticos y tipo M en los tejidos germinales (Zouros *et al.*, 1994; Breton *et al.*, 2007).

En ocasiones, se pueden interpretar erróneamente como heteroplasmia otros eventos que pueden ocurrir en el ADNmt. Por ejemplo, la formación de pseudogenes mitocondriales (NUMTs). Estos se forman por la transposición del ADN mitocondrial en el genoma nuclear, que puede guardar cierta homología con los genes mitocondriales originales (Lopez *et al.*, 1994).

1.4. *Maja brachydactyla*

La centolla *Maja brachydactyla* (Balss y Michaelsen, 1922) es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Majidae (Ng *et al.*, 2008; De Grave *et al.*, 2009). Esta especie tiene una distribución que abarca el Atlántico oriental desde el Mar del Norte hasta Sudáfrica incluyendo las islas Azores, Madeira, las Islas Canarias y Cabo Verde (Neumann 1998; Sotelo *et al.*, 2009). En las costas europeas se han descrito tres especies correspondientes al género *Maja*: *M. brachydactyla*, *M. crispata* (Risso, 1778) y *M. squinado* (Herbst, 1788). De estas especies, *M. brachydactyla* y *M. squinado* son las más similares, siendo la primera más frecuente en el Atlántico y la segunda en el Mediterráneo. Ambas son especies de gran interés comercial, por lo que se ha estudiado ampliamente su morfología, filogenia y ciclo vital con la finalidad de llevar a cabo una explotación sostenible de este recurso (González-Gurriarán *et al.*, 1995, 1998; Freire *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2003; Sotelo *et al.*, 2009;

Verísimo *et al.*, 2011). Concretamente, *M. brachydactyla* está sometida a una fuerte explotación en países como Reino Unido, Francia, Portugal y España (Freire *et al.*, 2002). Además, Galicia representa la principal región de explotación española para esta especie, tanto en términos de producción (73%) como de ingresos (más del 80%) (Consellería do Mar da Xunta de Galicia, 2019).

En cuanto a sus características biológicas, *M. brachydactyla* es un decápodo móvil y bentónico (Orensanz y Jamieson, 1998) que presenta un ciclo de vida complejo con tres fases principales: fase de larva, fase juvenil y fase adulta o reproductiva. Tanto la dispersión de las larvas planctónicas y fases post-larva bentónicas, como las migraciones de las fases adultas, juegan un papel crucial en la dinámica y distribución de las poblaciones (Guerao *et al.*, 2008). Los grupos poblacionales de esta especie están formados por individuos en diferentes estadios del desarrollo. Los individuos adultos realizan migraciones a aguas profundas para reproducirse durante el otoño, pudiendo mezclarse en este punto individuos de diferentes poblaciones costeras (Freire *et al.*, 2000, Freire *et al.*, 2002).

La reproducción en esta especie se lleva a cabo mediante fecundación interna, por lo que las hembras desarrollan receptáculos seminales durante su proceso de maduración. Los espermátóforos, que albergan los espermatozoides, se almacenan en una estructura que posee la hembra llamada receptáculo seminal. La presencia de estas estructuras les permite almacenar el esperma de una o varias copulaciones con diferentes machos. Además, los receptáculos seminales se encuentran directamente conectada con los oviductos, por lo que los huevos pueden fecundarse sucesivamente sin necesidad de un nuevo apareamiento y así, la hembra puede realizar diferentes puestas (González-Gurriarán *et al.*, 1998, Rotllan *et al.*, 2007).

1.5. Heteroplasmia en *Maja brachydactyla*

En el artículo publicado por Abelló *et al.*, (2014), se siguió la posible existencia de heteroplasmia en *M. brachydactyla*. Sin embargo, es en el estudio realizado por Rodríguez-Pena *et al.*, (2020), donde se confirmó la presencia de heteroplasmia mitocondrial en esta especie mediante el uso de los marcadores COI y 16S. Además, se discutió el posible origen de esta condición, concluyendo que podría deberse a que la hibridación con una especie congénere, provocaría un fallo en los mecanismos que previenen la transmisión del ADNmt paterno. Dado el solapamiento de poblaciones de *M. brachydactyla* y *M. squinado* en el

área que rodea al estrecho de Gibraltar y su gran similitud, estos investigadores plantearon la hipótesis de que la hibridación entre estas especies genera individuos heteroplásmicos. De esta forma, la incidencia de heteroplasma debería ser mayor en el sur de la Península Ibérica, generándose un gradiente hacia el norte de la costa europea, donde la incidencia debería ser menor.

2. OBJETIVOS

Este estudio tiene como objetivo comprobar, en la especie *M. brachydactyla*, la existencia de un gradiente positivo norte-sur de incidencia de heteroplasma mitocondrial en la costa europea. Además, se estudiará la variabilidad genética de esta especie en tres poblaciones diferentes del Atlántico norte.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las muestras y extracción de ADN

Los especímenes de *M. brachydactyla* fueron suministrados por el proveedor local Air-Mar en un estado de moribundez. Todos ellos eran hembras provenientes de la costa francesa, concretamente de la ciudad portuaria de Lorient (47,747654; -3,364716). Los ejemplares fueron anestesiados por exposición a -18°C durante 4 minutos para, posteriormente, seccionar un pereiópodo de cada individuo.

Se obtuvieron muestras de tejido muscular del pereiópodo de 38 individuos diferentes. Estas muestras fueron conservadas en etanol absoluto hasta el momento de la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó mediante el uso del kit "NZY Tissue gDNA Isolation kit" (NZYTech). Todo el material de laboratorio usado para la manipulación de las muestras tisulares (tijeras, pinzas) fue lavado con lejía para evitar la contaminación entre los diferentes individuos.

La concentración de ADN de los productos de la extracción, fue medida mediante un espectrofotómetro de microvolumen (mySPEC). Todas las muestras se llevaron a una concentración final aproximada de 10 ng/μL.

3.2. Amplificación y secuenciación del COI

Para el estudio de la heteroplasma se amplificó por PCR un fragmento del ADN mitocondrial, concretamente la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI). El fragmento

COI fue amplificado usando los cebadores COIMaja_F 5'-gaatggccggaacatcttta-3', y COIMaja_R 5'-ccaccagctggatcaaagaa-3' y el kit comercial NZYTaQ 2xGreen Master Mix separate MgCl₂ (NZYTech). Cada reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 µL y se utilizaron 12,5 µL del kit comercial, 2,5 µL de ADN (10 ng/µL) y una concentración final de 2,5 mM de MgCl₂ y de 0,125 mM de cada cebador. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (BioRad) mediante el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 48,5 °C y 60 s a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en tampón TAE. Como tinción intercalante, para la observación de bandas bajo la luz UV, se utilizó RedSafe (iNtRON Biotechnology) a una concentración de 0,05 µL/mL. Los pocillos del gel se cargaron con 5 µL de producto de PCR y 1 µL de tampón de carga (azul de bromofenol/azul de xianol en solución acuosa de glicerol al 6X). El marcador de peso molecular utilizado fue NZYDNA Ladder VI (NZYTech) con un tamaño de banda entre 50 y 1500 pb.

Todos los productos de PCR que mostraron una única banda en el gel con el tamaño esperado de aproximadamente 650 pb, fueron enviados a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UDC para realizar su secuenciación en ambas direcciones.

3.3. Análisis de variabilidad genética

Se confirmó que las secuencias obtenidas correspondían al fragmento COI de *M. brachydactyla* mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) del NCBI. Mediante las secuencias de las lecturas de ambas direcciones, se generó una secuencia consenso para cada muestra. Las secuencias se alinearon utilizando la herramienta Muscle (Edgar, 2004) del programa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Para obtener un estudio más completo, se añadieron secuencias del COI de poblaciones de *M. brachydactyla* de Galicia (España), obtenidas del GenBank (MN027519 - MN02744); y de Rosslare (Irlanda), proporcionadas por mis directores (MBraIR_4IRGONh - MBraIR_20IRGONh, MBraIR_23IRGONh - MBraIR_32IRGONh, MBraIR_36IRGONh - MBraIR_39IRGONh, MBraIR_1IRGONh, MBraIR_2IRGONh, MBraIR_4IRTMm - MBraIR_8IRTMm, MBraIR_10IRTMm - MBraIR_14IRTMm, MBraIR_16IRTMm, MBraIR_18IRTMm - MBraIR_31IRTMm, MBraIR_33IRTMm - MBraIR_35IRTMm) (Figura 1).

Los análisis de diversidad genética, de haplotipos y de neutralidad fueron calculados usando el programa DnasSP 6.12.3.0 (Rozas *et al.*, 2017). Además, se construyó una red de haplotipos mediante el programa PopArt (Leigh y Bryant, 2015). Todos los análisis fueron realizados tanto con las secuencias originales como con las secuencias sin las posiciones ambiguas.



Figura 1. Localización geográfica de los lugares de procedencia de las muestras. De norte a sur: Rosslare (Irlanda), Lorient (Francia) y Galicia (España).

3.4. Análisis de la heteroplasmia

Los electroferogramas fueron examinados mediante el programa BioEdit (Hall, 1999). Con el fin de detectar los dobles picos en las secuencias de los productos de PCR, se examinaron las lecturas en ambas direcciones. Se consideraron heteroplásmicas aquellas posiciones donde la proporción del pico más bajo superase el 15,4% del valor que resulta al sumar la altura de los dos picos. El valor de referencia a partir del cual se ha considerado heteroplasmia en este estudio, corresponde a la proporción más baja del pico pequeño obtenida por Rodríguez-Pena *et al.*, (2020) en su estudio de la heteroplasmia en *M. brachydactyla*. En cuanto a la altura de los picos, se determinó como la media entre las alturas obtenidas en las lecturas de ambos sentidos. En las muestras en las que fue

observada heteroplasmia, se repitió todo el proceso desde la extracción de ADN, para descartar que los dobles picos hubieran sido producto de algún error durante el proceso.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la heteroplasmia

Los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación de las muestras fueron analizados para la detección de dobles picos (Figura 2). Estos fueron detectados en las posiciones 81, 240, 244, 246, 303, 360, 375.

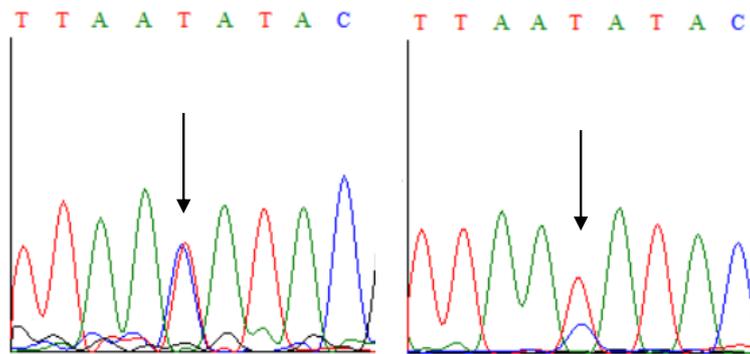


Figura 2. Electroferograma de la secuencia *reverse* (izq.) y *forward* (dcha.) del individuo MBF_1 donde se observan dobles picos.

Para cada muestra, se analizaron las lecturas en ambos sentidos y, en las posiciones mencionadas anteriormente, se tomaron las medidas de los picos. Se determinó como medida final para cada pico, la media entre la altura de los picos de las dos lecturas. Finalmente se establecieron las proporciones de cada base mediante la división de la altura de dicha base entre la suma de las alturas de ambas. Los resultados obtenidos indican que 20 de las 38 secuencias analizadas poseen, al menos, una posición nucleotídica con doble pico donde la altura del pico menor supera una proporción del 15,4% (Tabla 1).

4.2. Análisis de variabilidad genética y neutralidad

Para realizar los análisis de variabilidad genética se completaron las secuencias obtenidas con secuencias de poblaciones de *M. brachydactyla* de Irlanda y Galicia. Para intentar minimizar el error en los análisis por efecto de la heteroplasmia, se eliminaron las posiciones heteroplásmicas en todas las secuencias. Debido a que, al eliminar estas posiciones variables de las secuencias, se perdería diversidad, se realizaron los análisis

Tabla 1. Proporciones nucleotídicas (%) de la región COI amplificada del tejido muscular de diferentes individuos de *Maja brachydactyla* correspondientes a la población de Lorient (Francia).

Muestra	Posición													
	81		240		244		246		303		360		375	
	G	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
MBF_1*	67,8	32,2	0	100	68,4	31,6	28,9	71,1	0	100	58,5	41,5	0	100
MBF_2*	84,1	15,9	82,5	17,5	100	0	0	100	81,0	19,0	81,4	18,6	0	100
MBF_3*	83,9	16,1	0	100	100	0	0	100	0	100	79,5	20,5	0	100
MBF_4	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_5*	77,0	23,0	75,8	24,2	100	0	0	100	73,4	26,6	70,1	29,9	0	100
MBF_6*	66,7	33,3	0	100	75,2	24,8	24,4	75,6	0	100	58,6	41,4	0	100
MBF_7*	81,7	18,3	78,9	21,1	100	0	0	100	75,0	25,0	74,3	25,7	0	100
MBF_8	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_9*	78,4	21,6	0	100	86,1	13,9	0	100	0	100	70,9	29,1	0	100
MBF_10*	75,5	24,5	0	100	100	0	0	100	0	100	70,9	29,1	0	100
MBF_11*	73,1	26,9	71,9	28,1	100	0	0	100	70,3	29,7	67,9	32,1	0	100
MBF_12	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_13	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_14*	69,3	30,7	0	100	100	0	0	100	0	100	64,5	35,5	0	100
MBF_15*	81,6	18,4	78,9	21,1	100	0	0	100	79,2	20,8	78,9	21,1	0	100
MBF_16*	84,6	15,4	0	100	100	0	0	100	0	100	79,6	20,4	0	100
MBF_17*	87,0	13,0	0	100	100	0	0	100	0	100	82,2	17,8	0	100
MBF_18*	100	0	85,6	14,4	100	0	0	100	83,7	16,3	100	0	0	100
MBF_19	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_20	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_21	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_22	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_23	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_24	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_25	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_26	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_27	100	0	88,9	11,1	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_28	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_29*	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	79,5	20,5	0	100
MBF_30	87,8	12,2	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_31	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100
MBF_32*	78,5	21,5	0	100	100	0	0	100	0	100	0	100	0	100
MBF_33	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100
MBF_34*	100	0	86,8	13,2	100	0	53,8	46,3	85,0	15,0	100	0	0	100
MBF_35*	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	75,6	24,4
MBF_36*	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	78,4	21,6	0	100
MBF_37*	100	0	100	0	100	0	0	100	70,4	29,6	68,9	31,1	0	100
MBF_38	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100

Las proporciones fueron calculadas dividiendo la altura media de cada pico del electroferograma entre la suma de las alturas medias de ambos picos. La altura media para cada pico fue calculada como la media de las alturas de los picos en ambas lecturas. (*) Secuencias heteroplásmicas.

tanto con las posiciones heteroplásmicas como sin ellas.

El alineamiento final de los fragmentos del COI se compuso por 125 secuencias correspondientes a individuos de *M. brachydactyla* de Irlanda, Francia y España, con un tamaño de 449 pb que se redujeron a 442 pb tras eliminar las posiciones heteroplásmicas.

Para las secuencias originales, el análisis de polimorfismos mostró un número total de 43 haplotipos definidos por 45 posiciones variables (Tabla 2). Los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica fueron mayores en la población de Galicia y menores en la población de Lorient. Para el total de las secuencias se obtuvo una diversidad haplotípica elevada (0,864) combinada con una baja diversidad nucleotídica (0,0057). Los índices de neutralidad calculados mediante las pruebas F^* de Fu y Li y D de Tajima, fueron negativamente significativas para el conjunto de las secuencias. Sin embargo, únicamente resultaron negativamente significativas la D de Tajima en la población de Rosslare (-1,948; $P < 0,05$) y la F^* de Fu y Li en las poblaciones de Rosslare (-3,009; $P < 0,05$) y Galicia (-2,765; $P < 0,05$).

Tabla 2. Análisis de neutralidad y variabilidad genética en diferentes poblaciones geográficas de *Maja brachydactyla*. Las estimaciones indicadas son: número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (k), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Número de individuos (n).

Localidad	n	S	k	h	Pi	Fu and Li's F^*	Tajima's D
Rosslare (Irlanda)	61	28	17	0,816	0,00546	-3,009*	-1,948*
Lorient (Francia)	38	14	14	0,780	0,00439	-2,127	-1,3
Galicia (España)	25	24	24	0,994	0,00739	-2,765*	-1,723
Total	124	45	43	0,864	0,0057	-4,473**	-2,182***

Significancia estadística: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,02$; ***, $P < 0,01$.

Para las secuencias con las posiciones heteroplásmicas eliminadas, el análisis de polimorfismos mostró un número total de 31 haplotipos definidos por 39 posiciones variables (Tabla 3). Los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica fueron mayores en la población de Galicia y menores en la población de Lorient. Sin embargo, para el total de las secuencias se obtuvo una diversidad haplotípica elevada (0,709) combinada con una baja diversidad nucleotídica (0,00295). Los índices de neutralidad calculados mediante las

pruebas F* de Fu y Li y D de Tajima fueron negativamente significativos en todas las poblaciones excepto en Lorient, que solo fue negativamente significativa la D de Tajima.

Tabla 3. Análisis de neutralidad y variabilidad genética en diferentes poblaciones geográficas de *Maja brachydactyla*. Las secuencias analizadas fueron modificadas eliminando las posiciones heteroplásmicas de todas ellas. Las estimaciones indicadas son: número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (k), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Número de individuos (n).

Localidad	n	S	k	h	Pi	Fu and Li's F*	Tajima's D
Rosslare (Irlanda)	61	23	14	0,661	0,00323	-3,524**	-2,281***
Lorient (Francia)	38	10	12	0,633	0,00206	-2,329	-1,860*
Galicia (España)	25	18	16	0,900	0,00359	-3,704**	-2,386***
Total	124	39	31	0,709	0,00295	-5,261**	-2,532***

Significancia estadística: *, P < 0,05; **, P < 0,02; ***, P < 0,01.

La red haplotípica con las secuencias originales (Figura 3), muestra un mayor número de haplotipos que la red construida con las secuencias sin las posiciones ambiguas (Figura 4). Sin embargo, en ambas se aprecia una estructura en forma de estrella con un haplotipo central por ser el más frecuente en las poblaciones. En el caso de la red elaborada a partir

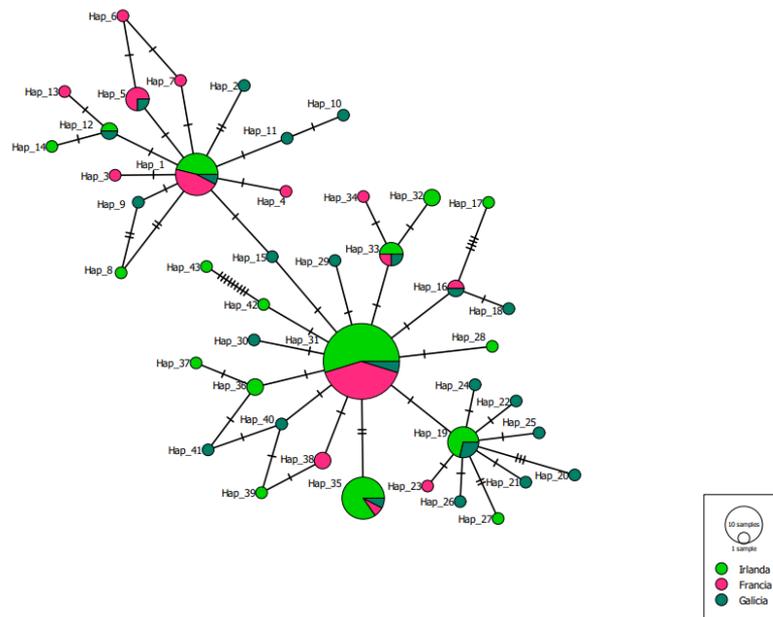


Figura 3. Red haplotípica (n = 31) del COI de diferentes poblaciones geográficas de *Maja brachydactyla*. Cada círculo se corresponde con un haplotipo; el tamaño del círculo indica el número de secuencias, y el color indica la población a la que pertenece la secuencia. Cada marca entre dos haplotipos corresponde a un único cambio entre las secuencias, habiendo tantos cambios como número de marcas.

de las secuencias originales (Figura 3), se aprecian tres haplotipos predominantes a partir de los cuales se forma la estructura en estrella. El resto de los haplotipos se sitúan alrededor, diferenciándose en la mayoría de los casos por una sustitución única.

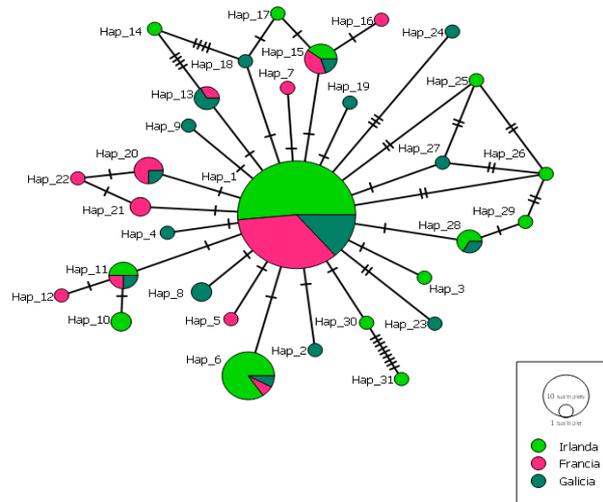


Figura 4. Red haplotípica ($n = 31$) del COI con las posiciones ambiguas eliminadas de diferentes poblaciones geográficas de *Maja brachydactyla*. Cada círculo se corresponde con un haplotipo; el tamaño del círculo indica el número de secuencias, y el color indica la población a la que pertenece la secuencia. Cada marca entre dos haplotipos corresponde a un único cambio entre las secuencias, habiendo tantos cambios como número de marcas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Heteroplasmia

La alta incidencia de heteroplasmia en la especie *M. brachydactyla* ha sido reportada recientemente por Rodríguez-Pena *et al.*, (2020), donde estudiaron la heteroplasmia de esta especie en las costas gallegas (España) mediante marcadores mitocondriales (COI y 16S). En el presente trabajo, hemos estudiado especímenes de *M. brachydactyla* de la costa francesa mediante el marcador mitocondrial COI, con el objetivo de esclarecer el origen del fenómeno de la heteroplasmia en esta especie.

Mediante la revisión de los electroferogramas pudimos detectar la existencia de dobles picos en algunas posiciones nucleotídicas (Figura 2). Los dobles picos pueden ser consecuencia de diferentes factores como contaminación, errores durante la amplificación, presencia de NUMTs, duplicación del genoma mitocondrial o heteroplasmia. Para descartar

posible contaminación de las muestras o errores durante la amplificación provocados por la Taq polimerasa (ref), repetimos los procesos de extracción y amplificación en todas las muestras en las que se habían detectado posiciones ambiguas. No hubo variación alguna en los resultados obtenidos, por lo que confirmamos que esta ambigüedad no se debía a errores en la amplificación o a contaminación.

La presencia de NUMTs como explicación de los dobles picos en *M. brachydactyla* fue descartada por Rodríguez-Pena *et al.*, (2020), ya que estos fragmentos de ADN mitocondrial transpuestos en el genoma nuclear deberían seguir una herencia mendeliana. Sin embargo, para un mismo individuo, estos investigadores observaron secuencias del COI duplicadas en algunos tejidos y en otros no. Por último, la posibilidad de que se tratase de una duplicación del genoma mitocondrial también fue descartada, ya que toda la descendencia de una hembra con doble pico debería tener doble pico también y esto no ocurría (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020). Por lo tanto, el único fenómeno que explicaría la presencia de estas posiciones ambiguas sería una verdadera heteroplasmia, indicando la coexistencia de diferentes secuencias mitocondriales en un mismo individuo.

5.2. Variación genética

La presencia de heteroplasmia mitocondrial puede interferir en los resultados de los análisis genéticos que emplean marcadores mitocondriales (Koolkarnkhai *et al.*, 2019). Por este motivo, los análisis se hicieron por duplicado incluyendo y sin incluir las posiciones ambiguas. En los resultados para las secuencias sin las posiciones ambiguas, detectamos una reducción en la diversidad, obteniendo 12 haplotipos menos que para las secuencias que las incluían. Además, obtuvimos valores para la diversidad haplotípica y nucleotídica reducidos a la mitad en los análisis de las secuencias sin la heteroplasmia.

Observamos una diversidad para el ANDmt de al menos $\pi = 0,002$ a $0,004$ (Tabla 3). Sin embargo, son algo inferiores a los que se han observado en otro estudio en *M. brachydactyla* en el que establecen un rango de diversidad de ($\pi = 0,003$ a $0,005$) (Sotelo *et al.*, 2008). Esta diferencia en los resultados puede estar relacionada con la eliminación de las posiciones ambiguas en las secuencias de este estudio. Al comparar los resultados de diversidad de las secuencias sin editar ($\pi = 0,004$ a $0,007$) (Tabla 2) con los obtenidos por Sotelo *et al.*, (2008) ($\pi = 0,003$ a $0,005$), se observa un incremento en la diversidad con

respecto a 2008. Este aumento en la diversidad puede estar asociado a un proceso de expansión en esta especie que se explica más adelante.

Los valores de diversidad para el ADNmt en esta especie son bastante elevados, siendo inesperados para una especie altamente explotada como la centolla (Freire *et al.*, 2002). El dato que más destaca es que la mayor diversidad se ha detectado en la población de Galicia, que, representando la principal región de explotación para esta especie en España (Consellería do Mar da Xunta de Galicia, 2019), es la población con mayor diversidad. Sin embargo, estos resultados podrían explicarse desde la biología reproductiva de esta especie. Un factor importante para tener en cuenta es la alta fertilidad de esta especie de braquiuros. Se ha documentado que las hembras realizan diferentes puestas al año, pudiendo poner >500.000 huevos por hembra en las hembras más grandes (Sotelo *et al.*, 2008). Además, el fenómeno de multipaternidad que se da en esta especie, fomenta una mayor diversidad genética (Rodríguez-Pena *et al.*, 2021).

La red de haplotipos presenta una forma de estrella (Figuras 3 y 4) donde se entremezclan todos los haplotipos, mostrando la ausencia de zonación en esta especie y agrupándola como una única unidad de apareamiento aleatorio. Esto indicaría que es una especie panmíctica a lo largo de toda la costa atlántico-europea. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Sotelo *et al.* (2008), ya que ellos detectan una leve diferenciación entre las poblaciones estudiadas y, a pesar de la homogeneidad observada, descartan la panmixia. Sin embargo, al igual que en este trabajo, Bárcena (2017) no detecta diferenciación genética entre las poblaciones del Atlántico norte, por lo que concluye que se trata de una especie panmíctica.

De acuerdo con las características biológicas de esta especie y a la elevada diversidad genética observada, tiene sentido que se comporte como una única unidad de apareamiento aleatorio. Se ha documentado que los adultos de esta especie realizan grandes migraciones para reproducirse, y en las zonas de reproducción pueden juntarse individuos de poblaciones adyacentes, contribuyendo así a la homogenización de estas (Freire *et al.*, 2002). Además, la deriva larvaria se ha propuesto tradicionalmente como el factor principal de la homogenización de las poblaciones marinas. La condición pelágica de estos organismos, favorece su dispersión a favor de las corrientes, pudiendo ser arrastradas grandes distancias contribuyendo al flujo génico (Lee *et al.*, 2006).

Bajo estas circunstancias donde se considera *M. brachydactyla* como una especie panmíctica, es importante resaltar que los resultados obtenidos para los índices de neutralidad (D de Tajima y F^* de Fu y Li) son negativamente significativos (Tablas 2 y 3). Esto podría indicar que esta especie se encuentra en un periodo de expansión tras haber sufrido un cuello de botella.

Nuestros análisis de variabilidad genética tienen ciertas limitaciones, ya que al eliminar las posiciones ambiguas de todas las secuencias, se ha perdido mucha variabilidad. Para futuros estudios de variabilidad genética en *M. brachydactyla* sería conveniente buscar una alternativa que permita minimizar el efecto provocado por la heteroplasma sin alterar demasiado la diversidad, por ejemplo, el uso de SNPs o microsatélites en vez de marcadores mitocondriales. De esta manera se podrán obtener resultados más rigurosos que permitan una mejor gestión pesquera de la centolla.

5.3. Origen de la heteroplasma en *M. brachydactyla*

Mediante los resultados obtenidos, se pretende esclarecer el origen de la heteroplasma en esta especie de braquiuro. Los fenómenos que podrían estar implicados en el origen de la heteroplasma mitocondrial serían: mutaciones *de novo*, recombinaciones o coexistencia de ADNmt paterno y materno en el mismo individuo. Los dos primeros fueron descartados por su baja frecuencia (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020). Por tanto, la explicación más plausible sería la coexistencia de mitocondrias maternas y paternas. Ante esta explicación habría dos posibilidades, una herencia uniparental (DUI) o la transmisión del ADNmt paterno. La herencia uniparental, documentada hasta ahora en algunos moluscos bivalvos (Breton *et al.*, 2007), no explicaría la presencia de heteroplasma tanto en hembras como en machos (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020), ya que en este modelo únicamente los machos son heteroplásmicos. La única explicación que no entra en conflicto con los resultados reportados hasta ahora y que, por tanto, podría ser la causa de la heteroplasma en esta especie, es la transmisión del ADNmt paterno debido a una eliminación incorrecta de este durante la fecundación (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020).

En su estudio sobre heteroplasma en *M. brachydactyla*, Rodríguez-Pena *et al.*, (2020) plantean una hipótesis para su origen por la cual, los mecanismos de eliminación de las mitocondrias paternas fallan debido a cruzamientos interespecíficos. Las poblaciones de

M. brachydactyla y *M. squinado* tienen una distribución geográfica por el noroeste Atlántico y Mediterráneo, respectivamente, y son muy similares tanto en la morfología como en la genética (Sotelo *et al.*, 2009). Al sur de la península ibérica, se ha demostrado que estas dos especies coexisten, por lo que podría ser una zona de hibridación (Abelló *et al.*, 2014). Este tipo de cruzamientos puede provocar fallos en los sistemas de eliminación de las mitocondrias paternas, tal y como se ha visto en otro estudio con moscas de la fruta (Polovina *et al.*, 2020).

De acuerdo con esta hipótesis, el punto de origen de la heteroplasma en *M. brachydactyla* sería la zona de hibridación entre esta especie y *M. squinado*. Por tanto, el sur de la península ibérica debería ser el punto con mayor incidencia de heteroplasma, generándose un gradiente a lo largo de la costa atlántica europea en el que la incidencia de heteroplasma disminuye hacia el norte. Para comprobar este gradiente es necesario comparar la incidencia de heteroplasma en, al menos, en tres regiones de la costa europea.

Como paso previo a realizar comparaciones entre resultados de diferentes autores, quisimos comprobar si el sexo de los individuos guardaba relación con la incidencia de heteroplasma. En el artículo publicado por Rodríguez-Pena *et al.*, (2020) en una población de *M. brachydactyla* de Galicia, los individuos de estudio eran tanto machos como hembras, a diferencia del presente trabajo en el que únicamente analizamos hembras. Para realizar una adecuada comparación entre los datos de ambos estudios, estudiamos la correlación entre la presencia de heteroplasma y el sexo mediante una prueba de independencia. Con un resultado de $\chi^2 = 2,80 < \chi^2_{0.95}(1) = 3,84$ se acepta la hipótesis de independencia y por lo tanto se asume que no existe una relación entre la presencia de heteroplasma y el sexo.

En una población de *M. brachydactyla* de Galicia, se detectó heteroplasma en 22 individuos de un total de 83 estudiados, obteniendo una proporción de individuos heteroplásmicos de 0,265. En un estudio realizado en una población de Rosslare se detectó heteroplasma únicamente en 1 individuo de un total de 61, obteniendo una proporción de 0,016 (Bárcena, 2017; comunicación personal). Estos datos respaldan la hipótesis mencionada con anterioridad al obtener una mayor proporción de individuos heteroplásmicos en una región más al sur, como es Galicia, que, en una región más al norte

norte, como es Rosslare. En el presente estudio, analizamos la proporción de individuos heteroplásmicos en una población de Francia que, de acuerdo con la hipótesis, debería obtener un valor superior al obtenido en Irlanda (0,016) e inferior al obtenido en Galicia (0,265). Sin embargo, se ha detectado heteroplasmia en 20 de los 38 individuos analizados, obteniendo una proporción de 0,52. Este valor supera al obtenido en la población de Galicia, indicando una mayor incidencia de heteroplasmia en una región más al norte. Sin embargo, puede estar relacionado con el número de posiciones heteroplásmicas analizadas en cada estudio, ya que en este trabajo analizamos tres posiciones más que en el de Galicia. Atendiendo únicamente las posiciones ambiguas que tienen en común ambos estudios, el número de individuos heteroplásmicos en la población de Francia, descendería a 11, obteniendo una proporción de 0,289. Este valor se aproxima más al obtenido para la población de Galicia. Sin embargo, sigue sin ser inferior. Por tanto, la hipótesis planteada por Rodríguez-Pena *et al.*, 2020 por la cual la heteroplasmia en *M. brachydactyla* podría originarse por hibridación con *M. squinado* al sur de la península ibérica, no se ajusta a los resultados obtenidos y se descarta.

Una explicación alternativa para el origen de este fenómeno podría ser que en esta especie de braquiuros no tenga lugar una eliminación completa de las mitocondrias de origen paterno en algunos casos, debido a un comportamiento anómalo de los sistemas de eliminación de estas (Toral, 2021). Sin embargo, esta hipótesis por sí sola no explicaría la gran diferencia en la proporción de heteroplasmia entre regiones del norte (Irlanda) y regiones del sur (Galicia) de la costa europea. Si este comportamiento anómalo de los sistemas de eliminación de las mitocondrias paternas ocurriese de forma azarosa, con un tamaño muestral que represente adecuadamente toda la población, se deberían obtener incidencias similares de heteroplasmia en cualquier región del noreste Atlántico ya que se trata de una especie panmíctica. Sin embargo, se ha visto una gran diferencia entre la incidencia en Irlanda y las regiones del sur. Esto sugiere que es posible que haya un factor que provoque el fallo de los mecanismos de eliminación de las mitocondrias paternas generando heteroplasmia que se transmite mediante un modelo de herencia mitocondrial materna.

Además, los resultados obtenidos por (Toral, 2021) no muestran evidencias de que no se esté dando una eliminación correcta de las mitocondrias paternas. Toral (2021) analizó la

heteroplasmia en el tejido muscular de progenitores y larvas de diferentes cruces de *M. brachydactyla*. Concluyó que algunos cruces muestran un comportamiento anómalo a la herencia mitocondrial materna, por encontrar secuencias diferentes en la descendencia y en la hembra de un mismo cruce. Sin embargo, estas diferencias pueden explicarse desde la herencia mitocondrial materna. Se ha visto que en esta especie pueden encontrarse diferentes secuencias mitocondriales en dos tejidos distintos de un mismo individuo (Rodríguez-Pena *et al.*, 2020). Por tanto, cabe la posibilidad de que, en estos cruces con resultado anómalo, la secuencia del COI sea diferente en el tejido muscular y gonadal de la hembra. Por tanto, no se puede descartar que esta especie siga un modelo de herencia mitocondrial materno, y por tanto, apoya la hipótesis mencionada anteriormente.

En consecuencia, la hipótesis que más se ajusta a los resultados obtenidos hasta ahora se basa en el comportamiento anómalo de los mecanismos de reconocimiento y eliminación de las mitocondrias paternas en esta especie de braquiuros. Sin embargo, la gran diferencia en la incidencia entre las regiones parece indicar que no se trata de un comportamiento azaroso, sino que hay un factor que lo provoca, originando así la heteroplasmia que se transmitiría por herencia mitocondrial materna.

Otras especies de braquiuros en las que también se han detectado posiciones ambiguas en las secuencias de ADNmt (Williams *et al.*, 2017; Sotelo *et al.*, 2009), podrían guardar cierta relación con *M. brachydactyla*. Cabe la posibilidad de que el factor que causa la transmisión del ADNmt paterno en esta especie, afecte del mismo modo a otras especies de braquiuros. Habría que realizar estudios con la progenie y la descendencia en estas especies para así, confirmar o descartar que se trate de transmisión del ADNmt paterno.

Para esclarecer el origen de este fenómeno en *M. brachydactyla*, debería estudiarse el tejido gonadal de los parentales de cruces intraespecíficos, esta sería la forma más rigurosa de comprobar el tipo de herencia mitocondrial que se da en esta especie. Además, sería conveniente repetir el análisis de heteroplasmia en las regiones de Irlanda y Galicia añadiendo las posiciones heteroplámicas que se detectan en este estudio. Por otro lado, analizar la región control del ADNmt podría aportar más información, ya que se trata de una región más variable.

6. CONCLUSIONES

- La hipótesis del origen de la heteroplasmia en *M. brachydactyla* que más se ajusta a los resultados reportados hasta ahora se basa en el comportamiento anómalo de los mecanismos de reconocimiento y eliminación de las mitocondrias paternas, generado por un factor desconocido.
- A pesar de ser una especie altamente explotada, la presión pesquera no parece disminuir el tamaño de la población ya que se ha observado una elevada diversidad genética posiblemente asociada a aspectos de su biología reproductiva y a la dispersión de las larvas.
- *M. brachydactyla* es una especie panmíctica que no muestra ninguna estructura aparente en la población del Atlántico norte, debido probablemente, a un alto flujo génico entre las diferentes regiones de su área de distribución, así como a la multipaternidad.

7. REFERENCIAS

- Abelló, P., Guerao, G., Salmerón, F. y Raso, J.E.G. 2014. "Maja brachydactyla (Brachyura: Majidae) in the western Mediterranean". *Marine Biodiversity Records*, vol. 7.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. "Basic local alignment search tool". *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410.
- Balss, H. y Michaelsen, W. 1922. "Crustacea VII: Decapoda Brachyura (Oxyrhyncha und Brachyrhyncha) und geographische Übersicht über Crustacea Decapoda". *Beiträge zur Kenntnis der Meeresfauna Westafrikas*, vol. 3, no. 3, pp. 69-110.
- Bárcena, C. 2017. *Análisis del tamaño efectivo de población de la centolla Maja brachydactyla Balss, 1922*. Trabajo de fin de máster. Universidad de la Coruña.
- Barr, C.M., Neiman, M. y Taylor, D.R. 2005. "Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals". *New Phytologist*, vol. 168, no. 1, pp. 39-50.

- Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B. & Stadler, P.F. 2013. "Genetic aspects of mitochondrial genome evolution". *Molecular phylogenetics and evolution*, vol. 69, no. 2, pp. 328-338.
- Breton, S. y Stewart, D.T. 2015. "Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes". *Genome*, vol. 58, no. 10, pp. 423-431.
- Breton, S., Beaupre, H.D., Stewart, D.T., Hoeh, W.R. y Blier, P.U. 2007. "The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?". *Trends in genetics*, vol. 23, no. 9, pp. 465-474.
- Consellería do Mar da Xunta de Galicia. Vendas nas Lonxas, Primeira venda de productos frescos, Informes Estadísticos. 2019 [citado el 21 de diciembre de 2021] En: Pesca de Galicia. Disponible en: <https://www.pescadegalicia.gal/estadisticas/>
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Fransen, C.H. y Goulding, L.Y. 2009. "A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans". *Raffles Bulletin of Zoology*.
- Edgar, R.C. 2004. "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 5, pp. 1792-1797.
- Freire, J. y García-Allut, A. 2000. "Socioeconomic and biological causes of management failures in European artisanal fisheries: the case of Galicia (NW Spain)". *Marine Policy*, vol. 24, no. 5, pp. 375-384.
- Freire, J., Bernárdez, C., Corgos, A., Fernández, L., González-Gurriarán, E., Sampedro, M.P. y Verísimo, P. 2002. "Management strategies for sustainable invertebrate fisheries in coastal ecosystems of Galicia (NW Spain)". *Aquatic Ecology*, vol. 36, no. 1, pp. 41-50.
- González-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J. y Muiño, 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*, vol. 220, no. 2, pp. 269-285.
- González-Gurriarán, E., Freire, J., Parapar, J., Sampedro, M.P. y 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*, vol. 189, no. 1-2, pp. 183-203.
- Guerao, G., Pastor, E., Martin, J., Andres, M., Estevez, A., Grau, A., Duran, J. y 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*, vol. 42, no. 33-34, pp. 2257-2276.
- Hall, T. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symp. Ser.*, pp. 95.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. y Gyllensten, U. 2000. "Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans". *Nature*, vol. 408, no. 6813, pp. 708-713.
- Koolkarnkhai, P., Intakham, C., Sangthong, P., Surat, W. y Wonnapijit, P. 2019. "Portunus pelagicus mtDNA heteroplasmy inheritance and its effect on the use of mtCR and mtCOI sequence data". *Mitochondrial DNA Part A*, vol. 30, no. 8, pp. 848-860.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. 2018. "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms". *Molecular biology and evolution*, vol. 35, no. 6, pp. 1547.
- Lee, J.T., Coleman, R.A. y Jones, M.B. 2006. "Population dynamics and growth of juveniles of the velvet swimming crab *Necora puber* (Decapoda: Portunidae)". *Marine Biology*, vol. 148, no. 3, pp. 609-619.
- Leigh, J.W. y Bryant, D. 2015. "POPART: full-feature software for haplotype network construction". *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 6, no. 9, pp. 1110-1116.
- Li, M., Schröder, R., Ni, S., Madea, B. y Stoneking, M. 2015. "Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 8, pp. 2491-2496.

- Lopez, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W. y O'Brien, S.J. 1994. "Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat". *Journal of Molecular Evolution*, vol. 39, no. 2, pp. 174-190.
- Mitrofanov, K., Karagodin, V., Khasanova, Z., Orekhova, N., Orekhov, A. y Sobenin, I. 2018. "A Method for Measuring the Heteroplasmy Level of Mitochondrial DNA Mutations". *Russian journal of genetics*, vol. 54, no. 1.
- 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*, vol. 32, no. 10-11, pp. 1667-1684.
- Ng, P.K., Guinot, D. y Davie, P.J. 2008. "Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world". *The raffles bulletin of zoology*, vol. 17, no. 1, pp. 1-286.
- Orensanz, J.M. y Jamieson, G.S. 1998. "The assessment and management of spatially structured stocks: an overview of the North Pacific Symposium on Invertebrate Stock Assessment and Management". *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, , pp. 441-459.
- Payne, B.A., Wilson, I.J., Yu-Wai-Man, P., Coxhead, J., Deehan, D., Horvath, R., Taylor, R.W., Samuels, D.C., Santibanez-Koref, M. & Chinnery, P.F. 2013. "Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA". *Human molecular genetics*, vol. 22, no. 2, pp. 384-390.
- Politi, Y., Gal, L., Kalifa, Y., Ravid, L., Elazar, Z. y Arama, E. 2014. "Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *Drosophila*". *Developmental cell*, vol. 29, no. 3, pp. 305-320.
- Polovina, E., Parakatselaki, M. y Ladoukakis, E.D. 2020. "Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in *Drosophila* hybrids". *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9.
- Radojičić, J.M., Krizmanić, I., Kasapidis, P. y Zouros, E. 2015. "Extensive mitochondrial heteroplasmy in hybrid water frog (*P. elophylax* spp.) populations from Southeast Europe". *Ecology and evolution*, vol. 5, no. 20, pp. 4529-4541.

- Rodríguez-Pena, E., Verísimo, P., Fernández, L., González-Tizón, A., Bárcena, C. y Martínez-Lage, A. 2020. "High incidence of heteroplasmy in the mtDNA of a natural population of the spider crab *Maja brachydactyla*". *Plos one*, vol. 15, no. 3, pp. e0230243.
- Rodríguez-Pena, E., Verísimo, P., Tully, O., Fernández, L. y Martínez-Lage, A. 2021. "Differences in prevalence of multiple paternity in the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in two localities that differ in female fecundity, fishing intensity, and management measures". *ICES Journal of Marine Science*, vol. 78, no. 5, pp. 1697-1710.
- Rokas, A., Ladoukakis, E. y Zouros, E. 2003. "Animal mitochondrial DNA recombination revisited". *Trends in Ecology y Evolution*, vol. 18, no. 8, pp. 411-417.
- Rotllant, G., González-Gurriarán, E., Fernández, L., Benhalima, K. y Ribes, E. 2007. "Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation". *Marine Biology*, vol. 152, no. 2, pp. 383-394.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. y Sánchez-Gracia, A. 2017. "DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets". *Molecular biology and evolution*, vol. 34, no. 12, pp. 3299-3302.
- Sampedro, M., González-Gurriarán, E. y Freire, J. 2003. "Moult 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*, vol. 83, no. 5, pp. 995-1005.
- Santibanez-Koref, M., Griffin, H., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., Herbert, M. y Hudson, G. 2019. "Assessing mitochondrial heteroplasmy using next generation sequencing: A note of caution". *Mitochondrion*, vol. 46, pp. 302-306.
- Sato, K. y Sato, M. 2017. "Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals". *The Journal of Biochemistry*, vol. 162, no. 4, pp. 247-253.
- Sharpley, M.S., Marciniak, C., Eckel-Mahan, K., McManus, M., Crimi, M., Waymire, K., Lin, C.S., Masubuchi, S., Friend, N. y Koike, M. 2012. "Heteroplasmy of mouse mtDNA is

genetically unstable and results in altered behavior and cognition". *Cell*, vol. 151, no. 2, pp. 333-343.

Sobрино, A. 2021. *Análisis de la transmisión mitocondrial en la centolla Maja brachydactyla*. Trabajo de fin de máster. Universidad de la Coruña.

Sotelo, G., Morán, P. y Posada, D. 2009. "Molecular phylogeny and biogeographic history of the European Maja spider crabs (Decapoda, Majidae)". *Molecular phylogenetics and evolution*, vol. 53, no. 1, pp. 314-319.

Sotelo, G., Morán, P., Fernández, L. y Posada, D. 2008. "Genetic variation of the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in the northeastern Atlantic". *Marine Ecology Progress Series*, vol. 362, pp. 211-223.

Sotelo, G., Posada, D. y Morán, P. 2009. "Low-mitochondrial diversity and lack of structure in the velvet swimming crab *Necora puber* along the Galician coast". *Marine Biology*, vol. 156, no. 5, pp. 1039-1048.

Tsaousis, A.D., Martin, D.P., Ladoukakis, E.D., Posada, D. y Zouros, E. 2005. "Widespread recombination in published animal mtDNA sequences". *Molecular biology and evolution*, vol. 22, no. 4, pp. 925-933.

Verísimo, P., Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., Freire, J., Muiño, R. y Fernández, L. 2011. "Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*". *ICES Journal of Marine Science*, vol. 68, no. 3, pp. 472-478.

Wang, M., Yan, C., Luo, A., Li, Y., Chesters, D., Qiao, H., Chen, J., Zhou, Q., Ma, K. y Bruelheide, H. 2021. "Phylogenetic relatedness, functional traits, and spatial scale determine herbivore co-occurrence in a subtropical forest". *Ecological Monographs*, pp. e01492.

White, D.J., Wolff, J.N., Pierson, M. & Gemmell, N.J. 2008. "Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance". *Molecular ecology*, vol. 17, no. 23, pp. 4925-4942.

Williams, E.P., Feng, X. y Place, A.R. 2017. "Extensive heteroplasmy and evidence for fragmentation in the *Callinectes sapidus* mitochondrial genome". *Journal of Shellfish Research*, vol. 36, no. 1, pp. 263-272.

- Wolff, J.N., White, D.J., Woodhams, M., White, H.E. & Gemmell, N.J. 2011. "The strength and timing of the mitochondrial bottleneck in salmon suggests a conserved mechanism in vertebrates". *PLoS One*, vol. 6, no. 5, pp. e20522.
- Xiang, H., Gao, J., Cai, D., Luo, Y., Yu, B., Liu, L., Liu, R., Zhou, H., Chen, X. y Dun, W. 2017. "Origin and dispersal of early domestic pigs in northern China". *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-9.
- Zouros, E. 2013. "Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA". *Evolutionary Biology*, vol. 40, no. 1, pp. 1-31.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C. y Freeman, K.R. 1994. "An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 16, pp. 7463-7467.