

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugarte z/g

E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Parque Tecnológico de Bizkaia

Astondo bidea - Edificio 609

E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaia - Portu aldea z/g

E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

www.azti.es

info@azti.es



Propuesta para mejoras de la gestión del stock de Caballa (*Scomber scombrus*) en el Cantábrico

Informe Final

para:

**EUSKO JAURLARITZA - GOBIERNO VASCO, Ekonomiaren Garapen eta
Lehiakortasun Saila - Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad,
Nekazaritzako, Arrantzako eta Elikagai Politikako Sailaburuordetza –
Viceconsejería de Agricultura, Pesca y Política Alimentaria**

Pasaia, 23 de julio de 2015

Tipo documento	Informe Final
Título documento	Propuesta para mejoras de la gestión del stock de Caballa (<i>Scomber scombrus</i>) en el Cantábrico
Fecha	21/07/2015
Proyecto	04-2012-00392- FEP-Propuesta para mejoras de la gestión del stock de Caballa (<i>Scomber scombrus</i>) en el Cantábrico
Código	IM12CABALL
Cliente	EUSKO JAURLARITZA - GOBIERNO VASCO, Ekonomiaren Garapen eta Lehiakortasun Saila - Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad, NekazaritzaKO, ArrantzaKO eta Elikagai Politikako Sailburuordetza - Viceconsejería de Agricultura, Pesca y Política Alimentaria
Equipo de proyecto	Paula Alvarez Naiara Rodriguez-Ezpeleta Unai Cotano Guillermo Boyra Andrés Uriarte Sonia Sanchez Naroa Aldanondo Iñaki Mendibil Iñigo Krug Eneko Bachiller Inmaculada Martin
Responsable proyecto	Alvarez Jorna, Paula

Revisado por Motos Izeta, Lorenzo

Fecha

Aprobado por Motos Izeta, Lorenzo

Fecha

Si procede, este documento deberá ser citado del siguiente modo:
Autores, Año. Título. Elaborado por AZTI-Tecnalia para Cliente X.

ÍNDICE

1. RESUMEN EJECUTIVO	6
2. ANTECEDENTES.....	7
3. OBJETIVOS	10
4. INTRODUCCIÓN.....	11
4.1 Estructura de la población de caballa.....	11
4.2 Cambios en la distribución de la población en el NEA: consecuencia en la gestión.....	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS	14
5.1 Diseño logístico para la obtención de muestras y análisis biológicos	14
5.2 Obtención de muestras y análisis biológico.....	16
5.3 Optimización del método de extracción de ADN y Descubrimiento de SNPs .	20
5.4 Descubrimiento de SNPs a partir de las muestras del estudio	25
5.4.1 Preparación del material genético	25
5.4.2 Preparación de las librerías para secuenciación masiva	26
5.5 Evaluación de la población residente en el Cantábrico y componente de auto-reclutamiento	27
5.6 Análisis químicos de los otolitos de caballa.....	28
5.6.1 Obtención de muestras	28
5.6.2 Análisis de isótopos estables de carbono y oxígeno.....	29
5.7 Dependencia económica de la caballa en el Cantábrico	31
5.8 La población de <i>Scomber colias</i> en el Cantábrico	33
6. RESULTADOS	33
6.1 Evaluación de las diferencias genéticas entre las poblaciones de caballa	33
6.1.1 Optimización del método de extracción de ADN.....	33
6.1.2 Optimización del método para el descubrimiento de SNPs	34
6.1.3 Descubrimiento de SNPs a partir de las muestras del estudio	35
6.1.3.1 Calidad de las lecturas	35
6.1.3.2 Descubrimiento de SNPs	36
6.1.3.3 Análisis de la estructura poblacional	38

6.2	Evaluación de la población residente en el Cantábrico y componente de auto-reclutamiento.....	43
6.3	Determinación de los orígenes de nacimiento de los individuos de la población mediante el análisis químico de los otolitos	50
6.3.1	Resultados	50
6.3.1.1	Caracterización de las diferentes zonas de puesta de los individuos juveniles mediante el análisis químico de los otolitos	50
6.3.2	Discusion.....	57
6.4	Actualización de la situación de la gestión de la población de caballa en aguas europeas intra y extra comunitarias.....	59
6.4.1	<i>Asesoramiento ICES y gestión internacional aplicable al 2013.....</i>	59
6.4.2	<i>Estimación de la biomasa de la campaña internacional de huevos de caballa y jurel</i>	60
6.4.3	<i>Evaluación del stock.....</i>	62
6.5	Análisis socio-económico de las capturas de caballa por la flota del Cantábrico.	63
6.5.1	<i>Composición de las capturas por CCAA</i>	63
6.5.2	<i>Dependencia económica de la caballa.....</i>	65
7.	CONCLUSIONES.....	67
	BIBLIOGRAFÍA	70
	AGRADECIMIENTOS	73

1. RESUMEN EJECUTIVO

Ante la solicitud del sector de aumentar la cuota de caballa y así atender a una mayor demanda generada de este producto, desde AZTI se propuso un estudio científico para rediseñar los componentes de puesta de esta población como la vía más factible para defender esta solicitud frente a los foros internacionales. Así surgió el proyecto caballa que se puede definir como un estudio holístico con una fuerte base genética sobre la que pivotaba toda la investigación realizada. Esta incluye un estudio de acústica para estimar la población residente en el Golfo de Vizcaya (GV), estudio de la composición química del otolito para determinar orígenes de nacimiento de juveniles de caballa y de apoyo a los resultados de genética, un estudio de la importancia económica de esta especie para el sector de cantábrico, un estudio sobre la población de *Scomber colias* en el área del cantábrico como especie afín a caballa y finalmente una recopilación y análisis de la gestión de esta población en el marco europeo (ICES). Los estudios de genética se basan en la identificación de SNPs mediante el método RAD-seq, que consiste en secuenciar un porcentaje pequeño del genoma distribuido en regiones homólogas en un gran número de individuos de la misma especie con el fin de buscar polimorfismos de nucleótido único (SNPs–Single Nucleotide Polymorphism). Existen varios pasos críticos de los que dependía el éxito de la búsqueda y genotipado de SNPs: i) la calidad del ADN, ii) el enzima de restricción utilizado, iii) el grado de fragmentación mecánica y tamaño de los fragmentos seleccionados y iv) el número de ciclos de PCR realizados. Durante la primera fase del proyecto se procedió a buscar las condiciones ideales de cada uno de estos pasos en un número reducido de muestras para después aplicarlos a la totalidad de las muestras. Una vez puesto a punto el método (DNA mínimo 30ng/ul) se diseñó un muestreo de ejemplares adultos en puesta, de huevos y larvas por todo el área de distribución de los componentes sur y oeste. Para garantizar la alta calidad del DNA, el muestreo de adultos se basó tanto en muestras recogidas por otros institutos europeos bajo condiciones muy estrictas de toma y mantenimiento de muestras (muerte rápida y congelación inmediata) o mediante campañas oceanográficas específicas para este trabajo en el que se incluían también muestreo de plancton (huevos y larvas de caballa). En este último caso se utilizaron 3 barcos oceanográficos en el que participó personal de AZTI (R/V Altair de Escocia, R/V Walther Herwig III, de Alemania y R/V Angeles de Alvarinho, campaña organizada por AZTI) y 2 más que colaboraron en la recolección de muestras, el R/V Miguel Oliver de España y el R/V Magnus Heinason de Islas Feroes. Para completar el estudio poblacional de la especie se consiguieron muestras de fuera de aguas de NEA como Canadá y Mediterráneo. Se obtuvieron un total de 605 ejemplares de caballa con DNA de alta calidad, 403 del NEA, 105 del Mediterráneo y 50 de Canadá. Del DNA extraído de los ejemplares se seleccionaron 212 para crear 96 librerías. Se seleccionaron las regiones comunes a las 8 poblaciones y que estuviesen presentes en al menos 75% de los individuos analizados. Esto dio lugar a un total de unas 30.000 regiones que contenían en total unos 300.000 SNPs. De esos SNPs, se seleccionaron aquellos que tenían un MAF (frecuencia alélica mínima) mayor al 0,05. Esta selección redujo el número de SNPs a unos 30.000. Por razones computacionales se redujo este número eligiendo al azar 2.000 de ellos. Se realizó un análisis de la estructura poblacional mediante el programa STRUCTURE. El análisis mostró una clara diferenciación de las muestras del Mediterráneo y de las del Atlántico, donde, a su vez, se intuye una diferenciación entre las muestras de Canadá y el resto. Como una razón para la ausencia de separación de las muestras de caballa dentro del NEA podría ser el alto grado migratorio de los adultos (muy mezclados en todo el área a pesar de pudiesen ser distintos) se optó por incluir en el estudio las larvas de caballa obtenidas en las campañas. Estas larvas de pocos días de vida, prácticamente han nacido en el mismo lugar de donde se recogieron, por lo que se evitaría mezcla de poblaciones. Tras confirmar la posibilidad de utilizar este material genético para su análisis (calidad de las muestras y cantidad de DNA suficiente para el estudio) se procedió al análisis de larvas procedentes del componente Sur u oeste de puesta. Finalmente la conclusión que se obtuvo de los análisis basados en 5000 SNPs es:

- 1) **No hay diferenciación genética** significativa entre los individuos de las componentes Sur y Oeste del Nordeste Atlántico. “Los análisis realizados con las muestras estudiadas indican que no existe un comportamiento de homing en las componentes Sur y Oeste”.
- 2) Existe diferenciación genética entre las poblaciones de caballa de Canadá, NEA y Mediterráneo. “El método es capaz de distinguir poblaciones genéticamente (incluso a menor escala dentro del Mediterráneo). Por primera vez se muestra aislamiento genético entre el Mediterráneo y el NEA”.

Los análisis de **composición química del otolito confirman los resultados obtenidos con el estudio genético**, ya que aunque se han detectado ciertas diferencias en la concentración de los isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) entre individuos de los componentes, la variabilidad entre las componentes es tan grande que no permite establecer una visión clara en las componentes de puesta de esta población.

La población de caballa se gestiona como un único stock separado en tres componentes de puesta, Sur, Oeste y Norte, los cuales no pueden ser separados genéticamente (al menos el Oeste y el Sur). Existe

una población de caballa residente en el GV que va aumentando progresivamente en relación a los 4 años estudiados. La población se basa en individuos juveniles de 1 y 2 años y algunos adultos principalmente distribuidos al norte del área de estudio.

Actualmente las capturas de caballas son muy superiores a los TAC recomendados por el grupo de trabajo de evaluación (WGWIDE) y no hay expectativas de que esto cambie..

El modelo de gestión para la evaluación de caballa genera escenarios a corto plazo no realistas y se alude a la falta de información de las capturas declaradas durante años como causantes de estos errores del modelo. En consecuencia, se rechazó la evaluación en el año 2013.

2. ANTECEDENTES

En el Cantábrico el stock de caballa es explotado por tres modalidades de pesca: arrastre, cerco y artesanal. Históricamente, las flotas de líneas de mano y artesanales producían más de un tercio de las capturas anuales de caballa. El resto de las capturas correspondían a los cerqueros (que se dedican a esta pesquería hasta comienzos de la costera de la anchoa) y la flota de arrastre de litoral y de altura. La importancia de las capturas producidas por las flotas de arrastre ha ido creciendo paulatinamente durante estos últimos años. De hecho, desde el año 2003, las capturas declaradas por la flota de arrastre representan entre el 30 al 69% del total de capturas (Fuente Secretaria de Pesca; informe de reparto de caballa).

Las mayores capturas de caballa se producen entre el primero y segundo trimestre del año. Las capturas de la primera mitad del año alcanzan así el 87% de la captura anual y se producen en el Cantábrico a base de adultos reproductores; mientras que, las de la segunda mitad del año (13%) se producen sobre todo en la fachada atlántica de la península a base fundamentalmente de juveniles. La fuerte estacionalidad de estas capturas se debe a que la pesquería Española explota la caballa mayoritariamente durante el paso de su migración reproductora frente a nuestras costas. Esta migración tiene lugar a comienzos de primavera.

A lo largo de los años, las capturas de caballa de la flota española han ido aumentando progresivamente, llegando a un máximo de 114.074 toneladas en el año 2009 (Datos ICES). Teniendo en cuenta que la cuota media de capturas para España estaba entorno a los 24.500 toneladas, Europa aplicó una medida sancionadora al Gobierno Español por los excesos de captura.

Estos hechos coincidieron en el tiempo con un desplazamiento de la población de caballa hacia el Noroeste Atlántico. Esto hizo que la población de caballa se encontrase en agua que en tiempos pasadas no solía encontrarse. En consecuencia, las flotas de Islandia e Islas Feroes, que habitualmente no explotaban esta especie, comenzaron a pescar grandes cantidades de caballa. El máximo de sus capturas fue de 280.000 toneladas en el año 2011 (datos ICES). Aunque éstas bajaron levemente en el año 2102, en la actualidad siguen siendo muy elevadas (256.500 toneladas).

La relativa pequeña cuota española junto con la sanción que impuso Europa al Gobierno Español resulto en una reducción drástica de las capturas de caballa para la flota del Cantábrico. Desde el sector se argumentaba que era difícil mantener esta pesquería con los niveles de cuotas tan bajos.

La gestión de la población de caballa se ha complicado enormemente desde la aparición de nuevos países que capturas grandes cantidades del stock. La petición de un aumento de cuota por parte del Gobierno Español en este escenario es "irreal". Desde la Secretaria de Pesca se vio la necesidad de buscar alguna vía que permitiese poder presentar alternativas de gestión de este recurso en el marco Europeo y que pudiesen beneficiar a la flota del Cantábrico.

Teniendo en cuenta los conocimientos sobre la biología, comportamiento migratorio y algunos estudios sobre la estructura poblacional de esta especie, AZTI-Tecnalia propuso profundizar en la investigación de la estructura de la población como vía para determinar si el comportamiento de retorno o "homing behavior" observado en los individuos adultos podría estar asociada a una diferenciación genética claramente trazable en cada uno de los individuos pertenecientes a cada componente. Si esta hipótesis se confirmase se podrían sentar las bases para una propuesta de "una gestión independiente de la población de caballa que desova en aguas del Cantábrico".

El presente informe describe las tareas realizadas a lo largo del presente proyecto. Aunque la base del estudio está determinada por el análisis genético poblacional el proyecto pretende dar una visión holística sobre el conocimiento de la estructura poblacional de esta especie y su gestión en el ámbito de la Unión Europea. Por ello, se incorporan también diferentes análisis alternativos que apoyan los resultados obtenidos mediante los análisis genéticos. Cabe destacar que algunos de los objetivos finales del

proyecto como son el análisis químico de los otolitos y el análisis poblacional basado en larvas quedan pendientes de completar a la espera de que los resultados estén disponibles. Además, se presenta una actualización de la situación del stock y su gestión. Este estudio va a ofrecer una visión global de la situación tan cambiante de esta población que tanto interés tiene para la flota española como del resto de Europa. La versión final de este informe será enviado durante el último trimestre de 2014.

3. OBJETIVOS

Los objetivos globales del proyecto son determinar la estructura poblacional de la caballa (*Scomber scombrus L.*) del Noreste Atlántico (NEA), testar el comportamiento de retorno de la especie a las áreas de puesta (el denominado “homing behavior”) en aguas del Noreste Europeo y definir un panel de marcadores genéticos que indiquen el origen de una determinada muestra.

Los objetivos parciales son:

1. Establecer las diferencias genéticas entre las poblaciones de caballa. Para ello, se requiere:
 - a. Diseñar, organizar y ejecutar campañas oceanográficas específicas para la recolección de muestras de caballa (huevos, larvas y adultos) durante su periodo de puesta en aguas del Noreste Atlántico.
 - b. Optimizar el método de extracción de DNA de alta calidad para el descubrimiento de SNPs mediante el método RAD-seq.
 - c. Optimizar el método de construcción de librerías de RAD-seq y del análisis bioinformático para la búsqueda de SNPs.
2. Evaluar la población de caballa residente en el Cantábrico y el componente de auto-reclutamiento mediante análisis acústicos.
3. Determinar los orígenes de nacimiento de los individuos adultos de la población mediante el análisis químico de los otolitos.
4. Actualizar la situación de la gestión de la población de caballa en aguas europeas tanto intra- como extra- comunitarias.
5. Analizar la situación socio-económica de las capturas de caballa por la flota del Cantábrico.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Estructura de la población de caballa

El conocimiento de la estructura de la población de una especie de peces explotada es clave para entender la biología de la población de base y una condición necesaria para la prestación de asesoramiento eficaz para su gestión pesquera. La caballa, como especie altamente migratoria, presenta un definido ciclo migratorio ligado, en gran parte, a su periodo de reproducción. Es conocido que, hacia finales de enero, la caballa que permanece en aguas al norte de Escocia y Noruega comienza su migración hacia el sur para el desove. Una parte de esta población (15-20%) desova en aguas de la península ibérica (el llamado componente Sur de desove) y el resto en aguas que se extienden desde Francia a Escocia (el llamado componente Oeste de desove). Tras la puesta, las caballas migran al norte (divisiones ICES IVa y VIIa) y permanecen allí alimentándose durante parte del verano y otoño hasta que comienzan de nuevo su migración de puesta hacia el sur en enero.

La estructura de la población de caballa ha sido objeto de repetidos estudios científicos en los últimos años. En relación a las primeras técnicas usadas para la identificación de los stocks de caballa hay que citar los análisis genéticos de muestras de la población (Texeira & Jamieson, 1985), las marcas biológicas (como la infección de parásitos) (Mackenzie & Mehl, 1984; Eltink, 1988; Mackenzie, 1990; Abaunza et al., 1995) y el análisis del primer anillo de crecimiento en los otolitos (Dawson, 1986, 1991). Sin embargo, ninguno de estos métodos aportó evidencias definitivas debido, en gran parte, a que los estudios incluían caballas mezcladas de los diferentes componentes.

Otros estudios que utilizaban correctamente individuos en puesta no encontraron diferencias ni en los ectoparásitos (Somdal & Schram, 1992), ni en los fenotipos de la sangre. Posteriormente, estudios de distribución y abundancia de huevos y experimentos de marcado-recaptura cuestionaron los límites de los stocks previamente establecidos y mostraron la conveniencia de considerar la caballa como un único stock (Reid, 1997; Uriarte & Lucio, 2001; Uriarte et al., 2001). En 1995 se acordó combinar los stocks del Norte, Oeste y Sur en un único stock de caballa del Noreste Atlántico con varios componentes de puesta (mar del Norte, Oeste y Sur) (ICES, 1996).

Sin embargo, estos componentes de puesta de la caballa no son totalmente independientes entre sí, sino que existen, en cierta medida, intercambios reproductivos. La aplicación de aproximaciones genéticas más recientes no han obtenido resultados muy concluyentes; mientras que, el ADN mitocondrial de pocos peces en puesta no se han agrupado en las clases esperadas, los análisis estadístico de las mismas frecuencias alélicas han separado las tres muestras del oeste de las del resto de muestras, proporcionando así un débil apoyo para la diferenciación genética (Nesbo et al., 2000). Sin embargo, estas diferencias no se han observado entre cardúmenes de individuos fuera de la época de puesta.

Para la determinación del grado de mezcla entre los distintos componentes de puesta se realizaron diferentes estudios de marcado-recaptura para el componente del Oeste y del mar del Norte y mar de Noruega (Bakken & Westgard, 1986; Iversen & Skagen, 1989). Por otro lado, un estudio reciente de Jansen et al. (2013) ha analizado el primer anillo de crecimiento en los otolitos de individuos adultos de caballa y ha desvelado una segregación norte/sur ligada a la migración por la puesta. Sin embargo, a día de hoy, aún no se ha determinado el grado de mezcla en el componente Sur.

4.2 Cambios en la distribución de la población en el NEA: consecuencia en la gestión

En los últimos años, la gestión de las pesquerías de caballa del Noreste Atlántico ha sido polémica debido, en parte, a los desacuerdos sobre supuestos cambios en la distribución y migración de la caballa.

Antes del año 2006, la caballa rara vez era capturada en la zona al oeste de 8° W y al norte de 62° N (es decir, alrededor de Islandia). Sin embargo, a partir del 2007, se han capturado cantidades significativas de caballa en esta zona durante el periodo de alimentación, especialmente en el tercer cuatrimestre del año.

Del 2001 al 2007, los Totales Admisibles de Capturas (TACs) acordados internacionalmente cubrían la mayor parte del área de distribución de la población de caballa del Noreste Atlántico. Este TAC consta de dos componentes: uno para el área Norte (flotas que pescan en las áreas del ICES IIa, IIIabd, IV, Vb, VI, VI, VIIIabde, XII y

XIV) y otra para el Sur (flotas que pescan en las divisiones VIIIc y IXa). La propuesta del TAC se realiza en función de las capturas de los tres años anteriores en cada área.

En Octubre del 2008, se aprobó entre la Unión Europea (UE), Noruega y las Islas Faroes un plan de gestión a largo plazo para la caballa del Atlántico. Sin embargo, este no fue acordado por todas las partes involucradas en la pesquería. Desde 2009 no ha habido ningún TAC acordado por todas las partes. La ausencia de claros acuerdos internacionales sobre la explotación de la población (entre todas las naciones involucradas en la pesca) es una causa de constante preocupación e impide el control de la tasa de explotación del stock.

En esta situación de falta de acuerdos entre las partes, las capturas de caballa han aumentado progresivamente tanto por los países del norte (Islandia e Islas Faroes), como por el sur (España) (Figura 1). Como consecuencia de la pérdida del control de la explotación del stock las capturas incontroladas de caballa han continuado hasta la actualidad por las flotas de Islandia e Islas Faroes (países costeros no pertenecientes a la Union Europea), pero no así por España. A partir del año 2009, la Unión Europea exigió al gobierno de España un control exhaustivo de las capturas de esta especie por las flotas del Cantábrico y un ajuste de las capturas a la cuota que le corresponden (22.096 toneladas para el año 2013). Además de ello, se le impuso una sanción por sobrepesca que debe de ir pagando año a año, reduciéndose de su cuota un valor determinado hasta devolver dos veces la sobrepesca ocurrida en años anteriores.

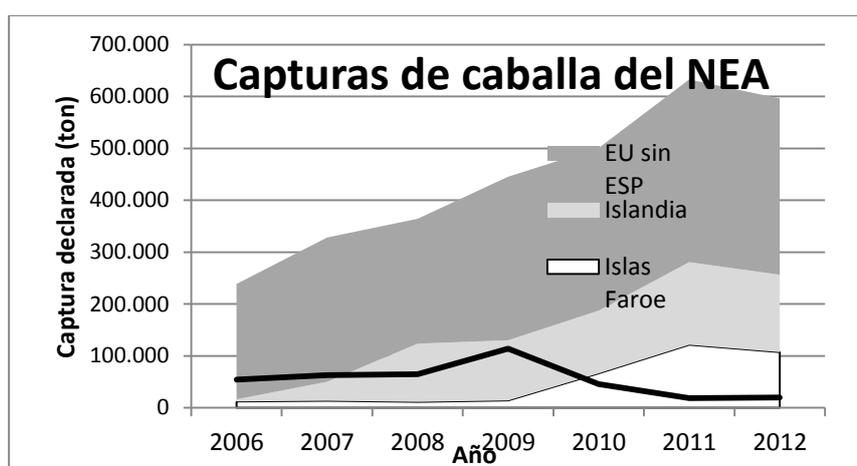


Figura 1: Evolución de las capturas declaradas de caballa por la Unión Europea (sin España), Islandia, Islas Faroes y España.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño logístico para la obtención de muestras y análisis biológicos

A lo largo del año 2013, coincidiendo con la ejecución de las campañas internacionales de evaluación de caballa y jurel que se desarrollan en el marco de ICES/CIEM, se diseñó un muestreo para la captura de huevos, larvas y adultos de caballa en todo el área del Noreste Atlántico.

En el diseño se tuvo en cuenta los conocimientos de la biología de la especie y su comportamiento migratorio. El objetivo fue elegir el periodo en el que la disgregación de los dos componentes de puesta (Sur y Oeste) fuese máxima, ya que esto aseguraría que los individuos capturados en cada uno de las áreas “pertenciese efectivamente a ese componente de puesta”. De los resultados obtenidos en la última campaña de evaluación (Trienal 2010) se estimó el periodo de máxima abundancia de huevos. El periodo de muestreo resultó ser marzo-abril, donde se concentró el 60% de la producción de huevos de caballa en el año 2010.

De acuerdo al plan de campaña acordado en el grupo de trabajo MEGS (ICES, 2012) se planificaron cuatro campañas en el periodo seleccionado: tres en el componente de puesta del Oeste (Alemania, Escocia y España/AZTI) y una en el componente Sur (España/IEO). En la Tabla 1 se presenta el diseño de campaña establecido para la consecución de las muestras de adultos destinadas a los análisis de genética y los análisis químicos de los otolitos. El objetivo teórico de muestras a conseguir eran de 300 individuos del componente Oeste de puesta y 200 del componente Sur.

Se estableció un protocolo de muestreo a bordo. Con el objetivo de conseguir la mayor calidad del DNA de los ejemplares el muestreo de adultos, el muestreo se realizó lo más rápidamente posible una vez que la red de pesca llegaba a cubierta. De cada lance se registrará la posición y se realizó un muestreo biológico de todos los individuos recolectados. Dicho muestreo biológico consistió en tallar las caballas, sexarlas,

asignarles el estado de madurez sexual de acuerdo a la escala de Walsh y extraerles los otolitos.

Tabla 1: Diseño espacial teórico para la recolección de ejemplares adultos de caballa durante las campañas trienales 2013.

AREA	Componente de puesta	País/Barco	MACHOS		HEMBRAS		Total
			Número (estado madurez)	Número (estado madurez)	Número (estado madurez)	Número (estado madurez)	
Cantábrico	SUR	España (IEO) B/Angeles Alvariño	50 Madurez (2,3,5,6)	50 Madurez (4)	50 Madurez (2,3,5,6)	50 Madurez (4)	200
Golfo de Vizcaya	OESTE	España (AZTI) B/Angeles Alvariño	25 Madurez (2,3,5,6)	25 Madurez (4)	25 Madurez (2,3,5,6)	25 Madurez (4)	100
Mar Céltico		Alemania / Walther Herwig III	12 Madurez (2,3,5,6)	12 Madurez (4)	12 Madurez (2,3,5,6)	12 Madurez (4)	50
Banco de Porcupine		Alemania / Walther Herwig III	12 Madurez (2,3,5,6)	12 Madurez (4)	12 Madurez (2,3,5,6)	12 Madurez (4)	50
Noroeste de Escocia		Escocia/Altaire	25 Madurez (2,3,5,6)	25 Madurez (4)	25 Madurez (2,3,5,6)	25 Madurez (4)	100
500 caballas							

Para el estudio genético se siguió el siguiente protocolo específico:

1. Levantar la piel de un trozo de unos 5 x 5 cm con la ayuda de un bisturí y pinzas.
2. Con ayuda de unas pinzas y un bisturí (o tijeras, según se prefiera), cortar tres trozos de 0,5/1 centímetro cúbico (más o menos) e introducirlos en el tubo con etanol. *Nota: Es importante que haya tres trozos pequeños y no uno grande ya que se busca que el etanol penetre bien en el tejido.*
3. Limpiar las pinzas, el bisturí y las tijeras enjuagándolos en etanol.
4. Tachar la casilla correspondiente en la tabla diseñada para ello.

Además de las muestras de adultos, se recogieron muestras de huevos y larvas de caballa repartidas por toda el área de estudio. Para su recolección se utilizaron redes de

plancton standards GULF VII en el barco escoces, NACKTHAI en el barco Alemán y redes BONGO 40 en los barcos de España (AZTI e IEO). El objetivo global era conseguir entre 5 y 10 muestras de plancton por campaña.

De cada uno de los puntos de muestreo de plancton se registró la posición y la fecha/hora. Las muestras se guardaron en etanol al 96% en sus correspondientes botes previamente numerado.

5.2 Obtención de muestras y análisis biológico

De las cuatro campañas seleccionadas “a priori” para la recolección de muestras en dos de ellas se embarcó personal científico de AZTI. Las campañas fueron las lideradas por Alemania (jefe de campaña Jens Ulleweit) y Escocia (jefe de campaña Finlay Burns). La tercera campaña la realizó AZTI y la última, la liderada por el IEO (jefe de campaña Pablo Carrera), fue el equipo de dicho instituto quien realizó la campaña, previo envío del material necesario y de los protocolos de trabajo.

Finalmente, se decidió incluir ejemplares de la campana liderada por las Islas Faroes dado el escaso resultado obtenido en la campaña alemana. A pesar de los importantes problemas con el muestreo en dicha campaña, se consiguió un 81% del objetivo inicial. Además, se incluyeron muestras de Galicia (componente Sur) recogidas en 2012. La Tabla 2 resume las muestras conseguidas en cada una de las campañas.

La primera campaña Trienal en el componente Oeste de puesta fue realizada por Escocia en un área que abarcaba desde el noroeste de Irlanda al oeste de Escocia, con una duración de 13 días (14 al 27 de marzo). Debido a las malas condiciones de la mar, el número de lances de adultos se redujo a un mínimo de tres, de los cuales uno fue negativo. En estos dos lances se consiguió completar el muestreo de caballa previamente diseñado.

En esta misma campaña también se consiguió una muestra con unos 1.000 huevos, de los cuales un alto porcentaje era de caballa. Aunque, inicialmente se pensaba tener más

muestras de plancton, las condiciones atmosféricas redujeron considerablemente el objetivo inicial.

Tabla 2: Resumen de la distribución de los ejemplares de caballa muestreados durante las campañas trienales de caballa y jurel del 2013.

País/ área	Compon. de puesta	Barco/Fechas	MACHOS Número (estado madurez)		HEMBRAS Número (estado madurez)		TOTAL
España/ (IEO) Cantábrico	SUR	B/Miguel Olivar 7-29 Marzo	41 Madurez (2,3,5,6)	29 Madurez (4)	80 Madurez (2,3,5,6)	17 Madurez (4)	167
España/ (AZTI) Golfo de Vizcaya	OESTE	B/Angeles Alvariño 22 Maz-6 Abril	24 Madurez (2,3,5,6)	26 Madurez (4)	25 Madurez (2,3,5,6)	25 Madurez (4)	100
Alemania/ Mar Céltico Oeste Irlanda		Walther Herwig III 27 Marz-22 Abril	4 Madurez (2,3,5,6)	2 Madurez (4)	2 Madurez (2,3,5,6)	3 Madurez (4)	11
Escocia/ Oeste Irlanda Noroeste Escocia		Altaire 14-27 Marzo	26 Madurez (2,3,5,6)	26 Madurez (4)	23 Madurez (2,3,5,6)	30 Madurez (4)	105
Islas Faroe/ Faore y Shetland		Magnus Heinason 23 May-2Junio	8 Madurez (2,3,5,6)	0 Madurez (4)	10 Madurez (2,3,5,6)	2 Madurez (4)	20
403 caballas							

La campaña en el barco alemana se realizó entre el oeste de Irlanda y el mar Céltico con una duración de 25 días (del 27 de marzo al 22 de abril). Durante esta campaña fueron especialmente destacables las malas condiciones climáticas que redujeron drásticamente el plan de campaña. De las 100 muestras de adultos planificadas sólo se consiguieron 11, aunque, afortunadamente, se pudo completar una buena cobertura de las muestras de plancton.

La campaña realizada por AZTI (del 22 de marzo al 6 de abril) fue un éxito en la consecución de las muestras (adultos y plancton), completándose el objetivo inicial de 100 adultos y 6 muestras de plancton.

En el componente Sur de puesta, la campaña liderada por el IEO logró completar 167 de las 200 muestras de individuos adultos que se solicitaron. Asimismo, se obtuvo una buena cobertura de las muestras de plancton.

La Figura 2 muestra la distribución espacial de las muestras obtenidas en las campañas del 2013.

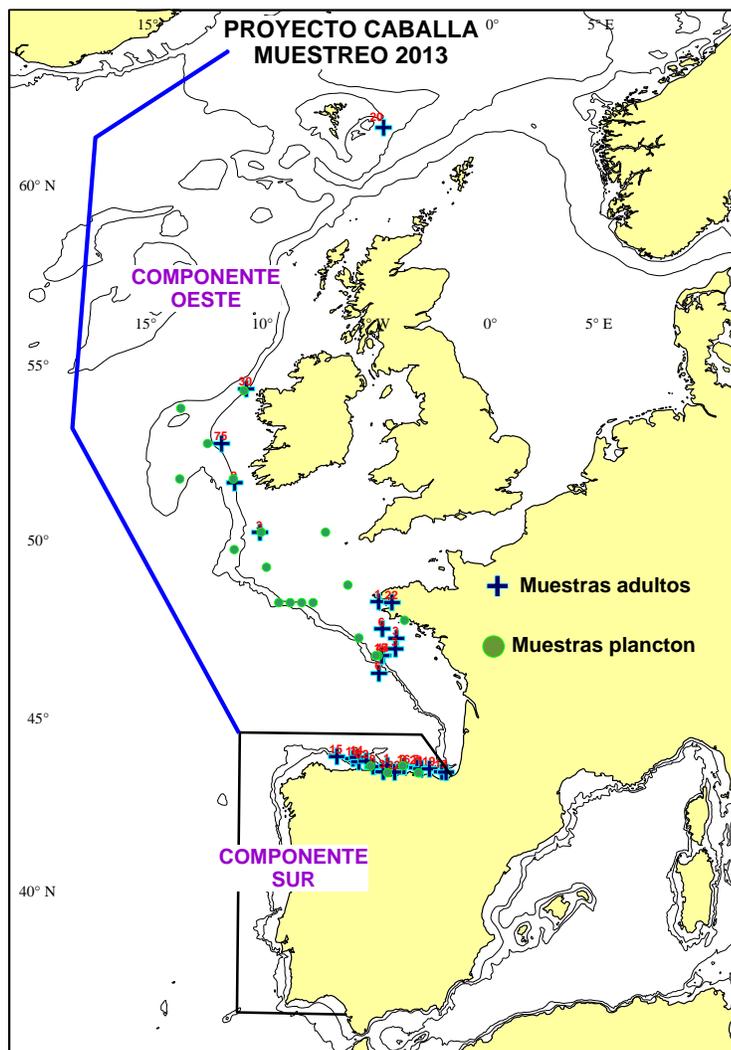


Figura 2: Mapa de la distribución espacial de las muestras de adultos (cruces) y plancton (círculos) obtenidas durante las campañas Trienales de caballa y jurel en el año 2013. Al lado de cada cruz se indica el número de individuos muestreados en cada punto.

La distribución de tallas de las muestras recogidas se presenta en la Figura 3. Como se puede observar, el rango de tallas de los individuos del componente Oeste fue de 15,2 cm, desde 26,5 cm la caballa más pequeña hasta 41,7 cm las más grande. La talla media fue de 33,8 cm y la moda de 34,5 cm.

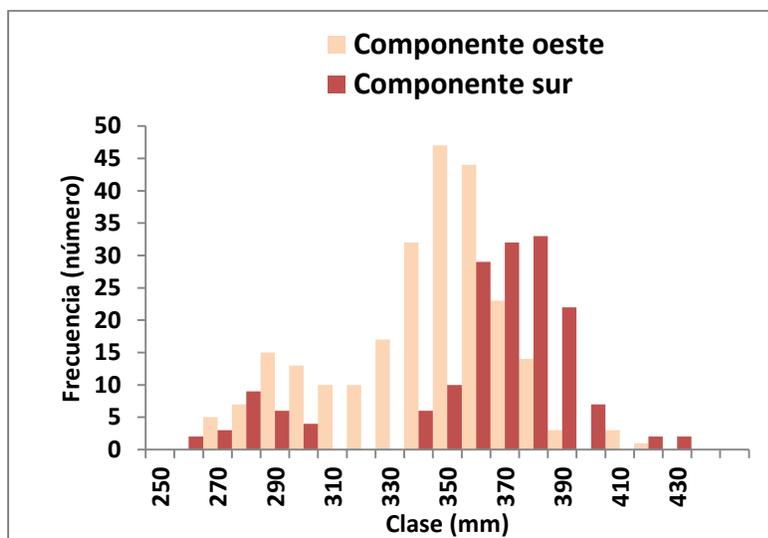


Figura 3: Histograma de distribución de tallas (mm) de las caballas recogidas durante las campañas tanto en el componente Sur (marrón oscuro) como en el Oeste (marrón claro).

Las caballas muestreadas en el componente Sur presentaba un rango de tallas de 17,3 cm, con una media de 34,6 cm, ligeramente mayor a la del componente Oeste, y una moda de 34,8 cm.

Todos los individuos muestreados fueron sexualmente maduros y, de ellos, el 46% del componente Oeste y el 27% del componente Sur fueron catalogados como “en puesta”.

5.3 Optimización del método de extracción de ADN y Descubrimiento de SNPs

El descubrimiento de SNPs en caballa se llevó a cabo mediante el método RAD-seq, que consiste en secuenciar un porcentaje pequeño del genoma distribuido en regiones homólogas en un gran número de individuos de la misma especie con el fin de buscar polimorfismos de nucleótido único (SNPs–Single Nucleotide Polimorphism). El protocolo consistió en i) extracción de ADN genómico de una muestra de tejido, ii) digestión del ADN mediante un enzima de restricción y ligación de adaptadores complementarios, iii) fragmentación mecánica y selección de los fragmentos de una talla determinada, iv) ligación de adaptadores con cebadores específicos a los fragmentos seleccionados y amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) v) secuenciación mediante tecnologías de secuenciación masiva. La principal ventaja del método reside en su eficacia, pues se pueden descubrir a la vez que genotipar miles de SNPs en cientos de individuos a un precio y una rapidez sin precedentes.

Existen varios pasos críticos de los que dependerá el éxito de la búsqueda y genotipado de SNPs: i) la calidad del ADN, ii) el enzima de restricción utilizado, iii) el grado de fragmentación mecánica y tamaño de los fragmentos seleccionados y iv) el número de ciclos de PCR realizados. Durante la primera fase del proyecto se procedió a buscar las condiciones ideales de cada uno de estos pasos en un número reducido de muestras para después aplicarlos a la totalidad de las muestras.

El método de optimización de extracción de ADN se testó con anchoa debido a que se pudieron mantener vivos los individuos. Para ello, se utilizaron dos tipos de tejido (músculo y aleta) en 4 periodos de tiempo desde que la anchoa muere (0 h, 2 h, 24 h, 5 días) y 4 métodos de conservación del tejido (congelado a -20° C, en etanol al 96% y congelado a -20° C, en etanol al 96% y conservado a temperatura ambiente, en RNAlater y conservado a temperatura ambiente). Las anchoas a muestrear al de 2 h, 24 h o 5 días muertas se conservaron en el frigorífico desde su muerte hasta la toma de la muestra. El etanol de las muestras almacenadas en este fijador se cambió al de 24 h para asegurarse de que la concentración era superior al 95%. De cada una de las combinaciones de condiciones, se hicieron 6 replicas, lo cual dio un total de 196 muestras a analizar.

Una vez tomada la muestra, está se conservó según las condiciones arriba mencionadas y se dejó pasar un mes hasta la extracción de ADN. Las extracciones de ADN se hicieron con el kit Wizard Promega Genomic DNA Extraction Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se midió en en Nanodrop para ver cantidad y pureza y migrado en un gel de agarosa para comprobar su integridad.

Por otro lado, para determinar el grado de corte de la enzima elegida (SbfI) y las condiciones de fragmentación mecánica se hizo una prueba piloto con dos muestras.

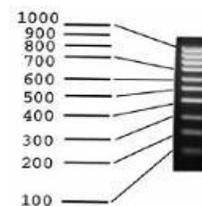
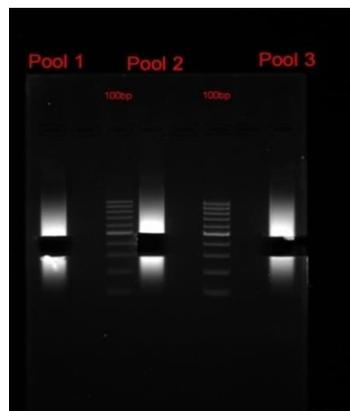
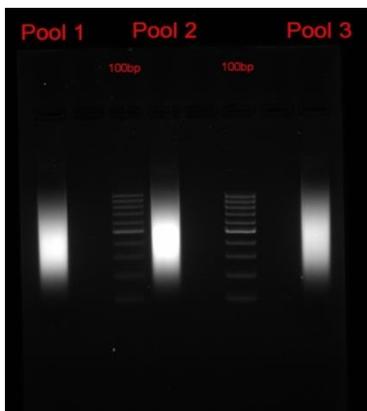
Digestión: Se digirieron 500 ng (17 μ L) de DNA íntegro con 1 μ l de la enzima de restricción (10 U/ μ l) y 2 μ l de buffer (10X) a 37° C durante 2 h. Esta enzima corta a lo largo de todo el genoma la secuencia TGCA, rompiendo el DNA por las mismas zonas en todas las muestras de manera selectiva. Una vez digerido el DNA, la enzima de restricción se inactiva a 80° C durante 20 minutos. Para comprobar que la digestión fue efectiva, se migraron en un gel de agarosa al 0.7-1% la misma cantidad de DNA de una misma muestra antes y después de la digestión.

Ligación: Se ligó el ADN fragmentado mediante la enzima de restricción al adaptador P1 incubándolos con la T4 DNA ligasa durante 16 h a 22° C. El adaptador P1, que se preparó previamente, está formado por 2 cebadores complementarios compatibles con la tecnología de secuenciación (Illumina). Este adaptador puede contener una etiqueta para cada muestra que consiste en una combinación de 5 bases diferentes en cada caso. De esta manera, podemos juntar varias muestras (POOL) y así reducir el número de reacciones, pudiendo diferenciar las muestras durante el proceso de secuenciación. El POOL de muestras se genera mezclando el mismo volumen de cada una de las muestras en estudio. Para reducir el volumen total, se purificó el POOL con el kit "Qiaquick PCR purification".

Fragmentación y selección de tamaño: El POOL se fragmentó en el Covaris M220. Primero se transfirió al tubo "screw cap microtube", el cual se introdujo en el soporte para muestras en un tanque de agua a 5-6° C. Se le aplicó un programa cuya función es cortar el ADN en fragmentos de unos 500 pares de base de media. Después de fragmentar, se redujo el volumen de las muestras para poder migrarlas en un gel de agarosa en una sola

calle y así, minimizar la pérdida de material en la extracción de bandas de agarosa. Para ello, se utilizó el kit de purificación Ampure XP que consiste en unas partículas magnéticas (beads) que atrapan el DNA. Se mezclaron 50 μ l de muestra con 50 μ l de Ampure XP, se pipeteó 10 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se colocaron los tubos en un rack magnético y se dejó que se pegasen los beads al magnético, se eliminase el sobrenadante y se lavasen los beads con 200 μ l de etanol 70%, se dejó reposar 30 segundos y se desechó el líquido. Se repitió este lavado otra vez y se dejó secar los beads 10-15 minutos al aire sin quitar los tubos del rack magnético.

Para finalizar con la purificación, se disolvieron los beads fuera del magnético en 17,5 μ l de agua y se pipeteo hasta conseguir un líquido homogéneo, se dejó incubar 3 minutos a temperatura ambiente y se volvieron a colocar en el magnético. El líquido sobrenadante contenía el DNA, por lo que se recuperó y se mezcló con 3 μ l de Buffer de carga. La mezcla se migró en un gel de 1,5% agarosa, TBE 0.5% a 65-70 V durante una hora. Para poder seleccionar el tamaño, se cargó en el gel un patrón de DNA conocido y mediante una cuchilla se cortó una banda del tamaño 300-500 pares de bases (Figura 4). Se purificó la banda siguiendo las instrucciones del kit “QiaQuick Gel extraction”, disolviendo la agarosa a temperatura ambiente, ya que al calentar la agarosa se produce un aumento de roturas en las zonas ricas en AT. Finalmente, se disolvieron las muestras en 20 μ l de H₂O para continuar con el siguiente paso.



Marcador 100bp

Figura 4: Izquierda, ADN fragmentado de tres pools migrados en gel de agarosa. Centro, sección de gel de agarosa correspondiente a los fragmentos de ADN de 300 a 500 pares de bases cortado. Derecha, tamaño de cada banda del patrón de ADN utilizado.

Pasos previos a la amplificación de la librería por PCR: El ADN correspondiente a la fracción de tamaño seleccionada se reparó incubándolo con la enzima “end repair” a 20° C durante 20 minutos. Este proceso consistió en convertir los extremos cohesivos resultantes de la fragmentación en extremos romos fosforilados en 5'. Al ADN reparado y fosforilado se le añadió una A en el extremo 3' mediante incubación con la enzima Klenow Exo a 37° C durante 30 minutos. Este paso facilitó la ligación del adaptador P2, que contiene una T sobresaliente complementaria a la A del ADN de interés. El adaptador P2 se ligó incubándolo junto con el ADN y la T4 DNA ligasa a 22° C durante 16 h. La muestra se purificó siguiendo las instrucciones del kit “Ampure XP”, eluyendo las muestras en 32 µl de EB.

Amplificación de la librería por PCR: Para enriquecer el número de copias de la librería se amplificó por medio de una Polymerasa de Alta Fidelidad que tiene una baja tasa de error en la replicación y unos primers universales específicos y complementarios a los adaptadores ya ligados. Para la prueba piloto se realizaron PCRs con 18 y 30 ciclos a fin de tener suficiente material, aunque es conocido que la PCR final debe realizarse con pocos ciclos (12-14). Para la PCR de la prueba piloto se añadieron 8 µl de H₂O, 10 µl de Phusion HF Master Mix (2X), 1 µl de RAD amplification Primer Mix (10 µM) y 10 µl de ADN.

El resultado de la PCR (Figura 5) mostró que había amplificación, confirmando que los pasos anteriores funcionaron. Además, se vio un número mayor de fragmentos de tamaño equivalente al seleccionado (300-500), lo que mostraba que tanto la fragmentación como la selección de tamaños se realizaron con éxito. Al haberse realizado una PCR con muchos ciclos (18 y 30) se vio que se habían producido dímeros de primers, lo cual se sabe afecta a las etapas posteriores. Para evitar su presencia en la secuenciación, se procedió a extraer del gel el tamaño de ADN deseado al igual que en la Figura 4. Una vez

realizado este paso, se procedió a medir el tamaño y la cantidad del ADN en el bioanalyzer (Figura 6). Los resultados mostraron que el tamaño fue correcto, que los dímeros desaparecieron y que la concentración obtenida era suficiente para continuar con la secuenciación.

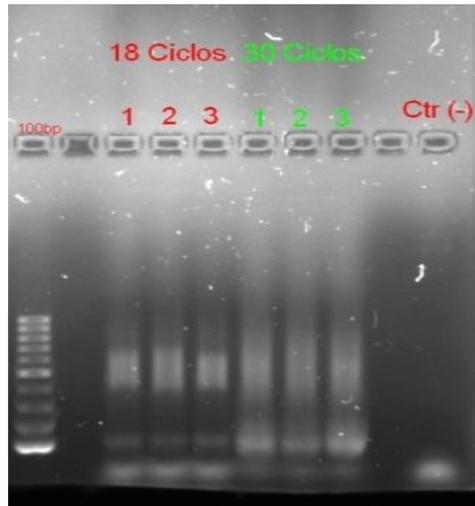


Figura 5: Gel de agarosa mostrando los productos obtenidos durante las PCRs de 18 y 30 ciclos.

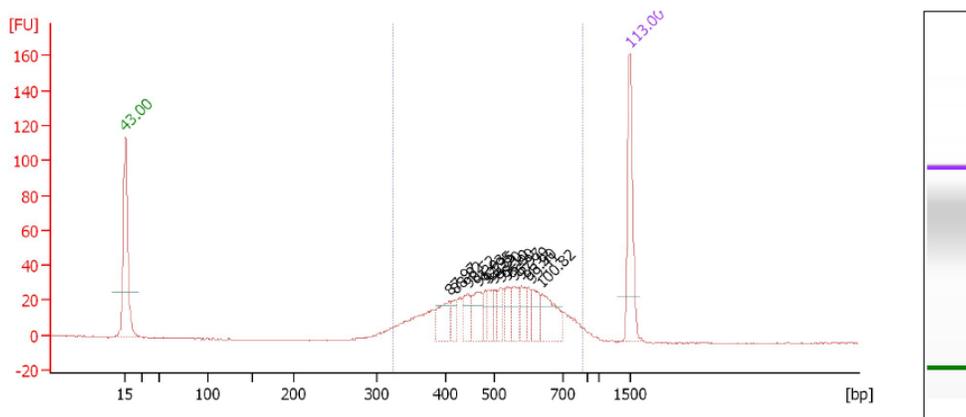


Figura 6: Imagen del bioanalyzer mostrando el producto de PCR purificado.

5.4 Descubrimiento de SNPs a partir de las muestras del estudio

5.4.1 Preparación del material genético

En total, se extrajo ADN de unas 300 muestras de caballa provenientes de las campañas de 2012 y 2013 y de institutos colaboradores. La cantidad y calidad del ADN extraído del 90% de ellas estaba en los rangos necesarios para la realización de los subsecuentes experimentos. De entre ellas, se seleccionaron algunas por población, de manera que se cubrieron las regiones geográficas a estudiar. En total, se analizaron 26 muestras del componente Este, 30 muestras del componente Sur, 30 muestras del Mediterráneo y 10 muestras de Canadá (Tabla 3). En base a los resultados de la prueba piloto, se seleccionaron aquellas muestras de las que se obtuvo una concentración mínima de ADN de 30 ng/ul.

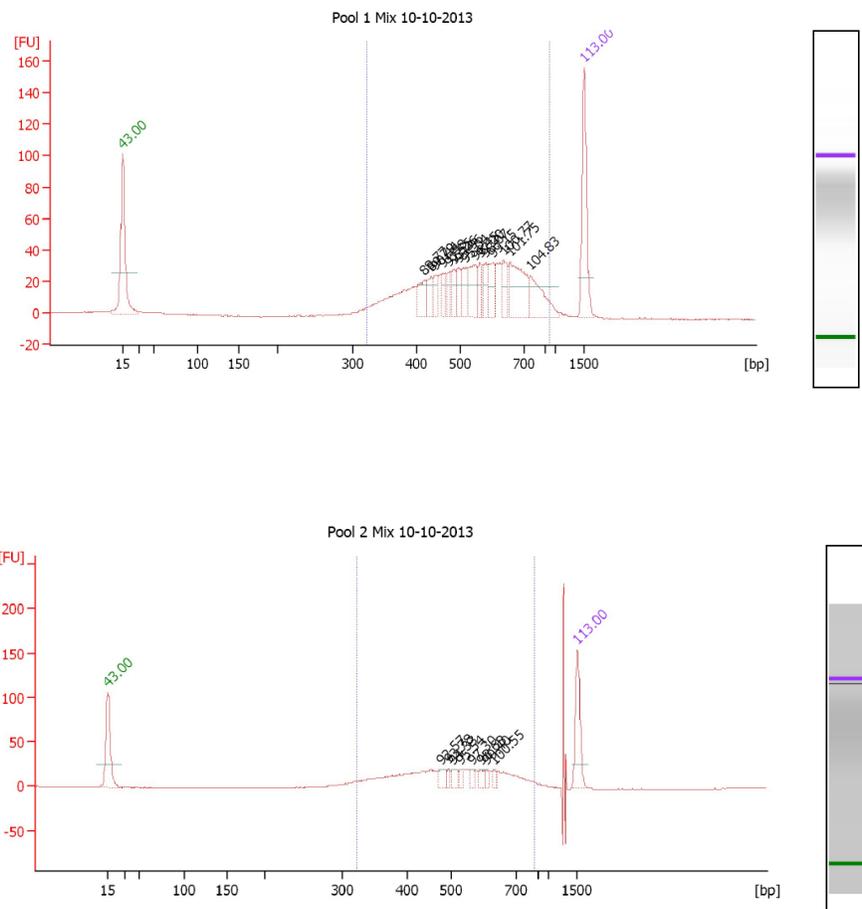
Tabla 3: Número de muestras recogidas, extracciones de DNA realizadas y librerías de secuenciación preparadas.

	Muestras	Extracción de DNA realizada	Librería construída
TORREVIEJA	36	20	10
ITALIA ADRIÁTICO	31	31	10
ITALIA OESTE	38	20	10
GALICIA	72	26	10
COSTA CANTÁBRICA	167	28	20
CANTÁBRICO (No costa)	100	32	12
ALEMANIA	11	4	3
ESCOCIA	100	28	11
CANADA	50	23	10

TOTAL	605	212	96
--------------	------------	------------	-----------

5.4.2 Preparación de las librerías para secuenciación masiva

Se prepararon 96 muestras que se procesaron en bloques de 32. Siguiendo el protocolo validado mediante la prueba piloto, se prepararon tres librerías (POOLS) para su posterior secuenciación. En este caso, la última PCR se realizó con 14 ciclos para reducir el número de duplicados. Los resultados de los gels de agarosa y bioanalyzer mostraron que las librerías eran de calidad (Figura 7).



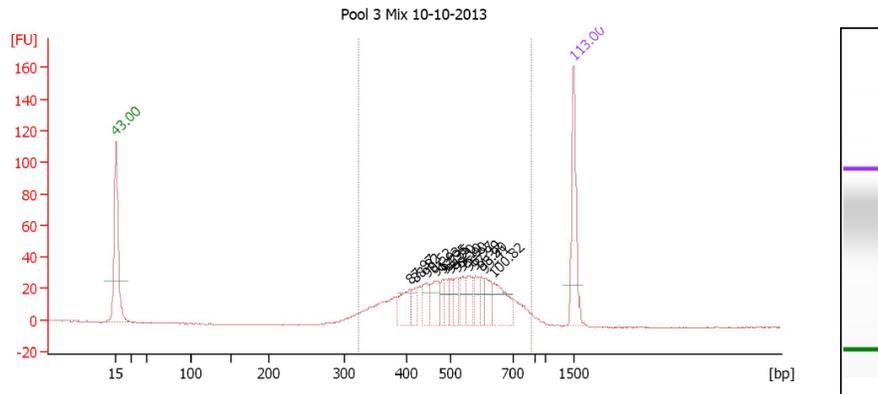


Figura 7: Control de calidad de las librerías. Imagen del bioanalyzer de los tres pools enviados a secuenciar.

5.5 Evaluación de la población residente en el Cántabro y componente de auto-reclutamiento

Se unificaron los valores de estimación de *Scomber scombrus* mediante acústica de la campaña JUVENA de los años 2010 a 2013. Asimismo, se estudió la evolución de capturas de la misma campaña durante el periodo 2003 a 2010.

Las estimas de abundancia se obtuvieron al aplicar el método de ecointegración para múltiples especies en las zonas positivas de anchoa. Este es el método que se usa para obtener las estimas de biomasa de anchoa juvenil en dicha campaña. No se aplicó ningún procedimiento especial para separar las detecciones acústicas de caballa (acústica multifrecuencia, por ejemplo). Por lo tanto, las estimas obtenidas hay que tomarlas con precaución, debido a la baja respuesta acústica de esta especie, que puede introducir error en los valores obtenidos (por la posibilidad de atribuirle erróneamente energía acústica de otras especies).

Para separar juveniles de adultos de caballa se realizó una división grosera basada en la talla media de la pesca. Así, las pescas con talla media mayor que 24 cm se atribuyeron a adultos y con talla media menor que 24 cm se atribuyeron a juveniles.

5.6 Análisis químicos de los otolitos de caballa

El análisis químico de los otolitos es una herramienta muy potente que permite conocer diferentes patrones de movimiento individuales así como discriminar entre peces que han habitado diferentes masas de agua. Este hecho se debe a que la deposición de diversos elementos químicos en los otolitos está influenciada por las variaciones en las condiciones ambientales.

A medida que el otolito crece, diversos elementos menores y traza se van incorporando en su matriz calcárea, principalmente influenciado por las condiciones ambientales (Campana, 1999; Fowler et al., 2005). En el caso de los isótopos estables, la concentración de los isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) en los otolitos varía en función de la salinidad y la temperatura del agua (Rooker et al., 2008; Schloesser et al., 2010). En este sentido, diversos trabajos han demostrado la utilidad de esta técnica en estudios de comportamiento de retorno de diferentes especies de tónidos (Rooker et al., 2008; Schloesser et al., 2010). Por otro lado, también existe una relación entre la concentración de diferentes elementos traza como el estroncio, bario o magnesio y la composición de agua. En el caso del estroncio, se ha demostrado que existe una relación positiva entre la concentración de estroncio en el otolito y la salinidad de agua (Secor et al., 1995; Milton & Chenery, 2003). De esta forma, se pueden conocer movimientos entre diferentes masas de agua midiendo la concentración de estroncio a lo largo del otolito.

5.6.1 Obtención de muestras

Inicialmente, se recopilaron los datos disponibles de las diferentes campañas realizadas y se analizó la distribución de talla de los individuos. Los otolitos extraídos durante el muestreo de caballa fueron cuidadosamente lavados y guardados para su posterior análisis químico.

En el laboratorio, se examinaron los otolitos para evaluar su estado y estimar la edad y la fecha de nacimiento de las caballas. Para la selección de las muestras se tuvo en cuenta que ambos otolitos sagita (el izquierdo y el derecho) estuviesen en perfecto estado. Por ello, aquellos otolitos que estaban rotos o que presentaban alguna anomalía o descalcificación fueron eliminados del estudio. En la Tabla 1 se resumen los datos de las muestras analizadas. Cabe destacar que los otolitos de las muestras de adultos del componente Sur (área VIIIc) no estuvieron disponibles en el 2013, por lo que se tuvo que realizar un nuevo muestreo en dicha zona en el año 2014. Asimismo, se obtuvieron

nuevas muestras del componente Oeste (área VIIe) en el 2014. Estas muestras fueron también incluidas en los análisis.

Como una primera aproximación, dentro de cada componente, se diferenciaron diferentes zonas de puesta dependiendo de la procedencia de las muestras. Dentro del componente Sur se diferenciaron las zonas de Portugal, Galicia, Asturias y Costa Vasca; y, dentro del componente Oeste, las áreas ICES VIIIb, VIIIa (Sur y Norte), VIIe y IVa. Debido a que todas las muestras no procedían del mismo año, cuando fue posible, se analizaron muestras de diferentes años para estudiar la variabilidad interanual de la composición de los isótopos estables.

Tabla 1: Detalle de las muestras de juveniles seleccionadas para el análisis químico de los otolitos.

Componente	Area	Procedencia	Edad	Talla media (mm)	Peso medio (g)	nº muestras
Sur	IXa	Portugal	0	192.5	48.5	25
Sur	VIIIc	Galicia	1	252.5	123.8	25
Sur	VIIIc	Asturias	1	252.8	120.3	25
Sur	VIIIc	Costa Vasca	1	221.7	78.9	32
Oeste	VIIIb	ICES-8b	0/1	123.7	14.7	25
Oeste	VIIIa	ICES-8a-Sur	1	278.9	159.9	25
Oeste	VIIIa	ICES-8a-Norte	0	134.1	15.9	25
Oeste	VIIe	ICES-7e	0/1/2	190.2	47.1	75
Oeste	IVa	ICES-4a	2	234.9	114.8	21

5.6.2 *Análisis de isótopos estables de carbono y oxígeno*

Para realizar las mediciones de las concentraciones de los isótopos estables de carbono y oxígeno es necesario obtener una muestra pulverizada a partir del otolito (la cantidad mínima necesaria es de 250 µg por muestra). En el caso de los juveniles, se pulverizó el otolito entero manualmente con la ayuda de un mortero. Posteriormente, las muestras se guardaron en tubos de 2 ml para su posterior análisis químico.

Los isótopos de carbono y oxígeno se analizaron mediante un espectrómetro de masas (Finnigan MAT 252) acoplado a un dispositivo automatizado (automated carbonate preparation device KIEL-

III). Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Isótopos Ambientales de la Universidad de Arizona (USA). En total se analizaron 278 muestras de juveniles de caballa: 107 muestras correspondientes al componente Sur y 171 muestras correspondientes al componente Oeste.

5.7 Dependencia económica de la caballa en el Cantábrico

Un indicador que explique la dependencia que una flota tiene de una especie se puede estimar teniendo en cuenta muchos parámetros como puede ser ingresos, empleo, alternativas de pesca, etc. En el presente informe se ha optado, dado los datos disponibles, por medir la dependencia a través de un indicador simple y objetivo: el valor de los desembarcos de caballa sobre el valor del total de los desembarcos. Se optó por este indicador simple porque se puede estimar de forma homogénea para todas las flotas, y así poder comparar la dependencia entre flotas. Este indicador económico se estimó para las flotas de la cornisa cantábrica: Galicia, Asturias, Cantabria y País Vasco.

Es importante tener una serie histórica de la dependencia de la caballa, dado que en los últimos años han existido restricciones en esta pesquería. Las flotas que capturan caballa en la cornisa cantábrica han sufrido una penalización debido a la sobrepesca de una cuota de caballa determinada practicada en 2009 (Reglamento de ejecución (UE) nº185/2013), por lo que se han deducido determinadas cuotas de pesca asignadas a España. Por lo que, debido a esta penalización, los indicadores económicos de dependencia del verdel pueden ser menores de lo que hubiesen sido si pescasen su cuota íntegra, ya que el tiempo que ya no dedican a la caballa pueden dedicarlo a otras especies que, en caso de poder capturar caballa, no las hubiesen capturado. Sin embargo, los datos disponibles son los del año 2012, por lo que hay que considerar que la dependencia puede llegar a ser mayor de la estimada en caso de no haber existido la multa o las restricciones y fuertes controles que en el año 2012 tuvieron lugar.

Para la realización del estudio de dependencia de la caballa se han utilizado los datos suministrados por el MAGRAMA. En esta fuente de datos se ha observado una discrepancia entre el total de peso capturado y vendido, que se explica porque existen líneas de capturas a las que no se les ha podido asignar notas de venta (para realizar el cruce y poder asignar la zona se ha partido de los buques y días, pero podrían existir notas de venta de esos buques en otros días). Por lo tanto, a la hora de depurar y homogeneizar los datos se han seguido los siguientes pasos:

- Se han eliminado los valores negativos de las descargas y precios y outliers.
- Las descargas que se han utilizado no son las de las notas de venta, ya que éstas no coincidían con las descargas. Se van a utilizar las descargas, ya que tenemos éstas para todos los registros.
- Se asigna el precio medio de las capturas de las notas de ventas a las capturas realizadas. Este valor medio se estima utilizando los siguientes criterios: especie, fecha de captura, puerto base y código buque. En el caso de no poder estimar el precio medio para todos estos criterios, se han rebajando criterios hasta llegar a precio medio por especie.

5.8 La población de *Scomber colias* en el Cantábrico

El *Scomber colias*, cuyo nombre común es estornino, macarela o begiandi (en euskera), es una especie del mismo género que la caballa pero con una distribución ligada a aguas de temperatura más cálidas. Por ello, en la zona del Noreste atlántico la presencia de esta especie se circunscribe en aguas al sur del Golfo de Vizcaya. Esta especie no está sujeta a medidas de gestión, si bien sus capturas en el mar cantábrico han ido en aumento a lo largo de los años.

Se ha realizado una revisión bibliográfica de la especie con la información obtenida en otras partes del mundo en las que su presencia e importancia económica es alta. Finalmente con los datos extraídos del grupo de trabajo del ICES (WGWIDE) y la base de datos de AZTI, se ha realizado un estudio de la situación de esta pesquería en el área VIIIc.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de las diferencias genéticas entre las poblaciones de caballa

6.1.1 Optimización del método de extracción de ADN

Se estudió el efecto del tipo de tejido, tiempo y condiciones de almacenamiento y tiempo post-mortem en la integridad del ADN. De los cuatro factores evaluados, el tiempo post-mortem fue el que más drásticamente afectó a la integridad del ADN, obteniéndose del tejido muestreado después de 24 h un ADN parcial o totalmente degradado. Los resultados preliminares de este apartado se han publicado en la Revista de Investigación Marina de AZTI (http://www.azti.es/rim/wp-content/uploads/2013/06/RIM20_6.pdf) y han

servido como base para determinar las condiciones de muestreo y almacenamiento para las muestras de este proyecto.

6.1.2 Optimización del método para el descubrimiento de SNPs

Los resultados del análisis de los datos de secuenciación obtenidos con las librerías preparadas fueron positivos. No obstante, se constató que la cantidad de ADN de partida juega un factor importante en la calidad de los resultados. La muestra con menos ADN de partida, aunque normalizada su concentración a la segunda muestra, resultó en un número menor de secuencias (Tabla 6). Por otro lado, se constató un gran porcentaje de secuencias repetidas (88 y 91% respectivamente) debido a la sobre amplificación de la PCR. Esto era esperado debido al alto número de ciclos de la PCR realizados durante la prueba piloto y se espera que se reduzcan al reducirse el número de ciclos en el estudio definitivo. En ambos casos, el número de “tags”, secuencias en las que se buscarán los SNPs (marcadores genéticos de polimorfismo único), es suficiente, aunque la cobertura (una vez eliminados las duplicaciones) es insuficiente (se considera que debe ser superior a 30).

Tabla 6: Estadísticas de la prueba piloto. El número de secuencias indica el número de moléculas de ADN secuenciadas. El número de tags indica el número de secuencias únicas repetidas un mínimo de 3 veces encontradas. La cobertura indica el número medio de veces que se ha secuenciado cada secuencia marcador.

	Cantidad de DNA (ng/ul)	Número de secuencias	Número “tags”	Coertura sin eliminar duplicados	Cobertura eliminando duplicados
Muestra1	114	566516	32412	160	17
Muestra 2	18	306940	14455	128	21

6.1.3 *Descubrimiento de SNPs a partir de las muestras del estudio*

6.1.3.1 *Calidad de las lecturas*

Se realizó un análisis preliminar para determinar la calidad de la secuenciación, el potencial de los datos obtenidos y si era necesario procesar más muestras. Se obtuvo una media de casi 5 millones de secuencias por muestra siendo el menor número de secuencias obtenidas 188.526 y el mayor de más de 26 millones de lecturas. Esta variabilidad se considera normal y es debida a la variabilidad en la calidad del ADN de las muestras y a la preparación de las librerías. Para cada una de las muestras, se realizó un control de calidad y se eliminaron las secuencias que i) no pasaban el control de calidad, es decir, que la llamada de las bases tenía una puntuación media menor de 20 y ii) no tenían el sitio de corte de la enzima de restricción. El número total de lecturas retenido fue siempre mayor al 85%. El número de lecturas que no se corresponden con duplicados debidos a la PCR fue también alto, siendo mayor del 75% y llegando al 90% en algunos casos. Esto implica que la disminución de ciclos de la PCR tuvo el resultado esperado (notar que en la prueba piloto el número de lecturas que no se correspondían a clones era menor al 20%).

Desglosados por población, el número medio de lecturas obtenidas así como el número de ellas retenidas después de los controles de calidad y de eliminar los clones debidos a la PCR se muestran en la Figura 9. En todos los casos, el número de lecturas utilizables en pasos posteriores fue alto y estuvo dentro de los rangos esperados según los resultados de la prueba piloto.

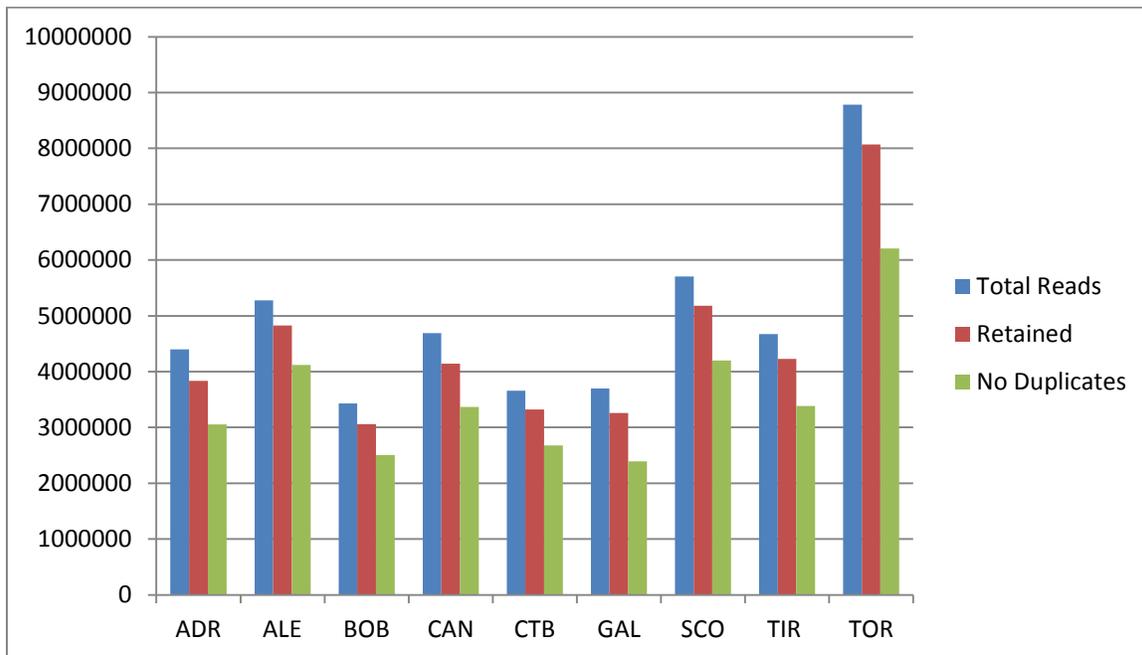


Figura 9: Número de secuencias totales (Total Reads) de secuencias retenidas después de pasar los filtros de calidad (Retained) y de secuencias que no se corresponden con duplicados (No Duplicates) para cada una de las poblaciones estudiadas (ADR: Adriático, ALE: Alemania, BOB: Golfo de Bizkaia, CAN: Canadá, CTB: Costa cantábrica, GAL: Galicia, SCO: Escocia, TIR: Tirreno, TOR: Torre Vieja).

6.1.3.2 Descubrimiento de SNPs

Para el descubrimiento de SNPs se utilizó el software STACKS (<http://creskolab.uoregon.edu/stacks/>). Tal y como se recomienda en el manual y en las diferentes publicaciones asociadas, se probaron diferentes parámetros para la búsqueda de SNPs informativos. Por el momento, se han obtenido una media de 60.000 regiones genómicas con SNPs potenciales. De esos SNPs es necesario seleccionar aquellos que son informativos para un análisis de la estructura poblacional.

Es necesario encontrar la combinación de parámetros adecuada para cada caso de estudio teniendo en cuenta tamaño poblacional, divergencia entre poblaciones, presencia de parálogos debidos a duplicaciones recientes del genoma, etc. Los parámetros más importantes a tener en cuenta durante la primera etapa del proceso en la que se analizó

cada individuo por separado fueron: m (cobertura mínima requerida para cada región identificada), M (distancia entre secuencias de un mismo individuo) y max-locus-stacks (número máximo de alelos por región).

Se comprobó el efecto de estos y otros parámetros en el número de lecturas retenidas, las coberturas medias y máximas de cada región, el número de regiones eliminadas, el número de regiones obtenidas y, de estas, el número de ellas que eran polimórficas y finalmente, en el número de alelos y SNPs. Se pudo observar (Tabla 7) que, en general, las diferentes combinaciones de parámetros no tuvieron efectos mayores en los resultados obtenidos. Una vez analizado cada individuo, se procedió a combinar los datos obtenidos en un catálogo común. Para ello, existe un parámetro importante n, que indica el número máximo de diferencias entre regiones para considerarlas una. De los diferentes valores de n testados, sólo uno, el valor 0, resultó en un número de regiones significativamente mayor (Tabla 8), lo cual era lo esperado, ya que se buscaban regiones polimórficas, las cuales son imposibles con n 0. De los demás valores de n testados (2, 4 y 6) cualquiera sería válido al no presentar entre ellos diferencias significativas.

Tabla 7: Media de entre todos los individuos analizados del número de lecturas retenidas (Retained reads), coberturas medias (CoverageMean) y máximas (CoverageMax) de cada región, el número de regiones eliminadas (RemovedStacks), el número de regiones obtenidas (Tags) y de estas, el número de ellas que son polimórficas (PoITags), número de alelos (Alleles) y SNPs (SNPs) para cada una de las combinaciones de parámetros testados.

USTACKS	M	m	max-loc-stacks	allow calling from sec reads (H)	SNP model	N	Retained reads	CoverageMean	CoverageMax	RemovedStacks	Tags	PoITags	Alleles	SNPs
	default	4	3	3	ON	snp	M+2	0.970832	35.56	9987	347.8636	55658	10259	22030
default-bounded	4	3	3	ON	bounded	M+2	0.970832	35.56	9987	347.8636	55658	10259	22030	16600
M6m10mIs2	6	10	2	ON	snp	M+2	0.946043	39.86	9877	411.5909	47231	9456	20404	17193
M6m10mIs2H	6	10	2	OFF	snp	M+2	0.946276	40.47	10285	459.2386	46546	9695	18325	20845
M6m10mIs2N0	6	10	2	OFF	bounded	0	0.886134	39.86	9877	231.25	47231	7800	16284	14160
M6m10mIs2Ht	6	10	2	OFF	snp	M+2	0.950259	38.99	6451	196.9091	48250	10051	18389	21406

Tabla 8: Una vez combinados los datos de todos los individuos en un catálogo común, número de regiones obtenidas (Tags) y de estas, el número de ellas que son polimórficas (PolTags), número de alelos (Alleles) y SNPs (SNPs) para cada una de las combinaciones de parámetros testados. Se muestran además el número de regiones y haplotipos presentes en todas las poblaciones y en al menos el 75% de individuos de cada población.

CSTACKS	n	Tags	PolTags	Alleles	SNPs	Tags 0.75 ind / 8 pop	Haplotypes 0.75 ind / 8 pop
	default	0	502249	203245	456524	290902	24757
n2	2	350130	146195	550594	362617	38736	148223
n4	4	325764	135411	568137	393217	38967	152018
n6	6	313631	129811	575791	419794	38734	149893

6.1.3.3 Análisis de la estructura poblacional

Fase I

Se eligió la combinación de parámetros “default” con “n6” para hacer los análisis preliminares de la estructura poblacional de la caballa. Se seleccionaron las regiones comunes a las 8 poblaciones y que estuviesen presentes en al menos 75% de los individuos analizados. Esto dio lugar a un total de unas 30.000 regiones que contenían en total unos 300.000 SNPs. De esos SNPs, se seleccionaron aquellos que tenían un MAF (frecuencia alélica mínima) mayor al 0,05. Esta selección redujo el número de SNPs a unos 30.000. Por razones computacionales se redujo este número eligiendo al azar 2.000 de ellos. Se realizó un análisis de la estructura poblacional mediante el programa STRUCTURE (Figura 10). El análisis mostró una clara diferenciación de las muestras del

Mediterráneo y de las del Atlántico, donde, a su vez, se intuye una diferenciación entre las muestras de Canadá y el resto.

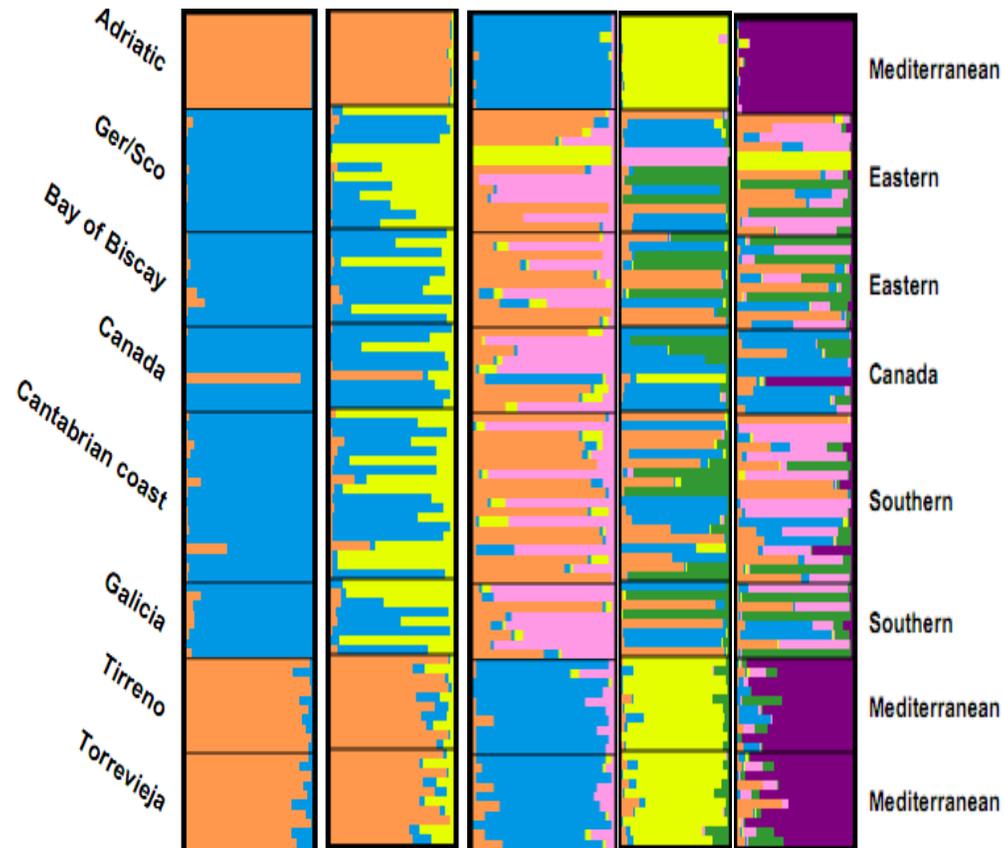


Figura 10: Representación gráfica del ancestro de cada individuo. Cada barra representa un individuo y cada color, su grado de pertenencia a cada uno de los K agrupamientos inferidos (donde K es igual a 2, 4, 5 o 6). Los agrupamientos se infirieron mediante STRUCTURE v 2.2 sin utilizar ningún a priori de asignación poblacional basándose en el modelo “admixture”. Los resultados gráficos se han obtenido mediante DISTRUCT.

Fase II

Para elucidar la estructura poblacional dentro del Atlántico Norte fue necesaria la realización de análisis con más muestras. Por ello, se realizó una segunda fase de

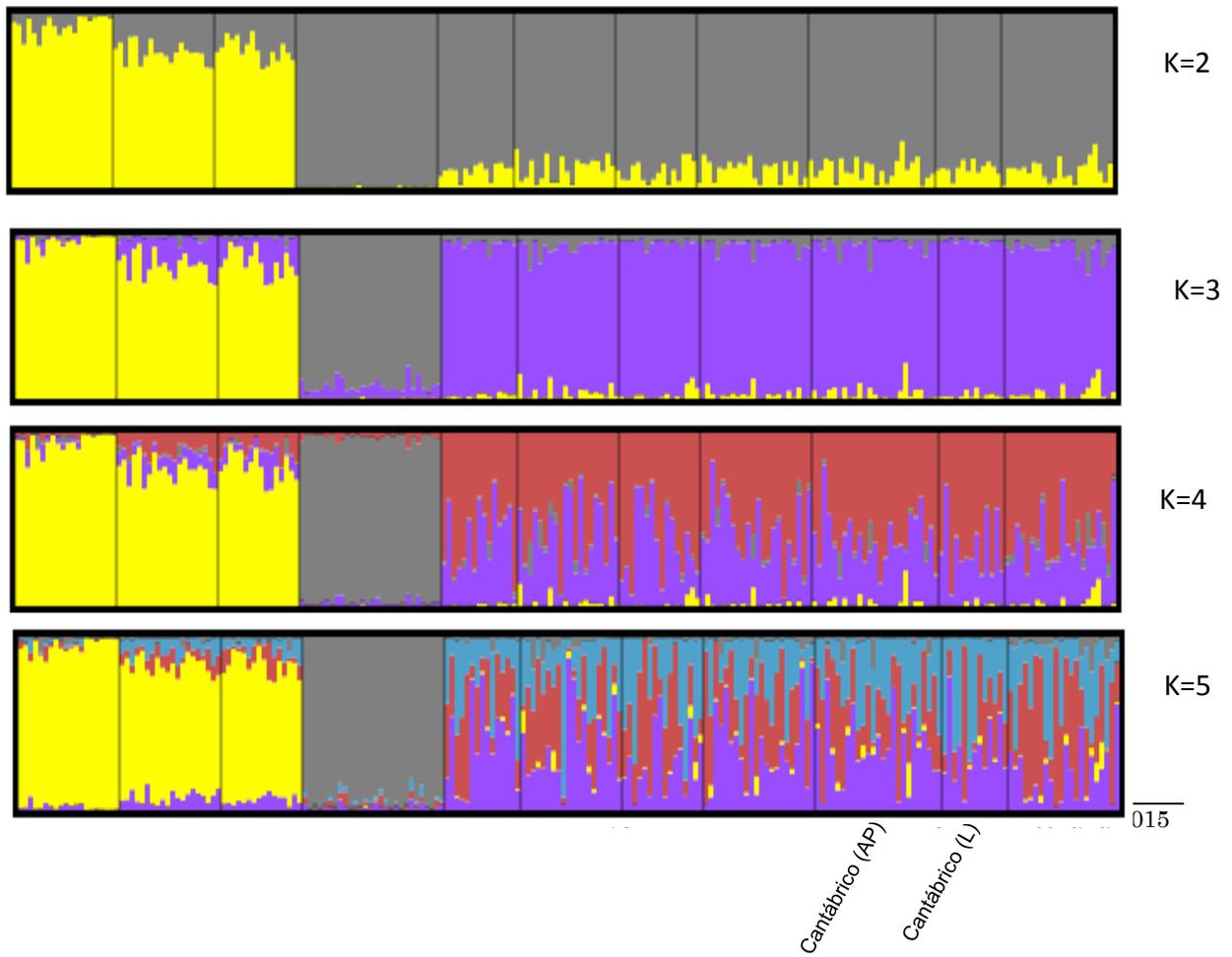
preparación de librerías. Se seleccionaron 132 individuos más (Tabla 9), entre los cuales, se incluyeron individuos de las Islas Faroes y larvas del componentes Oeste y Sur.

	Librería Fase 1	Librería Fase 2	TOTAL
TORREVIEJA	10	10	20
ITALIA ADRIÁTICO	10	10	20
ITALIA OESTE	10	10	20
GALICIA	10	12	22
COSTA CANTÁBRICA	20	12	32
CANTÁBRICO (No costa)	12	15	27
ALEMANIA/ESCOCIA	14	12	26
CANADA	10	21	31
FAROE	-	15	15
<i>Larvas</i>	-	30	15
TOTAL	96	132	228

Tabla 9: Relación de individuos analizados para la fase uno e individuos listos para ser secuenciados en la fase dos.

Las librerías preliminares de 7 larvas (3 del componente Oeste y 4 del componente Sur) mostraron que era posible un análisis de RAD-seq a partir del ADN obtenido de cada una de ellas. Por ello, se procedió a analizar otras 40 larvas. Estos análisis mostraron una clara diferencia entre Mediterráneo, Canadá y Noreste Atlántico, pero no mostraron que las muestras del Noreste Atlántico fuesen diferentes entre sí y cierto grado de diferenciación genética dentro del mediterráneo. (Figura 11_1).

Otro tipo de representación de los resultados obtenidos es el de componenetes principales. La figura 11_2 muestra este análisis y de nuevo se observa claramente la separación entre los individuos de Canada, NEA y Mediterraneo y la cierta diferenciación genética en este último.



Adriático (ANP) Tirreno (AP) Torrevieja (AP) Canada (AP) Faroe (ANP) Porcupine(L) Porcupine (AP) Golfo de Bizkaia (AP) Galicia (L)

Figura 11_1: Representación gráfica del ancestro de cada individuo basado en 5000 SNPs. Cada barra representa un individuo y cada color su grado de pertenencia a cada uno de los k agrupamientos inferidos. ANP = Adultos no es puesta; AP = Adultos en Puesta y L = Larvas.

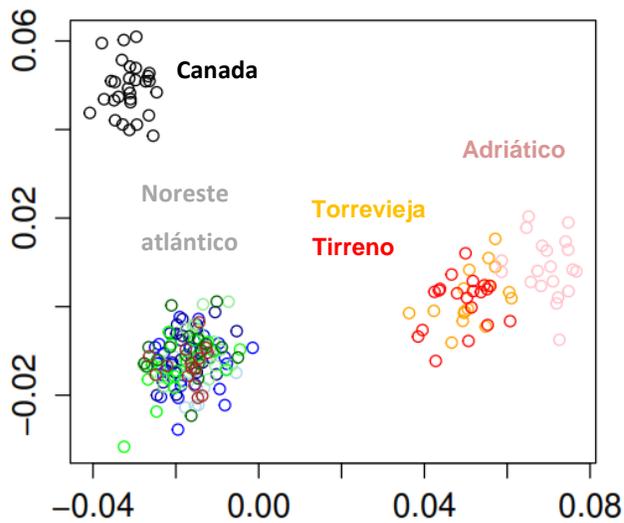


Figura 11_2: Análisis de componentes principales de ~15.000 SNPs. Cada punto indica un individuo coloreado según su área de origen.

6.2 Evaluación de la población residente en el Cantábrico y componente de auto-reclutamiento

La evolución en la estima acústica de biomasa de caballa (Bi) para los años 2010 a 2013 es la que se muestra en la Tabla 10. Las estimas oscilan sin mostrar una tendencia clara en estos cuatro años, obteniendo un valor máximo de 74.000 toneladas en el año 2013 seguido del mínimo de 6.500 toneladas el año 2012.

Tabla 10: Biomasa acústica de caballa de las campaña de JUVENA.

Año	Especie	Area	<talla>	<peso>	Nº capturas	Ni	Bi
2010	<i>Scomber scombrus</i>	21933.0	23,8	104,5	22	97.831,011	10.224
2011	<i>Scomber scombrus</i>	21062.6	19,1	67,5	25	330.545,033	22.302
2012	<i>Scomber scombrus</i>	13075.1	25,9	133,4	24	49.179,734	6.561
2013	<i>Scomber scombrus</i>	4305.0	18,7	52,1	21	1.417.270,393	73.816

Al mapear las posiciones de las capturas realizadas en esta campaña durante los años 2003 a 2013 parece observarse una expansión de su presencia en los últimos años (Figuras 12 y 13).

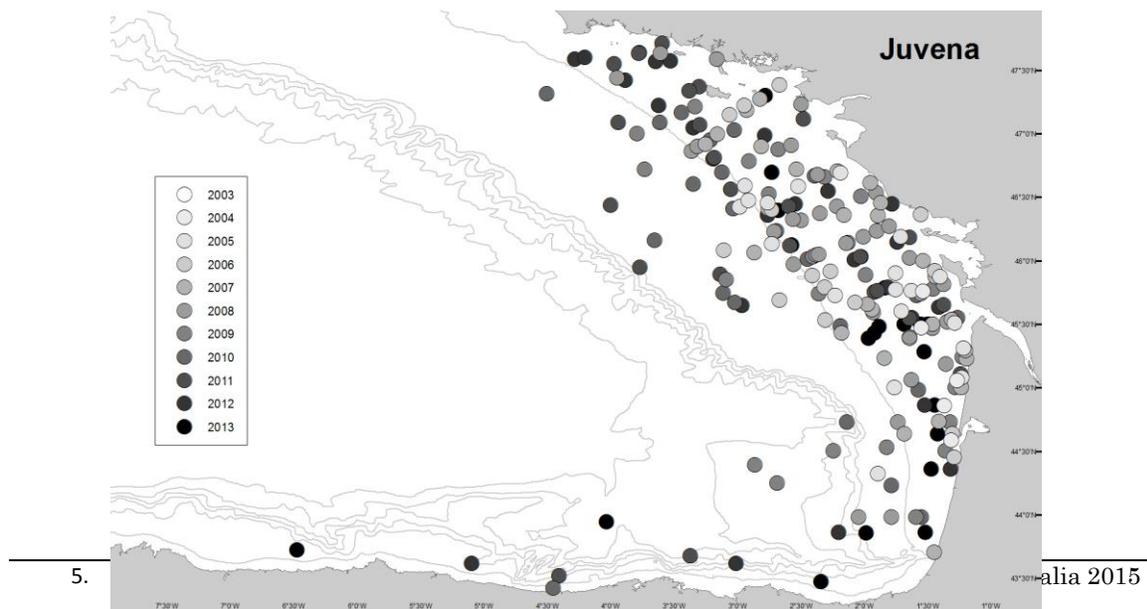


Figura 12: Pescas a lo largo de los años 2003 a 2013 en las campañas JUVENA.

Desde los años 2003 a 2009 las capturas fueron todas en la plataforma francesa, mientras que a partir del año 2010 aparecieron también capturas en la zona del Cantábrico y zona exterior de la plataforma francesa (Figura 13).

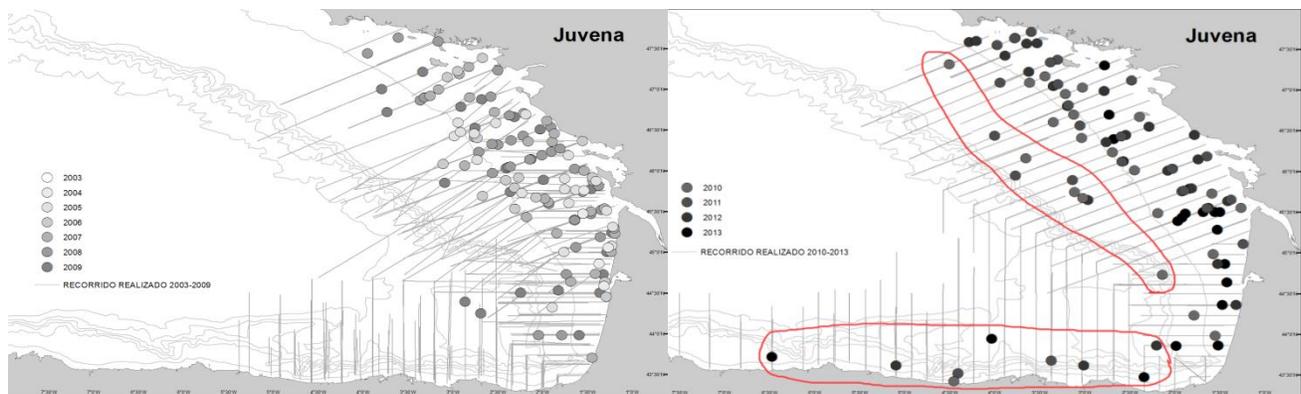


Figura 13: Capturas de caballa para los años 2003-2009 (izq) y para 2010-2014 (dcha).

Si se analiza la evolución de las capturas año por año con más detalle (Figura 14) se observa que a lo largo de los años las capturas de esta especie tuvieron una tendencia a alejarse de la costa y expandirse por el área del Golfo de Bizkaia.

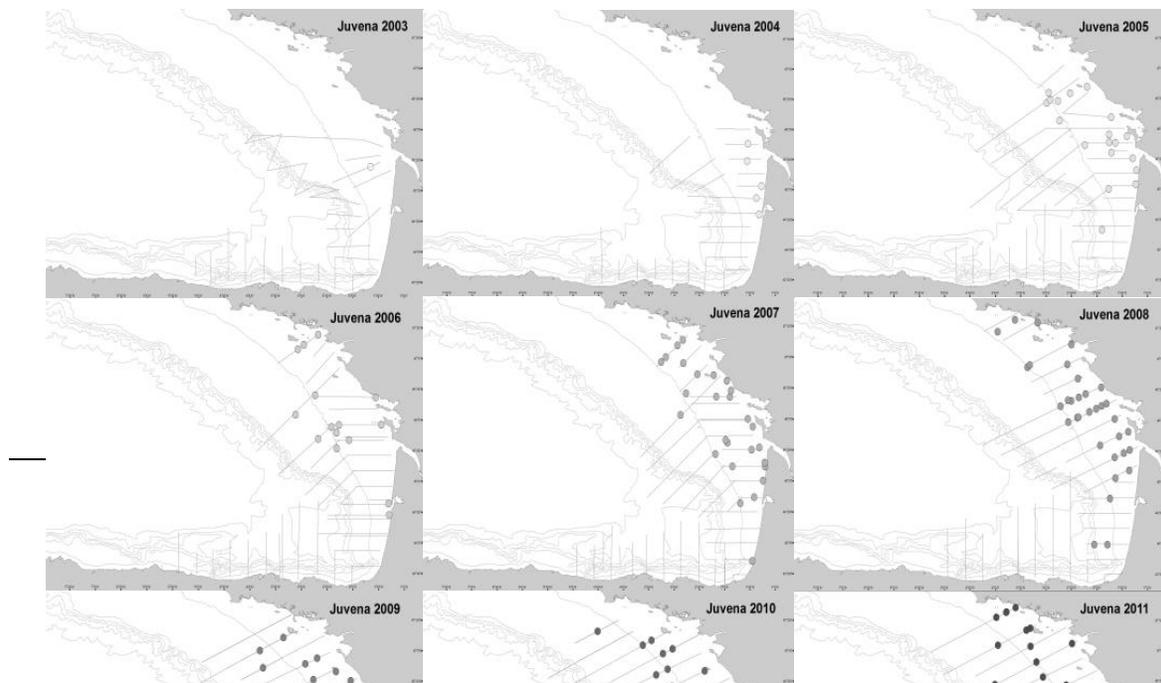


Figura 14: Capturas de caballa por años.

En cuanto a la evolución de las tallas medias por años (Tabla 11) se observó una ligera tendencia a la baja para los juveniles, mientras que la talla de los adultos se mantuvo estable (Figura 15).

Tabla 11: Talla media de las muestras de caballa por años.

Año	TallaMedia	Adultos	Juveniles
2003	27.00	27.00	
2004	24.50	30.03	13.43

2005	26.10	30.88	20.37
2006	27.95	29.24	21.50
2007	28.62	31.81	21.42
2008	26.79	31.55	17.26
2009	23.71	29.05	18.37
2010	23.82	32.78	17.10
2011	22.10	32.35	13.90
2012	17.23	27.07	13.95
2013	19.83	27.78	17.19

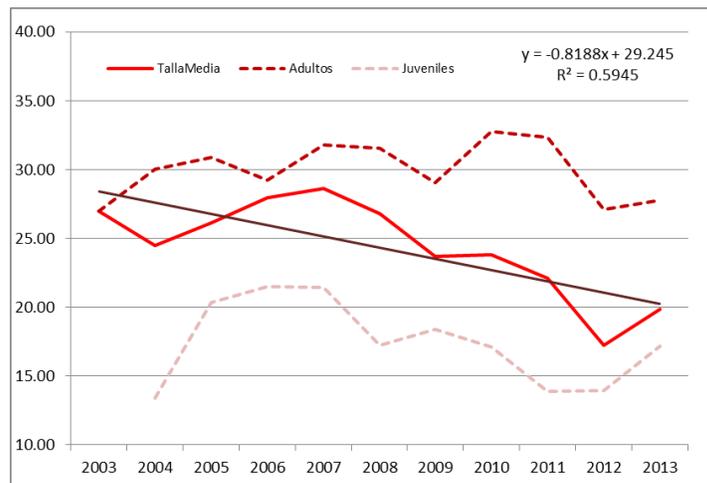


Figura 15: Representación gráfica de la tendencia por tallas.

Por otro lado, la distribución espacial de edades de caballa no proporcionó patrones claros (Figuras 16 y 17), encontrándose los centros de masa de juveniles y adultos muy cercanos entre sí.

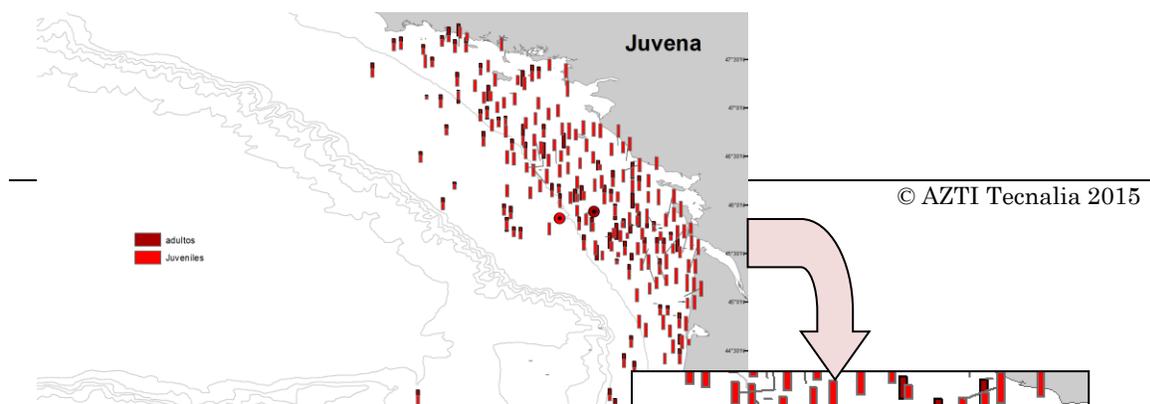


Figura 16: Distribución espacial de edades (y posición de los CM).

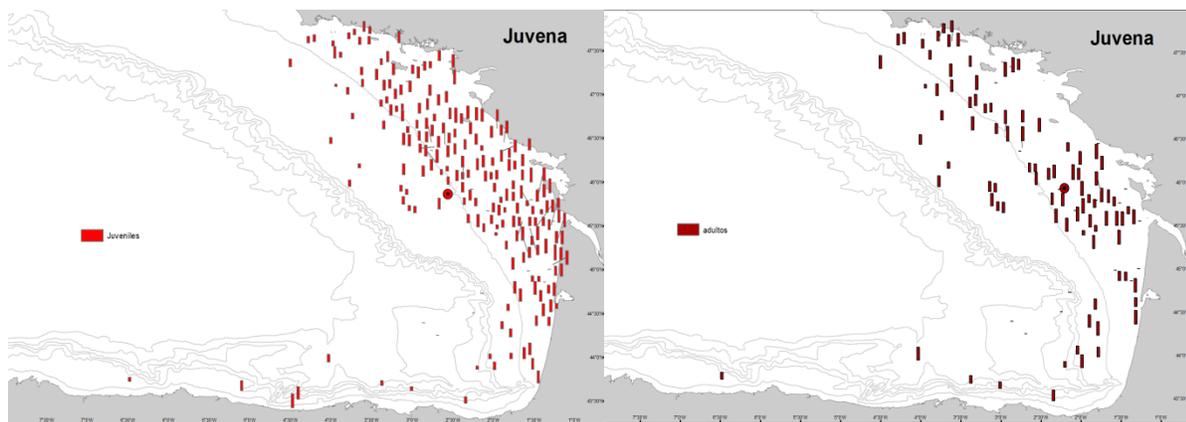


Figura 17: Centro de masas por edades y tallas.

Apareció un patrón de comportamiento respecto de las tallas de los juveniles (Figura 17). Entre los juveniles parece que las tallas grandes se encontraban más pegadas a costa y las tallas más pequeñas alejadas o desplazadas hacia la zona cantábrica y más mezclados con los adultos.

El porcentaje de edades en estas fechas (Tabla 12 y Figura 18) fue muy parejo, aunque existe una ligera tendencia (Tabla 12). Al norte de los 46° de latitud predominan ligeramente los adultos y al sur del 46° predominan los juveniles (Tabla 12 y Figura 19).

Tabla 12: Porcentaje (%) de edades por regiones.

Region	Lat_promedio	Long_promedio	adultos	Juveniles	Region	Lat_promedio	Long_promedio	adultos	Juveniles
AreaTotal	45.8984	-2.3841	51%	49%					
46+	46.7087	-2.8154	57%	43%	46-	45.1029	-1.9606	45%	55%
45+	46.2527	-2.4180	53%	47%	45-	44.2387	-2.2252	39%	61%
44+	46.0693	-2.3377	52%	49%	44-	43.7615	-2.9636	44%	56%

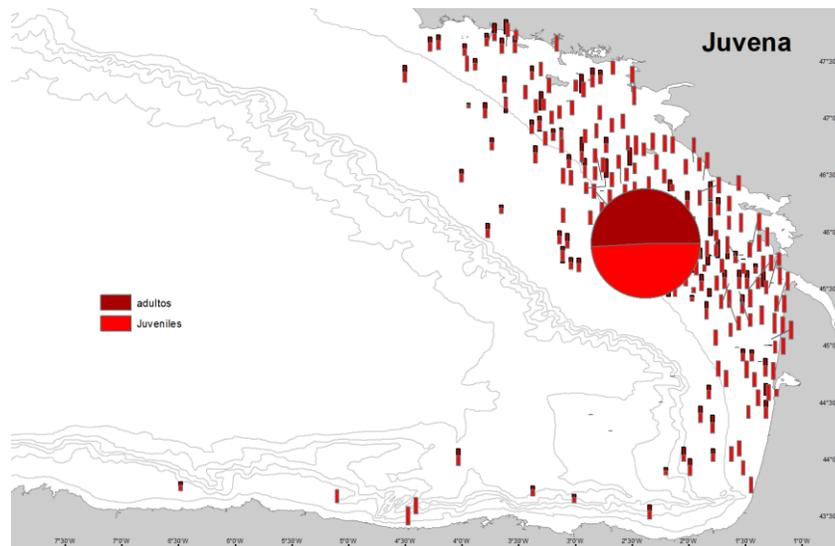


Figura 18: Distribución en porcentaje (%) por edades para el área total todos los años.

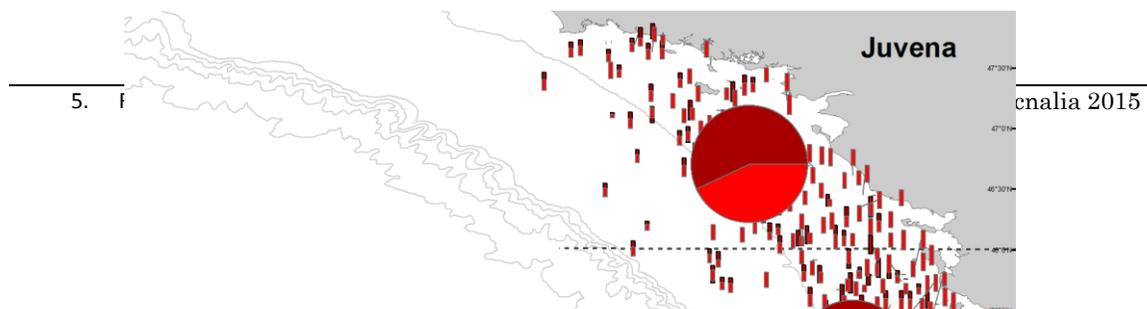


Figura 19: Distribución en porcentaje (%) por edades por encima y debajo de la latitud 46° N.

En cuanto al porcentaje capturado de caballa respecto a otras especies (Figura 20) se pudieron identificar zonas donde la captura de la especie era alta, sin embargo no se observó un patrón espacial claro.

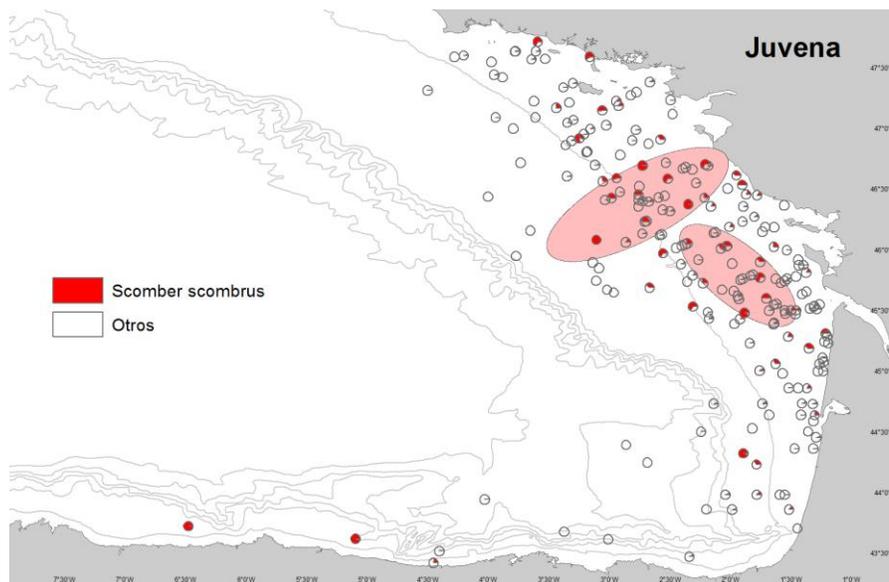


Figura 20: Capturas de *Scomber scombrus* a lo largo de los años en porcentajes (%).

6.3 Determinación de los orígenes de nacimiento de los individuos de la población mediante el análisis químico de los otolitos

6.3.1 Resultados

6.3.1.1 Caracterización de las diferentes zonas de puesta de los individuos juveniles mediante el análisis químico de los otolitos

La concentración media (\pm SD) de $\delta^{13}\text{C}$ en los otolitos de los juveniles capturados en el componente Sur variaron entre -6.83 y -4.72, con un valor medio de -5.61 ± 0.4 (Figura 1a). Para los individuos procedentes del componente Oeste los valores de $\delta^{13}\text{C}$ variaron entre -7.38 y -4.11, siendo el valor medio (\pm SD) -5.79 ± 0.4 . Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de carbono entre los individuos de los dos componentes (*t*-test, $P < 0.05$). En relación a la concentración del isotopo de oxígeno, el valor medio (\pm SD) obtenido en los otolitos de los individuos del componente Sur fue de 1.45 (± 0.2); mientras que este valor fue de 1.17 (± 0.4) en los juveniles del otro componente (Figura 1b). En este caso, las diferencias en las concentraciones de $\delta^{18}\text{O}$ entre ambos componentes también fueron significativas (*t*-test, $P < 0.05$).

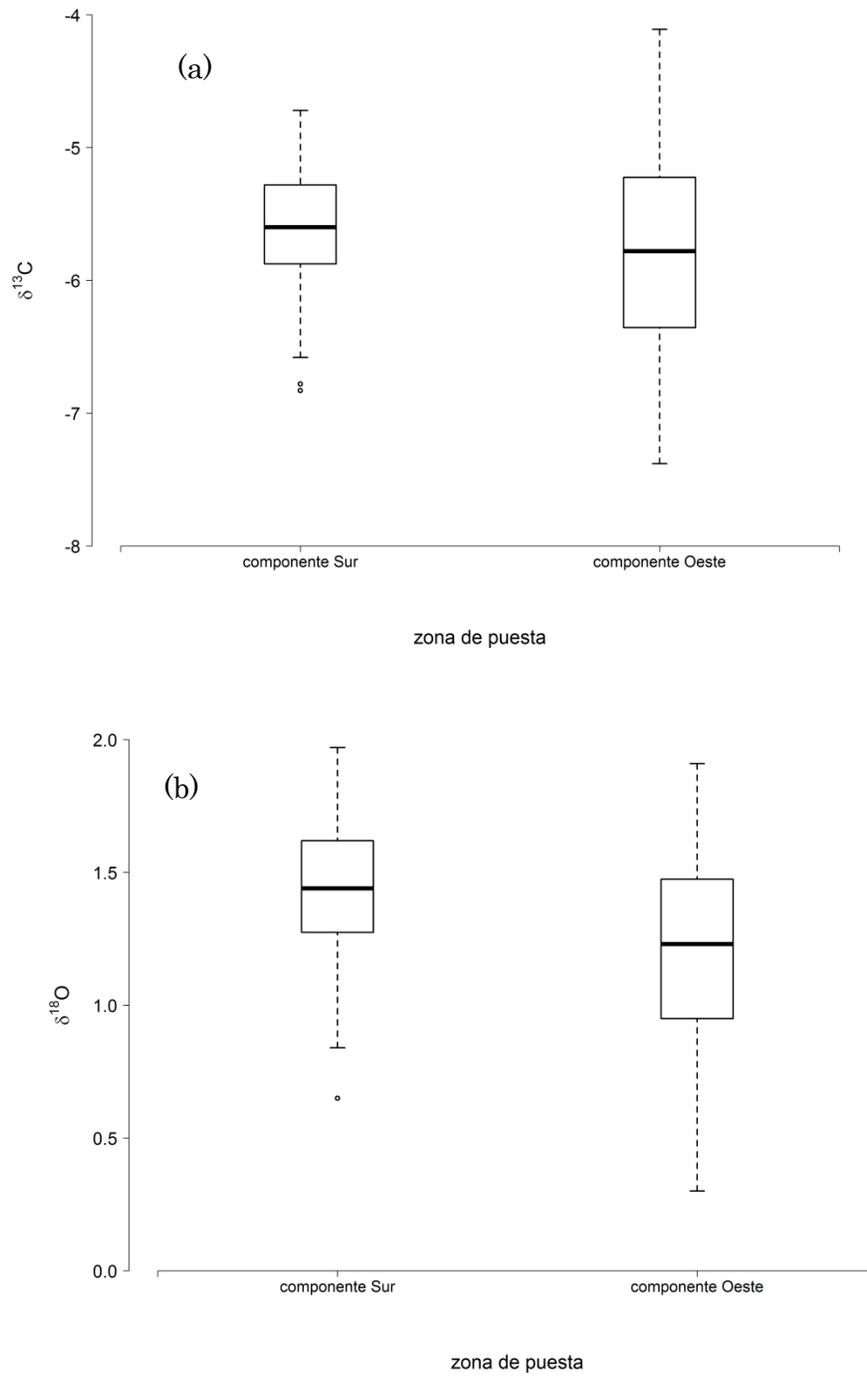
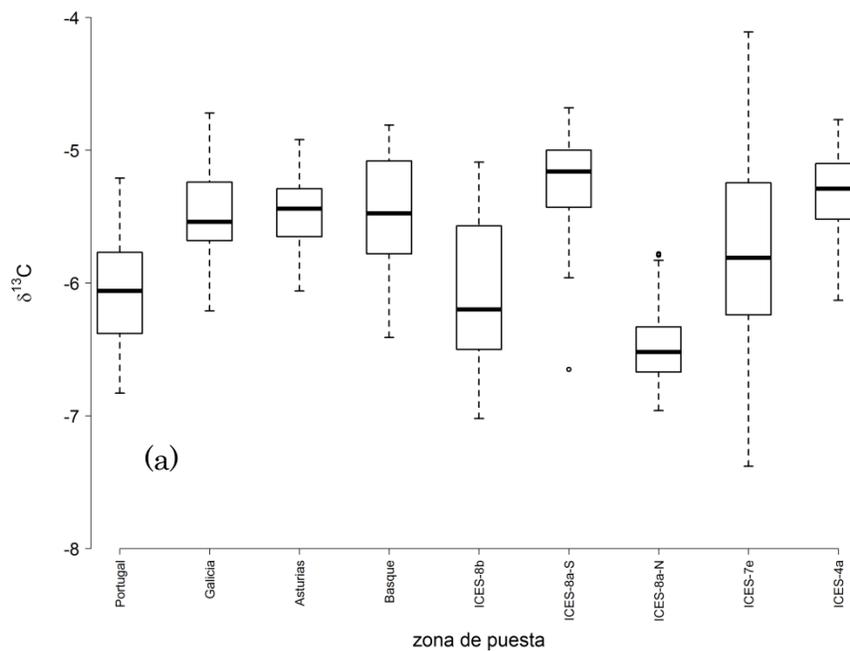


Figura 1. (a) Concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ y (b) $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles del componente Sur y Oeste.

Además, se diferenciaron zonas de puesta dentro de cada componente dependiendo de la procedencia de las muestras. Los resultados de las concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ para cada una de ellas se representan en la Figura 2a. Como se puede observar, dentro del componente Sur, los individuos procedentes de la zona de Portugal mostraron valores significativamente diferentes al resto de las zonas (t -test, $P < 0.01$). Dentro del componente Oeste, las concentraciones del isótopo de carbono en los otolitos mostraron una mayor variabilidad entre las zonas (t -test, $P < 0.05$). Respecto a la concentración del isótopo de oxígeno, los resultados mostraron diferencias significativas entre los individuos del componente Sur (t -test, $P < 0.01$) (Figura 2b). Sin embargo, dentro de este componente, los juveniles procedentes de la zona de Galicia y Asturias no mostraron diferencias en las concentraciones $\delta^{18}\text{O}$ (t -test, $P > 0.01$). Dentro del componente Oeste, los individuos de las zonas ICES VIIIa norte y VIIe no mostraron diferencias en las concentraciones de oxígeno (t -test, $P > 0.01$).



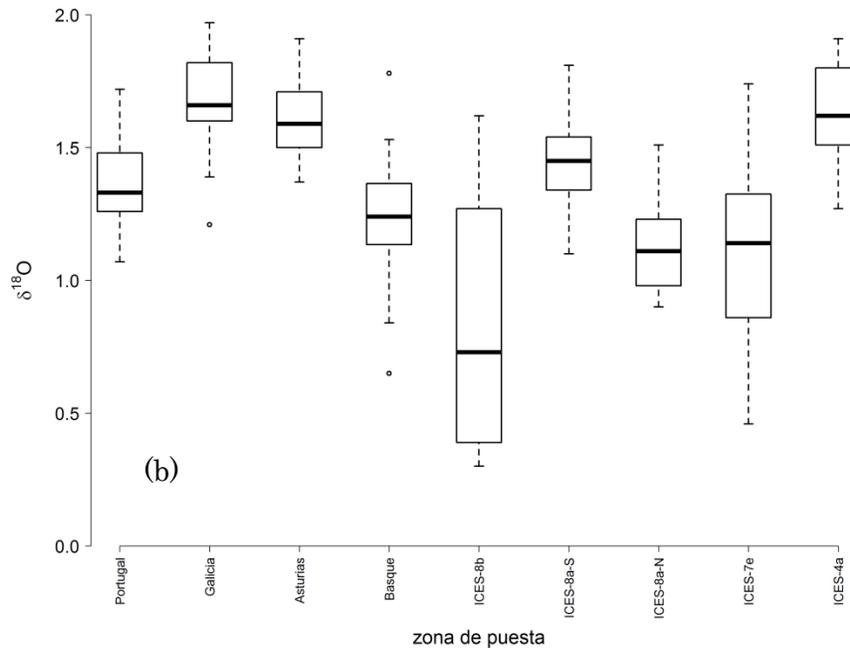


Figura 2. (a) Concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ y (b) $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles en relación a su procedencia. Las zonas de Portugal, Galicia, Asturias y Costa Vasca corresponden a los individuos capturados en el componente Sur; mientras que las zonas ICES VIIIb, VIIIa (Sur y Norte), VIIe y IVa corresponden a las caballas del componente Oeste.

Para estudiar la variabilidad interanual en las concentraciones de los isótopos estables, se analizaron los otolitos de los individuos pertenecientes a la zona ICES VIIe. Las concentraciones de carbono en los años 2011 y 2014 no mostraron diferencias significativas entre sí (t -test, $P > 0.05$) (Figura 3a). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los juveniles nacidos en el 2012 y 2013 (t -test, $P > 0.05$). Sin embargo, las diferencias entre los años 2011 y 2014 respecto a los otros dos años fueron significativas (t -test, $P < 0.01$). El análisis de las concentraciones de oxígeno mostró diferencias significativas entre los años 2011 y 2012 y el resto de los años (t -test, $P < 0.01$) (Figura 3b). Cabe señalar que los individuos correspondientes al 2011 y 2014 eran de edad-0, mientras que aquellos capturados en el 2013 eran de edad-1 y los del 2012 de edad-2.

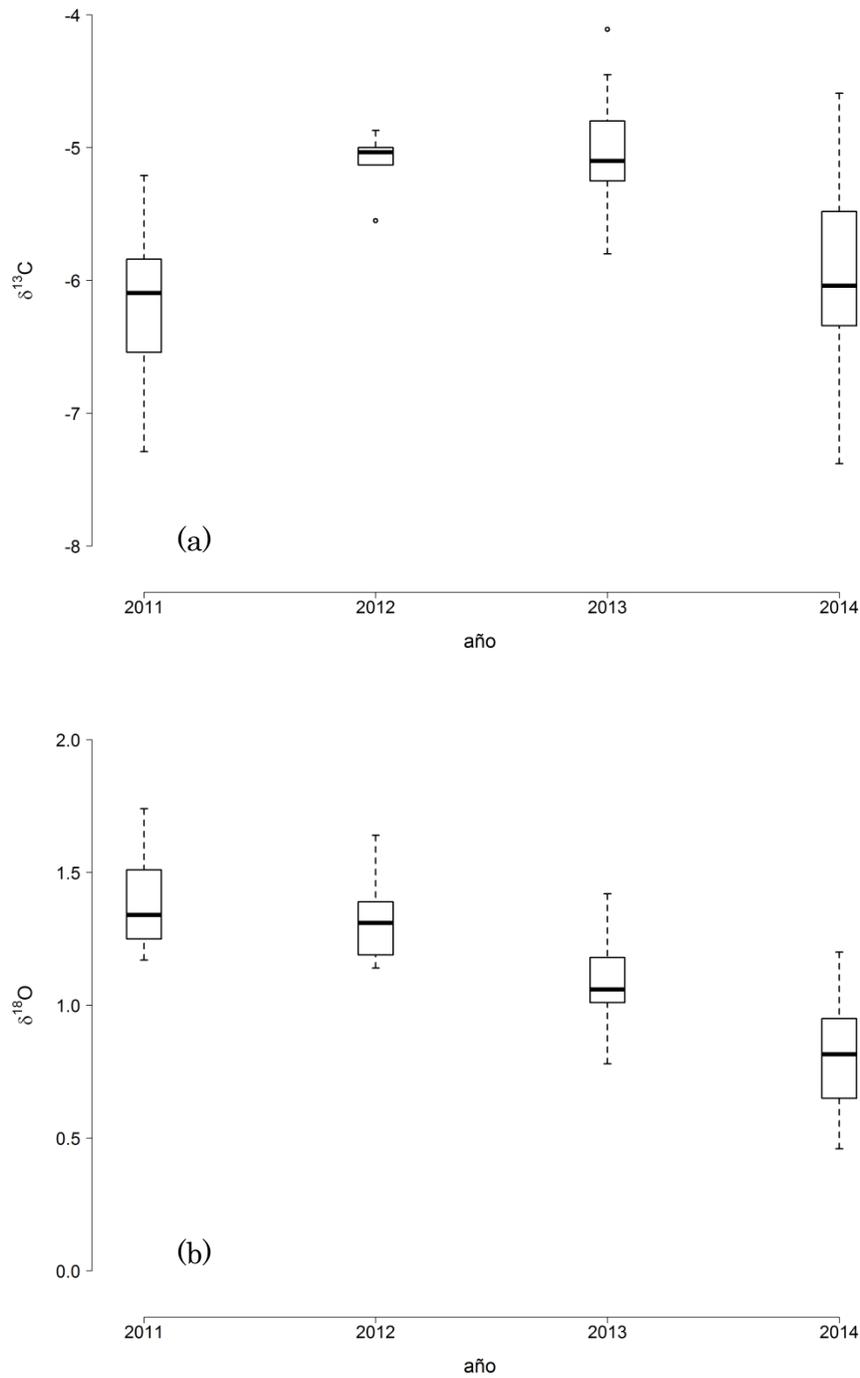


Figura 3. (a) Concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ y (b) $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles correspondientes a la zona ICES VIIe en diferentes años.

Por otro lado, para discriminar las distintas zonas de puesta se analizaron los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles correspondientes a los componentes Sur y Oeste (Figura 4). Los individuos capturas dentro del componente Oeste mostraron valores más dispersos que aquellos capturados dentro del componente Sur. Adicionalmente, con el fin de estudiar la variabilidad interanual, se analizaron estos valores para los individuos de la zona ICES VIIe para diferentes años (Figura 5). Los resultados muestran una variabilidad interanual dentro de la zona ICES VIIe.

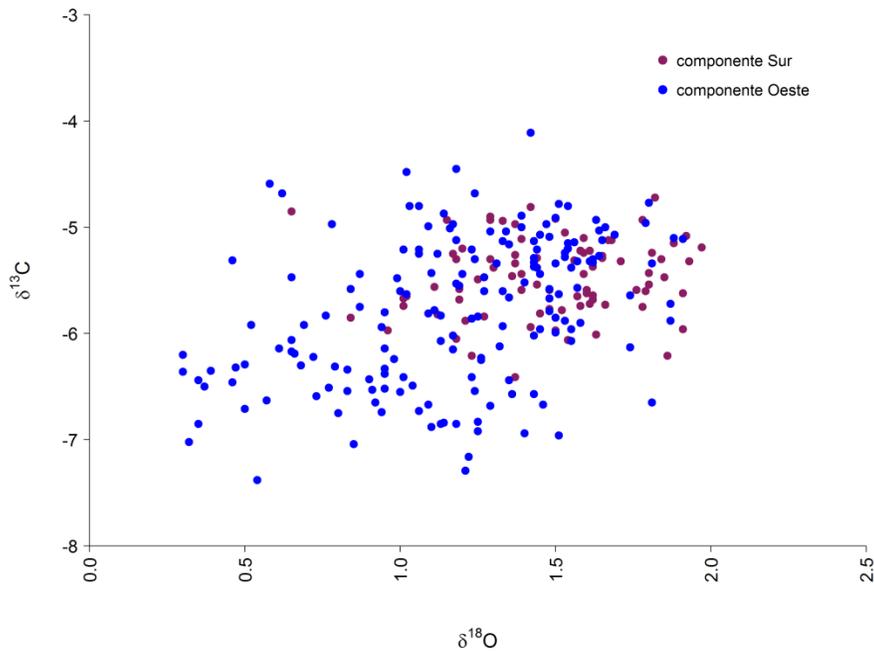


Figura 4. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles correspondientes a los componentes Sur y Oeste.

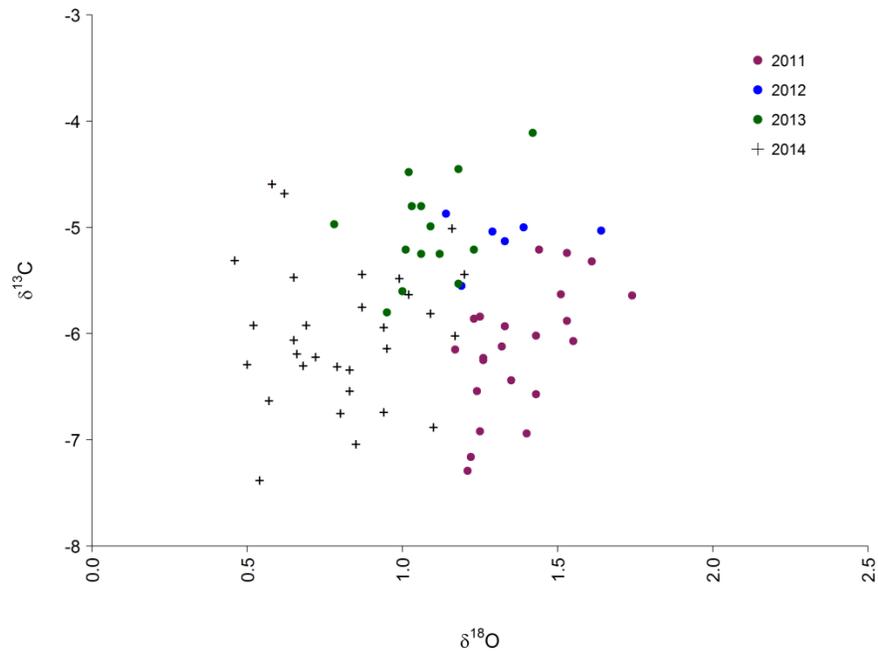


Figura 5. $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles de la zona ICES VIIe en diferentes años.

6.3.2 Discusion

En este proyecto se han analizado las concentraciones de los isótopos estables de carbono y oxígeno en los otolitos de las caballas. Las muestras analizadas corresponden a individuos juveniles, individuos de edades comprendidas entre 0 y 2 años, que han sido utilizados como muestras de referencia para caracterizar las diferentes zonas de puesta. Esto es debido a que los juveniles permanecen en las aguas donde han nacido durante esta fase de su vida. Por lo tanto, la composición química de los otolitos de estos individuos representa o caracteriza su zona de nacimiento.

Los resultados muestran diferencias significativas en las concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ entre los individuos de los componentes Sur y Oeste. Además, parecen existir diferencias entre las distintas zonas de puesta dentro de cada componente. Dentro del componente Sur, la zona de Portugal presenta valores estadísticamente diferentes de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$; mientras que, las zonas de Galicia y Asturias parecen ser similares entre sí. Dentro del componente Oeste, los resultados muestran una mayor variabilidad entre las distintas zonas estudiadas, que puede ser debido a varios factores. Por un lado, la extensión de esta zona de estudio fue mayor que para el componente Sur. Y, por otro, las muestras analizadas corresponden a individuos nacidos en diferentes años; por lo tanto, existe una variabilidad interanual entre las muestras que debe ser estudiada.

En este sentido, para que estas muestras puedan ser utilizadas de forma adecuada, hay que estudiar la posible variabilidad interanual en la composición química de los otolitos. Para ello, se han analizado los otolitos de los juveniles capturados en la zona ICES VIIe, ya que, en este grupo, se dispone de muestras nacidas en diferentes años. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de los juveniles parecen mostrar una variabilidad interanual en la zona ICES VIIe. Sin embargo, esta variabilidad interanual podría estar asociada a la edad de los juveniles. Cabe la posibilidad de que los juveniles de edad-1 y edad-2 presenten un movimiento entre diferentes masas de aguas durante su fase juvenil. En cualquier caso, este es un punto a tener en cuenta y debe ser estudiado con más detalle.

Por lo tanto, el análisis químico de los otolitos parece ser una herramienta útil para la discriminación de distintas zonas de puesta de la caballa. Sin embargo, es recomendable un estudio

más detallado sobre la variabilidad interanual en la composición de los isótopos estables antes de utilizar esta herramienta para conocer el posible comportamiento de retorno de esta especie.

6.4 Actualización de la situación de la gestión de la población de caballa en aguas europeas intra y extra comunitarias

6.4.1 Asesoramiento ICES y gestión internacional aplicable al 2013

Desde el 2008 no se ha alcanzado ningún acuerdo entre los estados costeros sobre el reparto de las cuotas de caballa. En la Tabla 13 se presenta una visión general de las cuotas y transferencias declaradas para 2013, sólo disponible para WGWIDE (Working Group on Widely Distributed Stocks). Se espera que la extracción total de la caballa sea aproximadamente de 896 kt en 2013, superando el TAC recomendado para 2013 de entre 497 y 542 kt.

En la zona sur y desde el año 2010 se han implementado medidas de regulación de la captura de caballa por la flota española. La cuota de captura se distribuye por artes de pesca (30,5% de la cuota para los barcos arrastreros, 27,7% para los cerqueros y 34,6% para los pescadores artesanales), medio año y zona. Además, se aplicó un control más estricto sobre los desembarques de caballa por la administración pesquera española. En 2011, la Union Europea introdujo un nuevo calendario de devolución de la cuota asignada a España, que fue sobre pescada en el año 2010 y que se extiende hasta el año 2015 (Reglamento (UE) n ° 165/2011 de la Comisión). Una regulación similar aplicada a los barcos escoceses e irlandeses venció en 2012. Por ello, en el cómputo global de capturas de caballa España “resta” 8.126 t de su cuota anual.

Tabla 13: Capturas esperadas de caballa para los diferentes estados costeros.

Cuota 2013	Capturas esperadas (t)
EU (incl. Suecia)	338 392

- Devolucion de España	-8 126
- Devolucion de otros paises de la EU	-6
Noruega	153 597
Rusia	68 359
Islandia	123 182
- Islandia transfer de 2012 -> 2013	2 827
Faroos	125 852
- Faroes transfer de 2012 -> 2013	32 000
Groelandia	50 044
Descartes	15 380
Sobrepesca esperada	-6 165
Total	895 336

6.4.2 *Estimación de la biomasa de la campaña internacional de huevos de caballa y jurel*

Desde el año 2004 hay una demandan por parte del grupo de trabajo de stocks altamente migratorios (WGWIDE) de presentar lo datos de la campaña durante el desarrollo del grupo de trabajo de evaluación, dado que el grupo de trabajo de campañas de huevos de caballa y chicharro (WG on Mackerel and horse mackerel EGg Surveys) tiene como objetivo proporcionar una estimación preliminar de biomasa de caballa del NEA y la producción de huevos del jurel occidental a tiempo para las reuniones de evaluación dentro del mismo año de las campañas.

En Agosto del 2013, durante la reunión del grupo, se presentaron los resultados preliminares de la estima de producción de huevos de caballa. En el año 2013 se realizaron 17 campañas individuales con un total de 341 días de mar. En las campañas participaron 10 institutos de 9 países europeos, cubriendo paulatinamente un área que va desde Cádiz hasta aguas de Islandia desde febrero a julio.

Se analizaron un total de 2.061 muestras de plancton para la estima de la producción de huevos. La curva de producción se estimó ajustando un punto de comienzo y otro de finalización. La curva observada para el año 2013 indicó que el final de la puesta se

ajusta bien a la fecha predeterminada (31 de julio), mientras que parece comenzar antes que la fecha nominal pre-determinada (10 febrero). Esto ya viene ocurriendo desde el año 2010.

La producción total anual de huevos en el componente Oeste fue calculado en 2.31×10^{15} , un 27% mayor que en el 2010 y en el componente Sur en 6.77×10^{14} , un 59% mayor que en el 2010. La Figura 21 muestra la evolución histórica de las estimas de biomasa de caballa aplicando el método de producción de huevos y la derivada de la evaluación acústica. Respecto a la primera, desde el año 2004 se ha observado un aumento progresivo de la biomasa de caballa que desova en el componente Sur (divison ICES VIIIc, IXa). La última estima preliminar obtenida da un valor de 1.200.000 toneladas. Las estimas derivadas de la acústica dan un perfil de abundancias tipo dientes de sierra, que no coinciden demasiado bien con las estimas derivadas de la producción de huevos. Para el último año evaluado las diferencias son especialmente alta, pues la acústica estimó unas 379.149 toneladas.

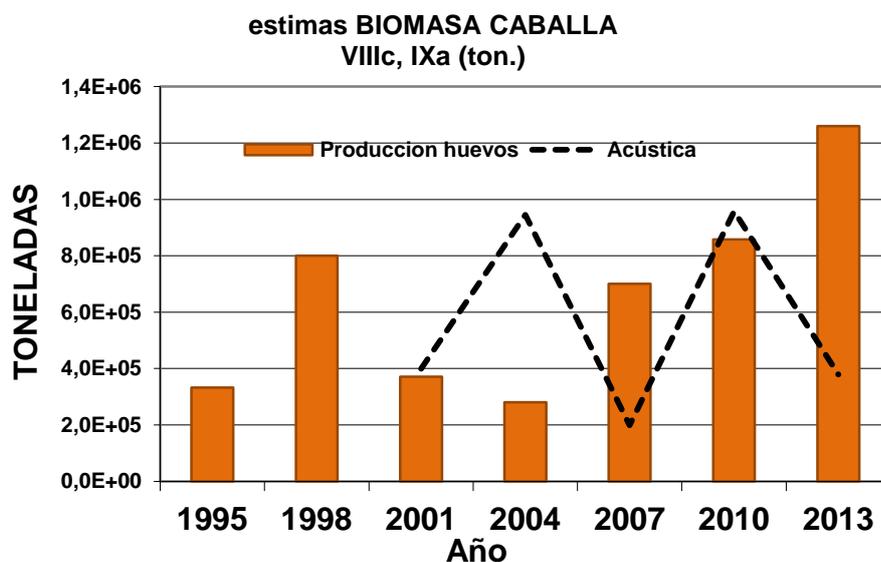


Figura 21: Serie histórica de las estimas de biomasa de caballa del componente Sur de puesta derivadas de la aplicación de método de producción de huevos (barras) y de la acústica (línea punteada). (Fuente ICES). La estima para el año 2013 deriva de la producción de huevos es preliminar.

6.4.3 Evaluación del stock

Desde el año 2007, la caballa del NEA ha sido clasificada como de “evaluación actualizada”. La evaluación se lleva a cabo ajustando el modelo de captura por edad integrada (ICA, en el entorno de FLR - versión 1,4 a 12 - 08 de octubre 2009 15:16:26). El modelo tiene un período separable de 12 años, utilizando las estimaciones de la biomasa del stock en puesta (Spawning Stock Biomass, SSB) de las campañas trienales de huevos de caballa como un índice de ajuste. Se utiliza datos del 1972 al 2012 que dan estimaciones de F de 1972-2012 y el número de ejemplares por edad a partir de 1 de enero 1972 al 2013.

La evaluación del modelo indicó una disminución de SSB de 3,01 millones de toneladas en 2011 a 2,46 millones de toneladas en 2012. La mortalidad por pesca F_{bar4-8} fue estable, estimada en 0,33 en 2012.

El ajuste de los datos de la campaña de huevos de caballa fue muy bueno para los años en el período separable. El diagnóstico de la captura para este periodo no mostró ningún patrón. Se pueden ver algunos efectos de cohorte, mostrando una tendencia del modelo a infra-estimar la captura de las edades jóvenes y los de edades mayores, principalmente la de cohortes pequeños (por ejemplo, la clase del año 2000), e inverso tendencia para cohortes grandes (por ejemplo, la cohorte de 2002).

Esta evaluación, sin embargo, produce una estimación no realista del reclutamiento del 2012, de alrededor de 100 veces mayor el nivel histórico de reclutamiento. Aunque la estima de reclutamiento del último año suele ser bastante incierta, por lo que se tiende a remplazarla por una media geométrica, nunca se ha dado una diferencia de tal magnitud. El chequeo de los datos indico que la fuente del problema no eran los índices de biomasa producidos por la campaña de huevos, sino la matriz de datos “catch-at-age”.

La evaluación sufre tanto de la escasez como de la mala calidad de los datos de entrada, siendo los principales:

- Las capturas son subestimados por una proporción desconocida que es probable que haya variado a lo largo de la serie temporal completa (CM CIEM 2013/SSGESST:18). Como consecuencia, la evaluación produce una subestimación de la población de caballa del NEA.
- Los cambios en las prácticas de pesca socavan el principio de selectividad constante en el período separable.
- El único índice independiente no está basado en la edad y está disponible sólo cada tres años. Esto implica que los números por edad estimadas en los años más recientes son altamente inciertos. Esto también implica que la percepción de la población podría ser revisado cada vez que un nuevo punto de campaña estuviese disponible.

El Grupo de Trabajo WIDE decidió rechazar la última evaluación de la población de caballa, así como las evaluaciones que utilizan parámetros ICA modificados. La decisión se tomó para clasificar la población de caballa NEA dentro de la Categoría 3 (stocks clasificados como de datos limitados) para los que el consejo de gestión debe darse sobre la base de la tendencia del índice de la producción de huevos obtenido en las campaña trienales.

6.5 Análisis socio-económico de las capturas de caballa por la flota del Cantábrico

6.5.1 Composición de las capturas por CCAA

La comunidad autónoma que más caballa capturó en el año 2012 fue Galicia, seguida de Asturias, País Vasco, Cantabria y otros (Figura 22). La sardina también fue una especie con unas capturas superiores a las de la caballa en todas las CCAA, excepto en Cantabria.

En cuanto a los valores promedio por buque, aquellos buques que mayores capturas promedio obtuvieron en 2012 fueron los buques del País Vasco, seguido por los buques

gallegos, asturianos, buques de otras CCAA y buques cántabros. Sin embargo, en cuanto al valor, se observó que los buques Gallegos fueron los que mejores precios consiguieron, ya que, aunque realizaron menos capturas promedio que los buques del País Vasco, consiguieron un mayor nivel de ingresos promedio. Esto se debió al precio de primera venta. En términos promedio, Cantabria fue la comunidad que mayor precio consiguió por la caballa (1,1 €/kg), seguida de Galicia (1€/kg), País Vasco (0,96€/kg), Asturias (0,89€/kg) y otras CCAA (0,87€/kg).

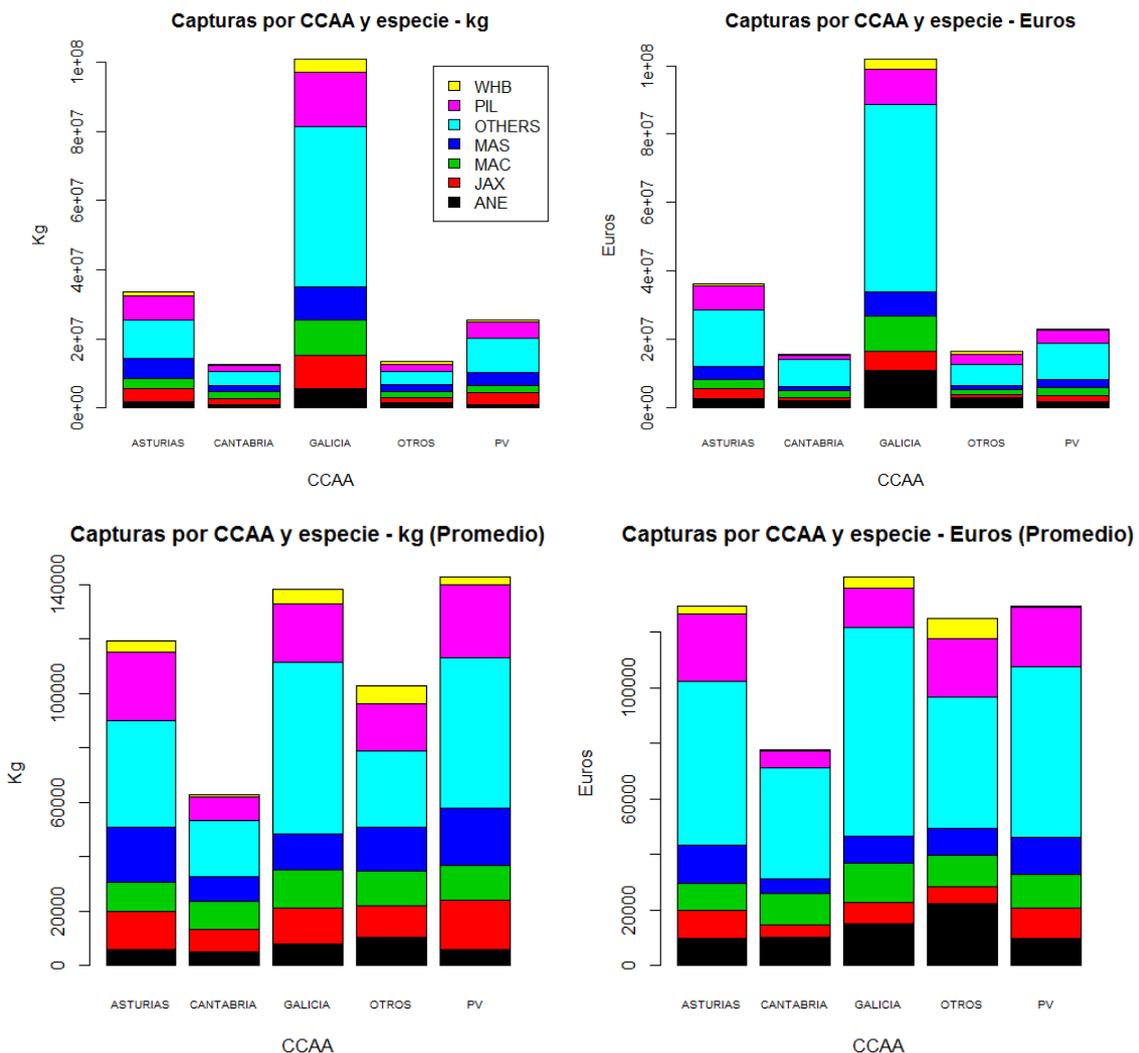


Figura 22: Capturas totales (arriba) y promedios (abajo) en toneladas y euros de los buques que en el año 2012 pescaron caballa por CCAA. Donde WHB = Bacaladilla, PIL = Sardina, MAS = Estornino, MAC = Caballa o verdel, JAX = Jurel y ANE = Anchoa.

6.5.2 Dependencia económica de la caballa

La dependencia de la caballa, medida como el valor obtenido por la caballa entre el valor total obtenido por el total de las descargas, para la flota de España en su conjunto fue de 10,12% en el 2012. En total la flota obtuvo por las descargas totales vendidas 193 millones de euros, de los cuales 19 millones correspondieron a la caballa.

Sin embargo la dependencia varió entre Comunidades Autónomas. En términos generales, la dependencia para Cantabria fue de 14,5%, para Galicia de 10,3%, para el País Vasco de 9,6%, para Asturias de 7,4% y para otros de 9%.

Sin embargo, dentro de cada CCAA la dependencia de este especie entre las diferentes flotas que lo capturan también puede variar, siendo algunas muy dependientes y otras muy poco dependientes. No se disponen de datos por flota – arte de pesca, por lo que en este apartado no se realiza este análisis. En el Anexo 1 se realiza un análisis preliminar para algunas comunidades autónomas de las que se disponen datos.

En la Figura 23 se puede observar la dependencia por buque. En Asturias la dependencia por buque promedio fue de 19%, en Cantabria fue de 34%, en Galicia de 31%, en el País Vasco un 26% y en el caso de otros de 30%.

Respecto a la distribución de la dependencia entre buques, se observa como Asturias presenta una gran desigualdad, el 10% de los buques tiene una dependencia mayor del 20% y el 70% de los buques tienen una dependencia menor del 3%. Esto se puede explicar porque en Asturias hay segmentos de flota muy poco y muy dependientes de la caballa. En el caso de Cantabria el perfil de dependencia de los buques no está tan polarizada como en el caso anterior. En esta región, el 25% de los buques tienen una dependencia mayor del 20% y un 65% tiene una dependencia menor al 3%. En el caso de Galicia, aquellos buques con una gran dependencia (>20%) representan el 22%, mientras que aquellos buques con una dependencia menor del 3% son el 61% de los buques. Según los datos aportados por la cofradía, en el año 2012 la dependencia de la flota de cerco fue muy baja, mientras que la de enmalle volantas superó el 50%. En el caso del País Vasco, la dependencia también está muy polarizada, con el 19% de los buques con una dependencia grande y el 63% con una dependencia menor al 3%.

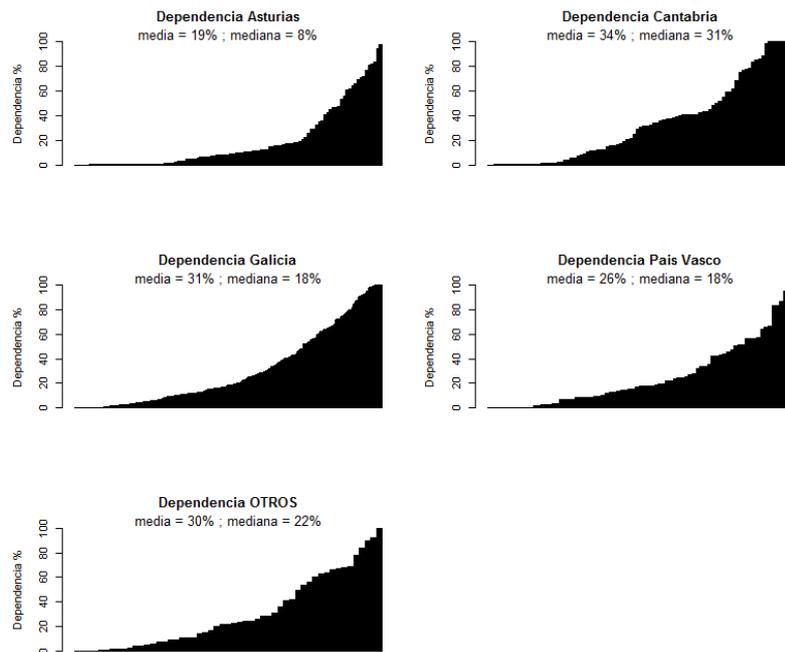


Figura 23: Dependencia por buque y por comunidad autónoma. Fuente: MAGRAMA y elaboración propia.

La mayor dependencia coincide con las mayores capturas, que en el 2012 se realizaron en febrero, con una dependencia de entre 66% (Cantabria) y 48% (Asturias) (Figura 24). En marzo, la dependencia también fue alta, situándose entre 38% (Cantabria) y 20% (Asturias). Hay que recordar aquí que la cuota correspondiente al año 2012, descontando la multa, fue particularmente reducida, por lo que la estacionalidad de la caballa puede estar distorsionada por el hecho de que se agotó la cuota relativamente rápido, por lo que no pudieron capturar a partir de abril más individuos.

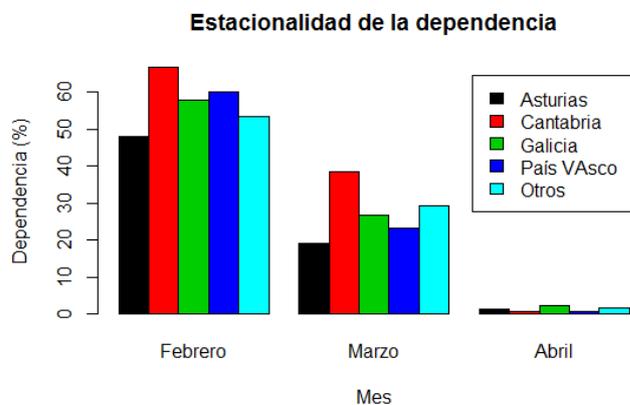


Figura 24: Estacionalidad por CCAA y mes. (Fuente: Magrama)

7. CONCLUSIONES

1. El 81% de las muestra de adultos de caballa fueron exitosamente muestreadas en el área del NEA. Este número es más que suficiente para cumplir los objetivos del trabajo.
2. Se recolectaron muestras de plancton (huevos y larvas de caballa) en la principal área de puesta de la caballa del NEA.
3. El tiempo post-mortem es el factor más importante a tener en cuenta para obtener un ADN de buena calidad.
4. El ADN obtenido de las muestras recogidas durante las diferentes campañas de muestreo tiene calidad suficiente para ser procesado mediante el método de RAD-seq.
5. La prueba piloto realizada con dos muestras ha permitido poner a punto el método de RAD-seq e indicado que el número de SNPs obtenido se corresponde con el número esperado.
6. Siguiendo los pasos optimizados durante la prueba piloto, se ha aplicado el método RAD-seq a más de 210 muestras provenientes de diferentes componentes y se está a la espera de recibir los resultados de la secuenciación para proceder con su análisis.
7. Existe diferenciación genética entre las poblaciones de caballa de Canadá, NEA y Mediterraneo. “El método es capaz de distinguir poblaciones genéticamente (incluso a menor escala dentro del Mediterráneo). Por primera vez se muestra aislamiento genético entre el Mediterráneo y el NEA”.
8. **No hay diferenciación genética** significativa entre los individuos de las componentes Sur y Oeste del Nordeste Atlántico . “Los análisis realizados con las

muestras estudiadas indican que no existe un comportamiento de homing en las componentes Sur y Oeste”.

9. Aparentemente se observa una tendencia al alza de la población de caballa, con un máximo claro en el año 2013. Sin embargo, al analizar sólo cuatro años, no se puede sacar ninguna conclusión definitiva.
10. La población de caballa se encuentra principalmente distribuida en la plataforma francesa, por debajo de los 100 m de sonda y por encima de los 45° N.
11. Se observa una tendencia de expansión de la población de caballa por la zona cantábrica a partir del año 2010.
12. Las tallas medias de los juveniles de caballa parecen disminuir con el tiempo, mientras que las de los adultos se mantienen.
13. La distribución espacial de edades de caballa no proporciona patrones claros.
14. Al norte de los 46° N predominan ligeramente los adultos y al sur del 46° N predominan los juveniles.
15. Continúa la presión pesquera sobre el stock de caballa por parte de los países del norte, como Islandia e Islas Feroes.
16. A pesar de ello, la estima de población de caballa tal como se deriva de la campaña de huevos del 2013, ha alcanzado un máximo histórico, correspondiéndole al componente Sur 1.200.000 toneladas.
17. Se prevén capturas de caballas muy superiores a los TAC recomendados por el grupo de trabajo de evaluación (WGWIDE).
18. El modelo de gestión para la evaluación de caballa genera escenarios a corto plazo no realistas y se alude a la falta de información de las capturas declaradas durante años como causantes de estos errores del modelo. En consecuencia, se rechazó la evaluación en el año 2013.

19. El análisis de la composición química del otolito indica que aunque se han observado diferencias significativas entre los individuos del componente Sur y Oeste la variabilidad entre las componentes es tan grande que no permite establecer una visión clara en las componentes de puesta de esta población. Se requeriría de análisis más profundos para poder determinar los factores que contribuyen a esta variabilidad.

20.

BIBLIOGRAFÍA

Abaunza, P., Villamor, B. and Pérez, J.R. 1995. Infestation by larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridata) in horse mackerel, *Trachurus trachurus* and Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, in ICES divisions VIIIb, VIIIv and IXa (N-NW of Spain). *Sci. Mar.* 59: 223-233.

Bakken, E. and Westgard T. 1986. Intermixture of the North Sea and Western Mackerel stocks determined by analysis of Norwegian tagging data. ICES CM 1986/M: 65, 18 p.

Campana, S.E. 1999. Chemistry and Composition of Fish Otoliths: Pathways, Mechanisms and Applications Marine Ecology Progress Series 188: 263-97.

Dawson, W.A.1986. Mackerel (*Scomber scombrus* L.) otolith L1 analysis as a method of stock separation. ICES CM 1986/H:24, 13p.

Dawson, W.A.1991. Otolith measurement as a method of identifying factors affecting first-year growth and stock separation of mackerel (*Scomber scombrus* L.). *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 47: 303-317.

Eltink, A.1988. *Anisakis* larvae (nematode: Ascaridida) in mackerel, *Scomber scombrus* L., in ICES sub-areas IV, VI, VII and VIII in 1970-1971 and 1982-1984. ICES CM 1988/H:23, 27p.

Fowler, A.J., Gillanders, B.M. and Hall, K.C. 2005. Relationship between Elemental Concentration and Age from Otoliths of Adult Snapper (*Pagrus Auratus*, Sparidae): Implications for Movement and Stock Structure Marine and Freshwater Research 56: 661-76.

ICES 1996. Report of the working group on the assessment of mackerel, horse mackerel, sardine and anchovy. ICES C.M. 1996/Assess: 7.

ICES 2012. Report of the working group on Widely Distributed Stocks (WGWIDE). ICES CM 2012/ACOM:15.

ICES 2012. Report of the working group on Mackerel and horse mackerel Egg Surveys (WGMEGS) CM 2012/SSGESST:04.

Iversen, S.A. and Skagen, D.W. 1989. Migration of western mackerel to the North Sea 1973-1988. ICES CM1989/H: 20,7 p.

Jansen, T., Campbell, A., Brunel, T. and Clausen, L.W 2013. Spatial segregation within the spawning migration of North Eastern Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) as indicated by juvenile growth patterns. PLoS ONE 8(2): e58114. doi: 10.1371/journal.pone.0058114.

Mackenzie, K. 1990. Cestode parasites as biological tags for mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the northeast Atlantic. J. Cons. Int. Explor. Mer. 46: 155-166.

Mackenzie, K. and Mehl, S. 1984. The cestode Parasite *Grillotia angeli* as a biological tag for mackerel in the eastern North Atlantic. ICES CM 1984/H:52, 13p.

Milton, D.A. and Chenery, S.R. 2003. Movement Patterns of the Tropical Shad Hilsa (*Tenualosa lisha*) Inferred from Transects of ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr Isotope Ratios in Their Otoliths Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60: 1376-85.

Nesbo, C.L., Rueness, E.K. et al. 2000. Phylogeography and population history of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): a genealogical approach reveals genetic structuring among the eastern Atlantic stocks. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 267 (1440): 281-292.

Reid, D. (coordinator) 1997. Final Report of Shelf Edge Fisheries and Oceanography Study (SEFOS). Project, Contract AIR No. CT93-1105. European institutes participants: SOAFD, FRC, IEO, AZTI, IPIMAR, PML, Centre Geostatistique Ecole des Mines de Paris, Institute für Meereskunde der Universitat Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland, RIVO, IFREMER, SAHFOS, Instituto Hidrografico.

Rooker, J.R., Secor D.H., DeMetrio, G., Schloesser, R., Block, B.A. and Neilson J.D. 2008. Natal Homing and Connectivity in Atlantic Bluefin Tuna Populations Science 322: 742-44.

Schloesser, R.W., Neilson, J.D., Secor, D.H. and Rooker, J.R. 2010. Natal Origin of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) from Canadian Waters Based on Otolith $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67: 563-69.

Secor, D.H., Henderson-Arzapalo, A. and Piccoli, P.M. 1995. Can Otolith Microchemistry Chart Patterns of Migration and Habitat Utilization in Anadromous Fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192: 15-33.

Somdal, O. and Schram, T.A. 1992. Ectoparasites on northeast Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.) from western and north sea stocks. *Sarsia* 77(1): 19:31.

Teixeira, A.S. and Jamieson, A. 1985. Scomber identification using lens protein pl. *ICES CM* 1985/H:68.

Uriarte, A. and Lucio, P. 2001. Migration of adult mackerel along the Atlantic European shelf edge from a tagging experiment in the south of the Bay of Biscay in 1994. *Fish. Res.* 50: 129-139.

Uriarte, A., Alvarez, P., Iversen, S., Molloy, J., Villamor, B. et al. 2001. Spatial pattern of migration and recruitment of North East Atlantic Mackerel. *ICES CM* 2001/O:17.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente las facilidades recibidas por los jefes de las campaña trienales de Alemania, Jens Ulleweit, Escocia, Finley Burns, Islas Faroes, Hogni Debes, y España/IEO, Pablo Carrera, para la recolección de ejemplares adultos y plancton. A Sergio López, Secretario de la Federación Provincial de Cofradías de Pescadores de Lugo, por el envío de muestras de adultos de caballa. Asimismo, agradecer a Jens y Finlay por el buen ambiente y trato recibido por las personas de AZTI que asistieron a sus campañas.