

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SIGNÁTIDOS EN LOS PARQUES NACIONALES MARÍTIMO-TERRESTRES DE LAS ISLAS ATLÁNTICAS DE GALICIA Y DEL ARCHIPIÉLAGO DE CABRERA

CARMEN BOUZA<sup>1,2</sup>, MANUEL VERA<sup>1,2</sup>, BELÉN G. PARDO<sup>1,2</sup>, MIQUEL PLANAS<sup>3</sup>,  
INÉS CASTEJÓN-SILVO<sup>4</sup>

## RESUMEN

Este proyecto abordó la caracterización genética de peces signátidos (caballitos de mar y peces pipa) en los Parques Nacionales Marítimo-Terrestres de las Islas Atlánticas de Galicia (Islas Cíes) y Archipiélago de Cabrera, así como en sus respectivas áreas adyacentes no protegidas (Ría de Vigo e Isla de Mallorca), mediante marcadores mitocondriales y microsatélite. El análisis genético entre 2016 y 2018 permitió identificar una diversidad de especies distribuidas diferencialmente en los Parques Nacionales y áreas adyacentes, con presencia muy limitada de caballitos de mar (*Hippocampus guttulatus*) y preferente de peces pipa (*Syngnathus acus*, *S. abaster*, *S. typhle*, *Entelurus aequoreus*, *Nerophis lumbriciformis*, *N. maculatus* y *N. ophidion*). La integración de datos genéticos y morfológicos permitió clarificar dificultades de identificación *in situ* entre algunas especies, así como detectar un linaje críptico diferenciado de *S. abaster* en el Archipiélago de Cabrera respecto a poblaciones mediterráneas más orientales de esta especie. Para cada especie, se evaluaron los niveles de diversidad y estructura genética poblacional, aportando información útil para la trazabilidad individual y como base para delinear unidades de gestión. En las especies con distribución preferente en cada Parque Nacional se detectaron signos de estabilidad genética poblacional a escala temporal y flujo génico con áreas adyacentes, pero diferenciación significativa entre poblaciones atlánticas y mediterráneas de las especies analizadas en ambas vertientes. El análisis de asignación parental de progenies de peces pipa en las Islas Cíes y su área adyacente demostró eventos de maternidad múltiple, compatible con un sistema de apareamiento genético polígamo preferente en estas poblaciones. Este estudio aporta datos genéticos de referencia útiles para el futuro seguimiento y conservación de las poblaciones de signátidos presentes en áreas marinas protegidas, como reservorios de ecosistemas y hábitats valiosos a los que se encuentran asociados.

**Palabras clave:** Marcadores moleculares, ADN microsatélite, haplotipos mitocondriales, identificación de especies, diversidad genética, estructura genética, unidades de conservación, Syngnathidae, caballitos de mar, peces pipa.

<sup>1</sup> Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidade de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, Av. Carvalho Calero s/n, 27002 Lugo. mcarmen.bouza@usc.es

<sup>2</sup> Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC), Departamento de Ecología y Recursos Marinos, Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España.

<sup>4</sup> Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (IMEDEA-CSIC-UIB), Miquel Marqués 21, 07190 Esporles, España.

# GENETIC CHARACTERIZATION OF SYNGNATHIDS IN THE MARITIME AND TERRESTRIAL NATIONAL PARKS OF THE ATLANTIC ISLANDS OF GALICIA AND CABRERA ISLANDS

## ABSTRACT

This project addressed a genetic evaluation of syngnathid fish (seahorses and pipefish) in the Maritime and Terrestrial National Parks of the Atlantic Islands of Galicia (Cíes Islands) and the Cabrera Archipelago, as well as their respective adjacent unprotected areas (Ría de Vigo and Majorca Island), using mitochondrial and microsatellite markers. The genetic analysis between 2016 and 2018 identified a diversity of species distributed differentially in the National Parks and adjacent areas, with limited presence of seahorses (*Hippocampus guttulatus*) and predominance of pipefish (*Syngnathus acus*, *S. abaster*, *S. typhle*, *Entelurus aequoreus*, *Nerophis lumbriciformis*, *N. maculatus* and *N. ophidion*). Integrative genetic and morphological data allowed clarifying *in situ* identification difficulties between some species and detecting a cryptic differentiated lineage of *S. abaster* in Cabrera Islands with respect to more eastern Mediterranean populations of this species. The levels of population genetic diversity and structure were evaluated within each species, providing useful information to trace individuals, and as a basis for delineating management units. For preferential species in each National Park, signs of population genetic stability were detected on a temporal scale and gene flow with adjacent areas, but significant differentiation between Atlantic and Mediterranean populations of the species analyzed in both slopes. Parental assignment analysis of pipefish progenies in the Cíes Islands and their adjacent area demonstrated multiple maternity events, compatible with a preferential polygamous genetic mating system in these populations. This study provides useful reference genetic data for future monitoring and conservation of syngnathid populations in marine protected areas, as reservoirs of valuable associated ecosystems and habitats.

**Keywords:** Molecular markers, Microsatellite DNA, Mitochondrial haplotypes, species identification, genetic diversity, genetic structure, conservation units, Syngnathidae, seahorses, pipefish.

## INTRODUCCIÓN

Los peces signátidos (Familia Syngnathidae) presentes en las costas europeas engloban distintas especies de caballitos de mar y peces pipa, carismáticas por su singularidad morfológica y de camuflaje, así como por su estrategia reproductiva con incubación embrionaria masculina (KUITER, 2009). El estado de conservación de este grupo ha suscitado interés y preocupación, estando amenazados por la sobreexplotación y capturas accidentales, pero especialmente por la degradación y fragmentación de hábitats costeros por efectos antropogénicos y cambio

climático (IUCN 2020). Todas las especies de caballitos de mar están catalogadas como amenazadas por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES 2020), e incluidas en listados de protección nacionales y regionales de distintos países europeos, incluyendo el litoral español (OSPAR 2008; LÓPEZ *et al.* 2015; IUCN 2020). Los signátidos viven asociados a hábitats costeros vegetados, que engloban comunidades vulnerables de especial protección como macroalgas y praderas de angiospermas marinas (WAYCOTT *et al.* 2009). Sin embargo, para muchas especies de signátidos el conoci-

miento sobre aspectos biológicos y ecológicos, básicos para definir su estado de conservación e implementar medidas de protección, es aún escaso. Según la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN), la mayoría de especies de caballitos de mar y peces pipa con distribución europea se categorizan como deficientes en datos o con tendencia poblacional desconocida. Así, se destaca la necesidad de investigación sobre distribución y tamaño de sus poblaciones y de los hábitats asociados, con énfasis en praderas marinas para determinar el alcance de su declive (IUCN 2020).

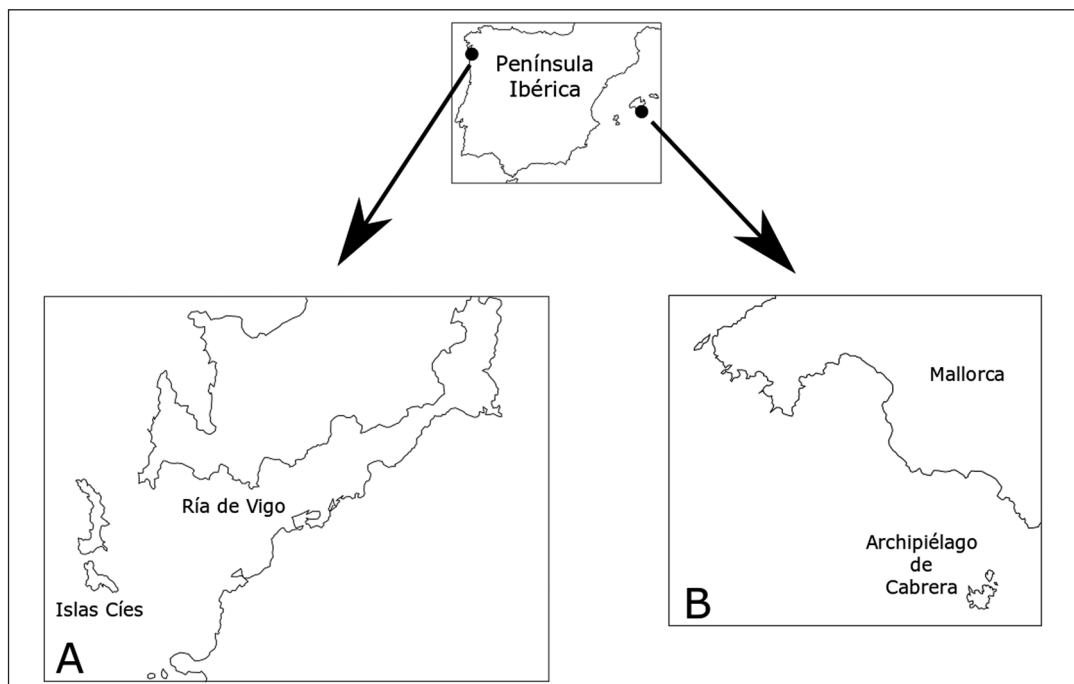
El mantenimiento de la biodiversidad en sus diferentes niveles, ecosistemas, especies y diversidad genética es esencial para asegurar la persistencia de los hábitats costeros marinos. El análisis genético con marcadores moleculares representa una estrategia de apoyo en programas de conservación, con distintas aplicaciones, tales como resolver aspectos taxonómicos y evolutivos, evaluar diversidad genética a escala espacial y temporal, y definir unidades de conservación (ALLENDDORF *et al.* 2013). El análisis de ADN mitocondrial ha permitido clarificar la identificación específica en distintos signátidos con problemas de discriminación morfológica (WILSON *et al.* 2001; LÓPEZ *et al.* 2010; HALBLÜTZEL & WILSON 2011; SANNA *et al.* 2013; SOGABE & TAKAGI 2013; OTERO-FERRER *et al.* 2015; WOODALL *et al.* 2018). La aplicación de marcadores moleculares también ha contribuido al conocimiento de la diversidad genética en distintos signátidos con distribución europea (WILSON & VERAGUTH 2010; LÓPEZ *et al.* 2010; 2015; WOODALL *et al.* 2011; 2015; RIQUET *et al.* 2019). Los marcadores de tipo microsatélite han mostrado gran potencial informativo en estudios poblacionales y genealógicos, estando disponibles en distintos signátidos europeos, incluyendo caballitos de mar (PARDO *et al.* 2007; LOPEZ *et al.* 2010, 2015) y algunos peces pipa (*S. typhle*, WILSON & VERAGUTH 2010; *S. abaster*, DIEKMANN *et al.* 2009; *N. lumbriciformis*, MONTEIRO *et al.* 2014). Los estudios de trazabilidad familiar han permitido analizar el sistema de apareamiento en signátidos, de interés evolutivo y conservacionista (JONES *et al.* 1999; RISPOLI & WILSON 2008; HÜBNER *et al.* 2013; LOPEZ *et al.* 2012; 2015; MONTEIRO *et al.* 2017).

Los Parques Nacionales (PN) Marítimo-Terrestres españoles albergan una gran riqueza de biodiversidad marina, incluyendo importantes comunidades vegetales asociadas con la supervivencia de diferentes especies de peces y moluscos. Los peces signátidos representan un grupo emblemático que puede contribuir como indicador de respuesta temprana (GILBY *et al.* 2017) a la conservación de la biodiversidad marina en estos hábitats costeros. Sin embargo, el conocimiento biológico, de distribución y abundancia de peces signátidos y sus hábitats en estas áreas marinas protegidas ha sido muy escaso (PLANAS *et al.* 2022), particularmente a nivel genético, en ausencia de estudios previos. El presente proyecto abordó la caracterización genética de los signátidos identificados en los Parques Nacionales Marítimo-Terrestres de las Islas Atlánticas de Galicia (PNMTIAG) y del Archipiélago de Cabrera (PNMTAC), aplicando marcadores moleculares para apoyar la identificación de especies y evaluar la diversidad y conectividad genética poblacional, como base para definir unidades de conservación. Este estudio se enmarca en una investigación coordinada multidisciplinar para la evaluación global de la distribución de signátidos y sus hábitats en PNMTIAG y PNMTAC para contribuir al conocimiento científico y a la protección de estas especies, y de los ecosistemas costeros vulnerables a los que se encuentran asociados (PLANAS *et al.* 2022).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

El estudio se realizó en la costa oriental de las Islas Cíes, en el Parque Nacional Marítimo-Terrestre de las Islas Atlánticas de Galicia (PNMTIAG, Galicia), y en el Archipiélago de Cabrera, en el Parque Nacional Marítimo-Terrestre del Archipiélago de Cabrera (PNMTAC, Islas Baleares), así como en áreas marinas adyacentes no protegidas, potencialmente conectadas como parte del mismo acervo genético (Ría de Vigo e Isla de Mallorca, respectivamente; ver Fig. 1). La información detallada de las áreas muestreadas se describe en PLANAS *et al.* (2022). Se realizaron muestreos genéticos periódicos entre 2016 y 2018, integrando la identificación morfológica *in*



**Figura 1.** Mapa de localización de las áreas estudiadas: Islas Cíes y zonas adyacentes (A) y Archipiélago de Cabrera y zonas adyacentes (B). Información detallada de las áreas muestreadas se describe en PLANAS *et al.* (2022).

**Figure 1.** Location map of studied areas for Islas Cíes and adjacent areas (A) and Archipiélago de Cabrera and adjacent areas (B). Detailed information on the sampling areas is described by PLANAS *et al.* (2022).

*situ* de las especies avistadas durante los censos visuales (2-21,5 m profundidad), y los ejemplares posteriormente liberados (PLANAS *et al.* 2022). De cada individuo se recogió una pequeña porción de tejido (si posible, no invasiva de aleta dorsal) en etanol al 95% para posterior análisis genético (LÓPEZ *et al.* 2015). En PNMTAC y Mallorca el pequeño tamaño de los individuos forzó a un cambio de método, utilizando pescas con gánguil en las campañas de 2017 y 2018 (PLANAS *et al.* 2022). No hubo capturas del género *Hippocampus* en PNMTAC, las muestras analizadas fueron encontradas sin vida, conservadas y facilitadas a IMEDEA por personal interesado en el medio marino ajeno al proyecto.

Las muestras genéticas con identificación morfológica durante los censos visuales incluyeron distintos signátidos (PLANAS *et al.* 2022). En la Tabla 1 se presentan las especies identificadas genéticamente y analizadas en este estudio, confirmando la clasificación morfológica, tras revisar

unos pocos casos discordantes o descartar algunas muestras por deficiente calidad de ADN (ver Resultados). El muestreo genético incluyó presencia escasa de caballitos de mar *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829) (Subfamilia Hippocampinae) y preferente de peces pipa de dos grupos filogenéticamente divergentes (HAMILTON *et al.* 2017): i) *Syngnathus acus* (Linnaeus, 1758), *S. typhle* (Linnaeus, 1758), *S. abaster* (Risso, 1827) (Subfamilia Syngnathinae), y ii) *Nerophis lumbriciformis* (Jenyns, 1835), *N. maculatus* (Rafinesque, 1810), *N. ophidion* (Linnaeus, 1758), *Entelurus aequoreus* (Linnaeus, 1758) (Subfamilia Nerophinae).

En PNMTIAG y Ría de Vigo se analizaron muestras de embriones/juveniles recién nacidos de machos de *S. acus* (6 en Ría de Vigo, 2016; 2, 4 y 8 en PNMTIAG en 2016, 2017 y 2018, respectivamente) y *S. typhle* (6 en Ría de Vigo), en promedio 14 embriones por lote, con objeto de realizar estudios de asignación parental y sistema de apareamiento genético.

Localización / Especie	Código	2016	2017	2018	N
1. RÍA VIGO					109
<i>Syngnathus acus</i>	SA1	41			
<i>S. typhle</i>	ST1	33			
<i>Nerophis lumbriciformis</i>	NL1	35			
2. PNMTIAG-CIES					192
<i>S. acus</i>	SA2	22	70	82	
<i>Hippocampus guttulatus</i>	HG2	4	6		
<i>Entelurus aequoreus</i>	EA2		4	4	
3. PNMTAC					71
<i>S. typhle</i>	ST3		13	6	
<i>S. abaster</i>	SAB3	6	10	22	
<i>N. maculatus</i>	NM3	1	1	5	
<i>N. ophidion</i>	NO3		1	6	
4. MALLORCA					46
<i>S. typhle</i>	ST4		13	11	
<i>N. maculatus</i>	NM4		2	15	
<i>S. abaster</i>	SAB4			2	
<i>H. guttulatus</i>	HG4			1	
<i>S. acus</i>	SA4			2	
TOTAL					418

**Tabla 1.** Muestras genéticas de signátidos en los Parques Nacionales de Islas Atlánticas, Islas Cíes (PNMTIAG-CÍES) y Archipiélago de Cabrera (PNMTAC), y áreas adyacentes (Ría Vigo e Isla Mallorca). N: tamaño muestral.

**Table 1.** Genetic sampling of syngnathids in the National Parks of Atlantic Islands, Cíes Islands (PNMTIAG-CÍES) and Cabrera Islands (PNMTAC), and adjacent areas (Ría de Vigo and Mallorca Island). N: Sampling size.

Para la extracción de ADN genómico, se ajustaron protocolos para muestras de tamaño reducido en caballito de mar, mediante kits de purificación y amplificación genómica (LÓPEZ *et al.* 2010; 2015). En muestras de embriones individuales de *S. acus* y *S. typhle* se aplicó un protocolo basado en resina Chelex (LÓPEZ *et al.* 2015).

#### Marcadores de ADN mitocondrial (ADNmt)

Se seleccionaron los marcadores citocromo b (Cytb) y ADN ribosómico 16S (16S-rDNA), informativos en estudios filogenéticos y poblacionales en signátidos (WILSON *et al.* 2001; LÓPEZ *et al.* 2010). Para amplificar Cytb en peces pipa del género *Syngnathus* se usaron cebadores universales, L14275F (PÄÄBO *et al.* 1991) y H15926R

(WILSON *et al.* 2001), con una modificación específica de condiciones en *E. aequoreus* (BRAGA-GONÇALVES *et al.* 2017). En *H. guttulatus* se usaron cebadores específicos, SHORSE5.3L (CASSEY *et al.* 2004) y GUTCYTBR (WOODALL 2009/2015). En peces pipa del género *Nerophis*, por dificultades de amplificación de Cytb, se analizó 16S-rDNA mediante cebadores universales (16Sa-L2510, 16Sb-H3080; PALUMBI *et al.* 1991). La amplificación se ajustó siguiendo protocolos previos (LÓPEZ *et al.* 2010), en reacciones de 50 µl: 1X tampón, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dNTPs, 0,2 µM cebador, 1 U Taq polimerasa (Bioline AgroScience, Cytb; Applied Biosystems, 16S-rDNA), salvo 1,25 U para *H. guttulatus*. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C - 5 min; 33 ciclos de 93°C - 1 min, 50°C - 1 min (48°C

en *E. aequoreus*), 72°C - 3 min y extensión a 72°C - 10 min. En *H. guttulatus* se aplicaron condiciones específicas: 94°C - 2 min; 35 ciclos de 94°C - 30 s, 50°C - 30 s, 72°C - 1 min; y extensión a 72°C - 2 min. Los fragmentos amplificados se purificaron con Exo-SAP (USB) y secuenciaron con "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing" mediante secuenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) en la Unidad de Secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo (US Lugo-USC).

La revisión manual de secuencias y detección de posiciones nucleotídicas variables se realizó con SEQSCAPE 4.0 (Applied Biosystems), usando secuencias de referencias de signátidos del Atlántico Noreste depositadas en GenBank (ver Resultados), tanto de Cytb como 16S-rDNA. El alineamiento múltiple de las secuencias y su edición se realizó con BIOEDIT 7.0 (HALL 1999). Los haplotipos (i.e. secuencias únicas) se detectaron con el programa DNASP 5.10 (LIBRADO & ROZAS 2009). Los archivos de posiciones variables y las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron con el programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.* 2016), con el método Neighbor-Joining (NJ) y la significación de nodos testados mediante "Bootstrap" (1.000 réplicas). Con el programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER 2010), se analizó la variación de las secuencias por población y especie mediante el número de haplotipos (H), la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica ( $\pi$ ), así como el componente de diferenciación interpoplacional ( $\Phi_{ST}$ ).

### Marcadores de ADN microsatélite

Se ajustaron paneles múltiples de microsatélites por especie utilizando cebadores de diferentes signátidos. En caballitos de mar se utilizaron 12 microsatélites (Tabla 2), siguiendo protocolos previos (LÓPEZ *et al.*, 2010; 2015). En peces pipa se seleccionaron 19 loci aislados en diferentes especies con distribución europea: *S. typhle* (Styph12, WILSON & VERAGUTH 2010; Syty4, 16-18, 22, 24, ROTH *et al.* 2012), *S. abaster* (Sabas3, 5, 7-9; DIEKMANN *et al.* 2009) y *N. lumbriciformis* (NL00629, NL00750, NL02383, NL05025, NL06490, NL07690, NL12901 y NL16858; MONTEIRO *et al.* 2014). Con criterios técnicos, de polimorfismo y rango alélico, se ajustaron sub-

conjuntos de loci para optimizar el potencial informativo en las distintas especies de peces pipa. En la subfamilia Syngnathinae se ajustaron dos reacciones múltiples (M1 y M2) para un total de nueve loci en *S. typhle* y *S. acus*, y siete en *S. abaster* (Tabla 2). En las especies de la subfamilia Nephroinae se ensayaron dos reacciones múltiples (M1 y M2) de tres y cinco loci (Tabla 2). De estos ocho marcadores analizados en la especie de origen (*N. lumbriciformis*) y *E. aequoreus*, cinco amplificaron en *N. maculatus* y *N. ophidion* (Tabla 2). Las reacciones PCR de 10µl incluyeron 30 ng de ADN, 1x "Master Mix kit Go Taq G2 Hot Start Colorless" (Promega) y concentración específica por cebador (Tabla 2). Las condiciones de PCR fueron: 95°C - 2 min, seguido de 25 ciclos (30 en *E. aequoreus*, *N. maculatus* y *N. ophidion*) de 94°C - 30 s, temperatura de hibridación específica 90 s (Tabla 2) y 72°C - 1 min, con extensión final a 72°C - 5 min.

Para el análisis genético de muestras embrionarias de machos gestantes de *S. acus* y *S. typhle* en PNMTIAG y áreas adyacentes, se seleccionaron cinco microsatélites informativos como herramienta coste-efectiva. En *S. acus*, se amplificó el panel específico M1, más el locus Sabas8 del panel M2 mediante PCR simple (reacción de 15 µl con 30 ng de ADN molde, 1x "Gold Buffer", 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 2 µM de cada cebador, 0,5 U "Ampli Taq Gold® DNA Polymerase" (Applied Biosystems)). En *S. typhle* se amplificó el panel M1 más dos loci del panel M2 (Sabas7 y Sabas8). En cada especie se usaron las condiciones PCR específicas de los paneles M1 y M2 (Tabla 2).

Los marcadores microsatélite se genotiparon mediante secuenciador automático ABI PRISM® 3730xl (Applied Biosystems) con GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) en la US Lugo-USC. A partir de los genotipos se estimaron las frecuencias génicas y realizaron los análisis de diversidad genética poblacional. La fiabilidad de genotipado y presencia de alelos nulos se evaluó con MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004). Mediante el programa GENEPOP 4.04.7 (ROUSSET 2008) se testó equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y desequilibrio de ligamiento (LD) por población y global, aplicando corrección de Bonferroni. Se estimó la diversidad genética

Caracterización genética de signátidos en los Parques Nacionales marítimo-terrestres de las Islas Atlánticas de Galicia y del Archipiélago de Cabrera

Especie	Panel múltiple 1 (M1)			Panel múltiple 2 (M2)		
	Locus <sup>a</sup>	Cebador <sup>b</sup>	T(°C)	Locus <sup>a</sup>	Cebador <sup>b</sup>	T(°C)
<b>Caballitos mar</b>						
<i>Hippocampus guttulatus</i>	Hgu-USC5	1 (N)	54	Hgu-USC2	1 (N)	54-63
	Hgu-USC6	1,5 (V)		Hgu-USC4	1 (F)	
	Hgut-USC7	1,5 (F)		Hgu-USC9	1 (V)	
	Hgut4	1 (F)		Hgu-USC12	1 (V)	
	[Hgut6]	1 (F)	60	Hgu-USC13	1(F)	
				Hcaq25	1,5 (P)	
			Hcaq36	1,5 (P)		
<b>Peces Pipa</b>						
<i>Syngnathus typhle</i>	Styph12	2 (V)	55	Syty4	2 (V)	58
	Syty24	2 (F)		Syty16	2 (F)	
	Sabas3	2,5 (N)		Syty17	2 (V)	
				Syty22	2 (N)	
				Sabas7	2 (F)	
			Sabas8	2,2 (P)		
<i>S. acus</i>	Syty18	2 (F)	55	Syty4	2 (V)	58
	Syty24	2 (F)		Syty16	2 (F)	
	Sabas3	2 (N)		Syty22	2 (N)	
	Sabas5	2 (F)		Sabas7	2 (F)	
				Sabas8	2 (P)	
<i>S. abaster</i>	Styph12	2,5 (V)	55	Sabas4	2 (V)	58
	Sabas3	2 (N)		Syty22	2 (N)	
	Sabas5	2 (F)		Sabas7	2 (F)	
	Sabas9	2 (P)				
<i>Nerophis lumbriciformis</i>	NL02383*	1,3 (V)	56 (54 <sup>c</sup> )	NL00750	1,3 (F)	56
<i>Enterulus aequoreus</i> <sup>c</sup>	NL16858*	1,3 (F)		NL07690*	1,3 (F)	
<i>N. maculatus</i> <sup>*c</sup>	NL05025*	2,2 (N)		NL00629*	1,3 (V)	
<i>N. ophidion</i> <sup>*c</sup>				NL06490	2,2 (N)	
				NL12901	2,2 (P)	

<sup>a</sup> PARDO *et al.* 2007, Hgu-USC; GALBUSERA *et al.* 2007, Hcau; VAN DE VLIET *et al.* 2009, Hgut; WILSON y VERAGUTH 2010, Styph; ROTH *et al.* 2012, Syty; DIEKMANN *et al.* 2009, Sabas; MONTEIRO *et al.* 2014, NL; <sup>b</sup> µM (Fluoróforo; P-PET, V-VIC, N- NED, F-6-FAM (™Applied Biosystems)); <sup>c</sup> Temperatura Hibridación; \* Amplificación cruzada positiva

<sup>a</sup> PARDO *et al.* 2007, Hgu-USC; GALBUSERA *et al.* 2007, Hcau; VAN DE VLIET *et al.* 2009, Hgut; WILSON y VERAGUTH 2010, Styph; ROTH *et al.* 2012, Syty; DIEKMANN *et al.* 2009, Sabas; MONTEIRO *et al.* 2014, NL; <sup>b</sup> µM (Fluorophore; P: PET, V: VIC, N: NED, F: 6-FAM (Applied Biosystems)); <sup>c</sup> T: Annealing temperature. \* Positive cross amplification.

**Tabla 2.** Marcadores microsatélites analizados en signátidos en los Parques Nacionales.

**Table 2.** Microsatellite markers assayed in syngnathids of the National Parks.

por locus y población mediante FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 2001): número de alelos por locus (A), riqueza alélica (AR), heterocigosis esperada (He), índice de fijación ( $F_{IS}$ ). El tamaño efectivo ( $N_e$ ) se estimó con NeEstimator 2.1 (DO *et al.* 2014). El componente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) global y entre pares de poblaciones se estimó mediante FSTAT, utilizando 5.000 iteraciones. La estructura genética se analizó mediante STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.* 2000), explorando un número de grupos (K) entre 1 y el número de muestras poblacionales más 1, con 10 repeticiones por K (30.000 ciclos "burn-in", 80.000 iteraciones). Las probabilidades de valores K se analizaron con STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 (EARL & VONHOLDT, 2012) y la integración de agrupamientos para diferentes K con CLUMPAK (KOPELMAN *et al.*, 2015). En *H. guttulatus* en PNMTIAG se realizaron análisis de asignación individual a poblaciones de referencia de estudios previos del NO Ibérico (LÓPEZ *et al.* 2015) mediante GENECLASS2.0 (PIRY *et al.* 2004). Los estimadores globales de diversidad genética poblacional por especie (A,  $H_o$ , He) y potencial informativo (PIC), así como las probabilidades teóricas de no-exclusión (NE) parental (P), de parientes (SI) e individual (I) se estimaron con el programa CERVUS 3.0.7 (KALINOWSKI *et al.* 2007). El parentesco molecular entre pares de individuos ( $r$ ) se analizó con el estimador de WANG (2002) mediante el programa SPAGEDI (HARDY & VEKEMANS 2002), aplicando valores umbral esperados (no relacionados,  $r < 0,125$ ; alto parentesco -primer orden (tipo FS "full sibs")-,  $r > 0,375$ ; LÓPEZ *et al.* 2015). Las relaciones familiares entre progenies, la compatibilidad con genotipos parentales y la inferencia de genotipos maternos respecto al total de hembras adultas muestreadas se evaluaron mediante COLONY (JONES & WANG 2010).

## RESULTADOS

### Variabilidad mitocondrial y relaciones filogenéticas

La secuenciación de marcadores de ADNmt permitió complementar los análisis de identificación de especies y variabilidad genética poblacional. En peces pipa del género *Syngnathus*

se analizó un fragmento del gen *Cytb* de 1149 pares de bases (pb). En los ejemplares de *S. acus* en PNMTIAG-Cíes y Ría de Vigo se detectaron 40 haplotipos, con 51 posiciones variables (Fig. 2). Un haplotipo (*Cytb\_SA13*) resultó idéntico a la referencia GenBank AF356040 de esta especie procedente de Suecia (WILSON *et al.* 2001), utilizada para los alineamientos de *S. acus* y *S. typhle*. Los haplotipos más frecuentes en PNMTIAG-Cíes (*Cytb\_SA02*, *Cytb\_SA14*) fueron comunes en Ría de Vigo, aunque con presencia también de haplotipos raros. En *S. typhle* se detectaron 39 haplotipos con 55 posiciones variables (Fig. 3), con haplotipos propios en cada PN, 16 de ellos en PNMTIAG-Cíes (*Cytb\_ST01* - *Cytb\_ST16*), siendo *Cytb\_ST05* y *Cytb\_ST21* los más frecuentes en PNMTIAG y PNMTAC, respectivamente, aunque la mayoría de haplotipos (30) presentaron muy baja frecuencia en ambos PN. En los ejemplares de *S. abaster* analizados en PNMTAC y Mallorca se detectaron 8 haplotipos (*Cytb\_SAb01*- *Cytb\_SAb08*) con 23 posiciones variables (Fig. 4). *Cytb\_SAb01* fue idéntico al detectado en dos ejemplares identificados morfológicamente como *S. rostellatus* en PNMTAC (*Cytb\_SR01*), que fueron reclasificados como *S. abaster*. Estos individuos corresponden al primer año de muestreo y sugieren cautela en futuras identificaciones visuales para estas especies, especialmente con individuos de pequeño tamaño y en equipos poco entrenados. En el análisis filogenético se detectaron grupos monofiléticos para cada una de las especies analizadas en este estudio, *S. acus*, *S. typhle* y *S. abaster*, este último más relacionado con *S. typhle* (Fig. 5). Los haplotipos de *S. abaster* en PNMTAC no se agruparon con secuencias GenBank de esta especie procedentes de Italia (MWALE *et al.* 2013), ni con otras especies de peces pipa con distribución mediterránea, aunque más próximos a *S. typhle* y *S. taenionotus*, que a *S. acus* y *S. rostellatus* (Fig. 6).

Varios peces pipa de la subfamilia Nerophinae mostraron amplificación y secuenciación pobre para *Cytb*, substituyéndose por el marcador 16S-rDNA. En el género *Nerophis* se usó la secuencia 16S-rDNA de *N. ophidion* (GenBank AF354994) para alinear un fragmento de 521 pb, con 95 posiciones variables y 3 indels (Fig. 7). En *N. lumbriciformis* en Ría de Vigo se detectaron 4 haplotipos (16S\_NL01-16S\_NL04). En *N. maculatus* del



	112222	3333444555	5555566777	7778888999	9990000000	1111111 1
	1467051338	3577579144	5668928457	8896677036	6880334466	9
	0568263177	9456652626	5893460860	7952746080	3170351526	7
<i>S. acus</i> (AF356040)	CTATGATACT	ACTAGGCTTC	AGCAACATTC	GTTCATATGG	ATAACACGAA	T
Cytb_SA01	.....	.....	.A.....	.....	.....G.....	.....
Cytb_SA02	.....	.....	..T.....	..T.....	.....T.....	.....
Cytb_SA03	.....	.....	.A.....T	.....	.....	.....
Cytb_SA04	..A.....	.....	.A.....C.	.....	.....	.....
Cytb_SA05	..A.....	.....	.A.....	.....	.....	.....
Cytb_SA06	.....	..A.....	.A.....	.....	.....A.....	.....
Cytb_SA07	.....	.....	.....	..T.....	..T.T.....	.....
Cytb_SA08	.....	.....	..T.....	..T.G.....	.....T.....	.....
Cytb_SA09	.....	.....	..T..T.C.....	..T.....	.....T..G.....	.....
Cytb_SA10	.....	.....	G..T.....	..T.....	T.....T.....	.....
Cytb_SA11	.....	.....	..T.....T	..T.....	.....T.....	.....
Cytb_SA12	.....	.....C.....	.A.....	.....	.....	.....
Cytb_SA13	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cytb_SA14	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....
Cytb_SA15	.....	.....	..T.....	..T.....	..T.T.....	.....
Cytb_SA16	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cytb_SA17	TC.....	.....	..T.....	..T.....	.....T.....	.....
Cytb_SA18	.....	.....	.A.....G.....	.....	.....	.....
Cytb_SA19	.....	.....	.A.....T	.....	..G.....	.....
Cytb_SA20	.....	..A.....	.....	.....	.....	.....
Cytb_SA21	.....C.....	.....	.....	A.....	.....	.....
Cytb_SA22	.....	.....	..T.....	..T.....	T.....T.....	C
Cytb_SA23	.....G.....	.....	.A.....	.....	.....	.....
Cytb_SA24	.....	.....	.A.....	.....	.....G.....	.....
Cytb_SA25	.....	.....A.....	..T.....	..T.....	.....T.....	.....
Cytb_SA26	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
Cytb_SA27	.....	.....	..T.....	..T.....C	.....T.....	.....
Cytb_SA28	.....	.....	..T.....	.....	.....	.....
Cytb_SA29	..A.....	.....	.A.....C.....	.....	.....	.....
Cytb_SA30	..A.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cytb_SA31	.....	.....	..T.....	..T.....	T.....T.....	.....
Cytb_SA32	.....	.....	..T.....	..T.....	..G..T.....	.....
Cytb_SA33	.....	.....	..T.....	..T.....A.....	.....T.....	.....
Cytb_SA34	.....	.....	.A.....	.....	.....C.....	.....
Cytb_SA35	..A.....	.....	.A.....C.....	.....	.....	.....
Cytb_SA36	.....	.....	.A.....	.....	..CG.....	.....
Cytb_SA37	.....	.....	.A.....	.....	.....G.....	.....
Cytb_SA38	..C.T..T.	GTC.A.G..T	C..GG..C.	..C.T.GC..	.....G.....	.....
Cytb_SA39	.....	..G.....	..T.....	..T.....	..T.T.....	.....
Cytb_SA40	..G.....	.....	.A.....	.....	.....	.....

Figura 2. Haplotipos del marcador mitocondrial Citocromo b (Cytb) de *Syngnathus acus* detectados en Parques Nacionales y áreas adyacentes

Figure 2. Haplotypes of the mitochondrial marker Cytochrome b (Cytb) of *Syngnathus acus* detected in National Parks and adjacent areas

PNMTAC y Mallorca se encontraron 5 haplotipos, siendo 16S\_NM01 el más abundante. En *N. ophidion* en PNMTAC y Mallorca, dos ejemplares se identificaron y revisaron genéticamente (uno como *S. abaster*, y otro como *N. maculatus*). Recíprocamente un *S. abaster* en PNMTAC fue identificado genéticamente como *N. ophidion*, y un *N. maculatus* como *N. ophidion*, apuntando cierta dificultad de discriminación morfológica *de visu* para *Nerophis* de pequeño tamaño con rasgos morfológicos poco diferenciados. En los ejemplares identificados genéticamente como *N. ophidion* el haplotipo más abundante fue 16S\_NO02, idéntico

a la referencia AF354994 de Suecia (Wilson *et al.* 2001). El árbol filogenético agrupó en tres clados monofiléticos los haplotipos de las tres especies del género *Nerophis* (Fig. 8).

En ejemplares *E. aequoreus* de PNMTIAG, para el fragmento 16S-rDNA de 565 pb, se detectaron 3 haplotipos con 2 posiciones variables (Fig. 9), el más abundante (16S\_EA01) idéntico a la referencia para esta especie (GenBank KY065539) en Noruega (HAMILTON *et al.* 2017). Además, para un fragmento alineado de Cytb de 900 pb respecto a la secuencia GenBank KY857646 de la costa atlántica europea (BRAGA-GONSALVES

	122333	3334444444	5555555556	6666677777	7889999990	1 11111
	278245026	8990227799	0011566691	2336700459	9110346993	45791
	4824436657	7062391758	1806823845	8099102465	8365353683	40986
Cytb_ST01	AGAAAGTGCTG	GCCAACCTTAC	CGCTCATGAT	TAGCTGACCA	CAATGAGGTG	CTTTA
Cytb_ST02	.....	.....	.....A..	G.....	.....	.G...
Cytb_ST03	.....	.....G..C..	.....	G.....	.....	.....
Cytb_ST04	.....A..	.....	.....	G.....	.....	.....G
Cytb_ST05	.....	.....	.....	G.....	.....C..	.....C..
Cytb_ST06	.....	.....	.....	G.....	.....G..	.....
Cytb_ST07	.....	.....C..	.....	G.....	.....A..	.....
Cytb_ST08	.....	.....T..	.....	G.....	.....	.....
Cytb_ST09	.....	.....	.....C..	G.....	.....	.....
Cytb_ST10	..G.....	.....	.....	G.....	.....	.....
Cytb_ST11	.....	.....	.....A..	GTA.....	.....	.....
Cytb_ST12	.....	.....	.....	GTA.....	.....	.....
Cytb_ST13	.....C..	.....	.....	G.....	.....	.....
Cytb_ST14	.....	.....	.....	G..T.....	.....	.....
Cytb_ST15	.....	.....	.....T..A..	G.....	.....	.....
Cytb_ST16	.....	.....	.....	GTA.....	.....C..	.....
Cytb_ST17	GT.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST18	GA..A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....	.....	.....
Cytb_ST19	GA.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST20	G.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST21	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST22	.....A..	.....A..AC.G..	.....T..G..	G.....C	.....G..	.....
Cytb_ST23	.A.....	.....G.AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....	.....
Cytb_ST24	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	GG.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST25	.....G..	.....A..	.....T..C	G.....GTTC A..	.....	T.C..
Cytb_ST26	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST27	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....	.....
Cytb_ST28	.....	A..AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	A..
Cytb_ST29	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....AG..	.....
Cytb_ST30	.A.....	.....AC.GT	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST31	.....	A..AC.G..	.....T..GC..	G.....C	.....G..	.....
Cytb_ST32	.....	AC.GT	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	A..
Cytb_ST33	.A..A.....	.....AC.G..	.....T..G..	G.....C A..	.....G..	.....
Cytb_ST34	.....C..G..	.....AC..	T.T..G..G..	G.....TTC A..	.....A..	T....
Cytb_ST35	.A.....	.....AC.G..	.....T..G..	GG..C..C A..	.....G..	.....
Cytb_ST36	.....G..	.....AC..	.....T..G..	G.....TTC A..	.....	T....
Cytb_ST37	.....	A..GAC.G..	.....T..GC..	G.....C	.....G..	.....
Cytb_ST38	.....	A..AC.G..	.....T..G..	G.....C	.....G..	.....
Cytb_ST39	.....C.G..	.....AC..	.....T.T..	G.....A.TTC	AGG.....C..	T....

Figura 3. Haplotipos del marcador mitocondrial Citocromo b (Cytb) de *Syngnathus typhle* detectados en Parques Nacionales y áreas adyacentes

Figure 3. Haplotypes of the mitochondrial marker Cytochrome b (Cytb) of *Syngnathus typhle* detected in National Parks and adjacent areas

et al. 2017), se detectaron 5 haplotipos con 13 posiciones variables, siendo Cytb\_EA01 el más abundante (Fig. 9).

En caballito de mar se analizó un fragmento Cytb de 507 pb, detectando un total de 6 haplotipos de la especie *H. guttulatus*, tres de ellos nuevos respecto a estudios previos de esta especie del área atlántica (Cytb\_HG04, Cytb\_HG05 y Cytb\_HG16), siendo Cytb\_HG16 único en PNMTAC, frente al más común en PNMTIAG (Cytb\_HG03). Un posible *H. hippocampus* en PNMTAC fue identificado con ADNmt como *H. guttulatus*, sugiriendo posible confusión morfo-

lógica, como se ha descrito en Gran Canaria (LÓPEZ et al. 2010). Las secuencias de *H. guttulatus* en los Parques Nacionales se compararon con referencias previas de la costa gallega, revelando 16 haplotipos totales y 16 posiciones variables, incluyendo la secuencia GenBank AF192664 de Reino Unido (CASEY et al. 2004) (Fig. 10).

El análisis morfológico combinado con las muestras genéticas analizadas permitió identificar 217 especímenes *S. acus*, 40 *S. abaster*, 73 *S. typhle*, 11 *H. guttulatus*, 8 *E. aquoreus*, 35 *N. lumbriciformis*, 24 *N. maculatus* y 7 *N. ophidion* (Tabla 1).

			111	111
		133444	5557899000	001
		369017456	2440536256	990
		4076222535	8095693068	262
<b>Cytb</b>	<b>SAb01</b>	<b>ATGCATGCTT</b>	<b>ATTCAAACAT</b>	<b>GGA</b>
Cytb	SAb02	.....	.....C.....	...
Cytb	SAb03	.....	.....G.....	.....C.....
Cytb	SAb04	GC.....	.....	.....
Cytb	SAb05	GCATGCA.CC	GC...TGTGC	AAG
Cytb	SAb06	GA.....	.....	.....
Cytb	SAb07	GA.....	.....C.....	.....
Cytb	SAb08	...TGC.....	...CT...G.....	.....
Cytb	SR01	.....	.....	.....

**Figura 4.** Haplotipos del marcador mitocondrial Citocromo b (Cytb) de *Syngnathus abaster* detectados en Parques Nacionales y áreas adyacentes

**Figure 4.** Haplotypes of the mitochondrial marker Cytochrome b (Cytb) of *Syngnathus abaster* detected in National Parks and adjacent areas.

### Variabilidad genética de loci microsatélites

En las especies de peces pipa se ajustaron condiciones de amplificación múltiple para subconjuntos seleccionados de microsatélites (Tabla 2), entre 7 y 9 loci en las especies del género *Syngnathus* y entre 5 y 8 loci en la subfamilia Nerophinae. En este último grupo, especialmente en *N. ophidion*, se observó éxito limitado de amplificación cruzada y menor polimorfismo partiendo de los cebadores disponibles en la especie próxima *N. lumbriciformis* (MONTEIRO *et al.* 2014).

Los marcadores microsatélite analizados en las especies de las subfamilias Syngnathinae (Tabla 3) y Nerophinae (Tabla 4) mostraron en general ajuste a equilibrio HW, salvo algunos loci con defecto de heterocigotos asociados a presencia de alelos nulos, sin descartar efecto de bajo tamaño muestral en algunas especies. No se detectó LD entre pares de loci, compatible con segregación independiente. El análisis combinado sobre marcadores por especie reveló niveles similares y moderados de diversidad genética total ( $A \geq 10,2$ ;  $He \geq 0,647\%$ ) y potencial informativo ( $PIC \geq 0,627\%$ ), excepto *E. aequoreus* con valores más bajos (Tablas 3 y 4). Del análisis se excluyó a *N. ophidion* por muy baja abundancia muestral, reducido polimorfismo y genotipado deficiente en algunas muestras. En todas las especies analizadas, a pesar del limitado tamaño muestral en algún caso, se observó baja probabilidad teórica global de no exclusión (NE) parental (Tablas 3 y

4), especialmente si se conoce el otro progenitor (NE-2P) o la pareja parental (NE-PP;  $P < 0,001$ ), así como individual (NE-I;  $P < 0,001$ ) y de parientes (NE-SI;  $P < 0,001$ ), salvo en *N. maculatus* ( $P < 0,05$ ). Este potencial permitió evaluar casos de marcaje físico dudoso en PNMTIAG y Ría de Vigo (PLANAS *et al.* 2021), confirmando distinta identidad genotípica en varios pares de ejemplares de *S. acus* y *S. typhle*, así como el remuestreo de una hembra *H. guttulatus* en el mismo transecto donde se había avistado meses antes.

### Diversidad y estructura genética poblacional

Se estimaron los parámetros de diversidad y estructura genética poblacional por especie en base a marcadores de ADNmt y microsatélite (Tabla 5). Cinco especies (*S. acus*, *S. typhle*, *S. abaster*, *N. maculatus* y *N. lumbriciformis*) fueron más abundantes en los muestreos genéticos, especialmente las tres primeras a nivel espacial y temporal. La especie *S. acus* fue la preferente en áreas PNMTIAG, con escasas muestras genéticas en Mallorca (Tabla 5). Se observaron valores similares de diversidad genética entre las muestras temporales en las Islas Cíes y de éstas respecto a Ría de Vigo (Tabla 5). Se estimaron valores moderados-altos de  $N_e$  (Vigo-2016: 1,590, Cies-2016/2018: 189/879), con amplios intervalos de confianza (IC 95%; Vigo: 197-∞; Cíes: 335-∞ en 2018), sugiriendo cautela en su interpretación. Se observó diferenciación genética baja y no significativa entre muestras espaciales y temporales de *S. acus* en áreas PNMTIAG (global  $F_{ST} \sim \Phi_{ST}$ : 2%; media  $F_{ST}$  apareados: 1,6% y  $\Phi_{ST}$ : 2,2%), solo con indicios significativos entre SA2-16 y SA2-18 con ADNmt, que puede asociarse al diferente tamaño muestral y menor  $N_e$  del genoma mitocondrial. El análisis STRUCTURE identificó como más probable un único grupo poblacional con todos los individuos de PNMTIAG-Islas Cíes y Ría de Vigo, aunque diferenciación de la pequeña muestra de Mallorca (Fig. 11), acorde con datos de microsatélites (media  $F_{ST}$  apareados: 30%;  $P < 0.05$ ) y ADNmt (Fig. 4).

En la especie *S. typhle* presente en PNMTAC, Mallorca y Ría de Vigo, no se detectaron diferencias significativas en niveles de diversidad genética entre muestras espaciales ni temporales (Tabla 5). La estima de  $N_e$  en Ría de Vigo fue 301 (amplio

	A	He	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
<b><i>Syngnathus acus</i> (N = 215)</b>								
Styph18	17	0,789	0,759	0,5780	0,4010	0,2120	0,0730	0,3750
Syty24	28	0,934	0,928	0,2410	0,1370	0,0320	0,0090	0,2860
Sabas3	18	0,915	0,906	0,3010	0,1770	0,0510	0,0140	0,2970
Sabas5	11	0,415	0,386	0,9080	0,7670	0,6140	0,3710	0,6360
Syty4	4	0,266	0,235	0,9650	0,8790	0,7960	0,5700	0,7600
Syty16	6	0,553*	0,509	0,8360	0,6750	0,5010	0,2440	0,5350
Syty22	3	0,119	0,113	0,9930	0,9430	0,8930	0,7830	0,8860
Sabas7	15	0,896	0,885	0,3520	0,2130	0,0710	0,0200	0,3080
Sabas8	30	0,932	0,925	0,2490	0,1420	0,0340	0,0090	0,2870
Media/Global	14,7	0,647	0,627	0,0027	0,0001	P<0,001	P<0,001	0,0006
DE	9,8	0,317	0,322					
<b><i>S. typhle</i> (N=75)</b>								
Styph12A	36	0,967	0,959	0,1480	0,0800	0,0120	0,0030	0,2710
Syty24A	26	0,927	0,916	0,2710	0,1570	0,0400	0,0110	0,2920
Sabas3A	28	0,943	0,933	0,2270	0,1280	0,0280	0,0080	0,2840
Syty4A	7	0,774*	0,733	0,6230	0,4450	0,2610	0,0890	0,3880
Syty16A	8	0,719	0,671	0,6880	0,5130	0,3220	0,1240	0,4240
Syty17A	2	0,077	0,074	0,9970	0,9630	0,9300	0,8550	0,9250
Syty22A	6	0,635	0,573	0,7790	0,6210	0,4450	0,1940	0,4830
Sabas7A	30	0,950	0,940	0,2050	0,1140	0,0230	0,0060	0,2800
Sabas8A	52	0,980*	0,972	0,1040	0,0550	0,0060	0,0010	0,2640
Media/Global	21,7	0,775	0,752	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
DE	16,9	0,290	0,293					
<b><i>S. abaster</i> (N=40)</b>								
Styph12A	8	0,486*	0,457	0,8700	0,7050	0,5220	0,2930	0,5830
Sabas5A	21	0,879	0,857	0,4030	0,2520	0,0900	0,0280	0,3230
Sabas3A	12	0,878	0,852	0,4250	0,2680	0,1070	0,0320	0,3250
Sabas9A	14	0,901	0,880	0,3630	0,2210	0,0760	0,0220	0,3110
Sabas4A	25	0,946	0,931	0,2320	0,1320	0,0290	0,0080	0,2850
Syty22A	3	0,501	0,384	0,8780	0,8010	0,7000	0,3660	0,5940
Sabas7A	21	0,913	0,894	0,3260	0,1950	0,0590	0,0170	0,3040
Media/Global	14,9	0,786	0,751	0,0036	0,0002	0,0000	0,0000	0,0010
DE	7,9	0,201	0,228					

**Tabla 3.** Diversidad genética (A, He), potencial informativo (PIC) y probabilidad de no exclusión de loci microsatélites en signátidos Syngnathinae en los Parques Nacionales de áreas adyacentes. NE falso parental sin conocer (NE-1P) o conocido el otro (NE-2P), conocida el par (NE-PP); de identidad individual (NE-I) o de parientes (NE-SI). \*Alelos nulos.

**Table 3.** Genetic diversity (A, He), informative potential (PIC) and non-exclusionary global probability (NE) combined over micro-satellite loci in Syngnathinae syngnathids of National Parks and adjacent areas. NE false parental lacking (NE-1P) or known the other (NE-2P), known the couple (NE-PP); individual (NE-I) or sibling (NE-SI) identity. \* Null alleles.

Caracterización genética de signátidos en los Parques Nacionales marítimo-terrestres de las Islas Atlánticas de Galicia y del Archipiélago de Cabrera

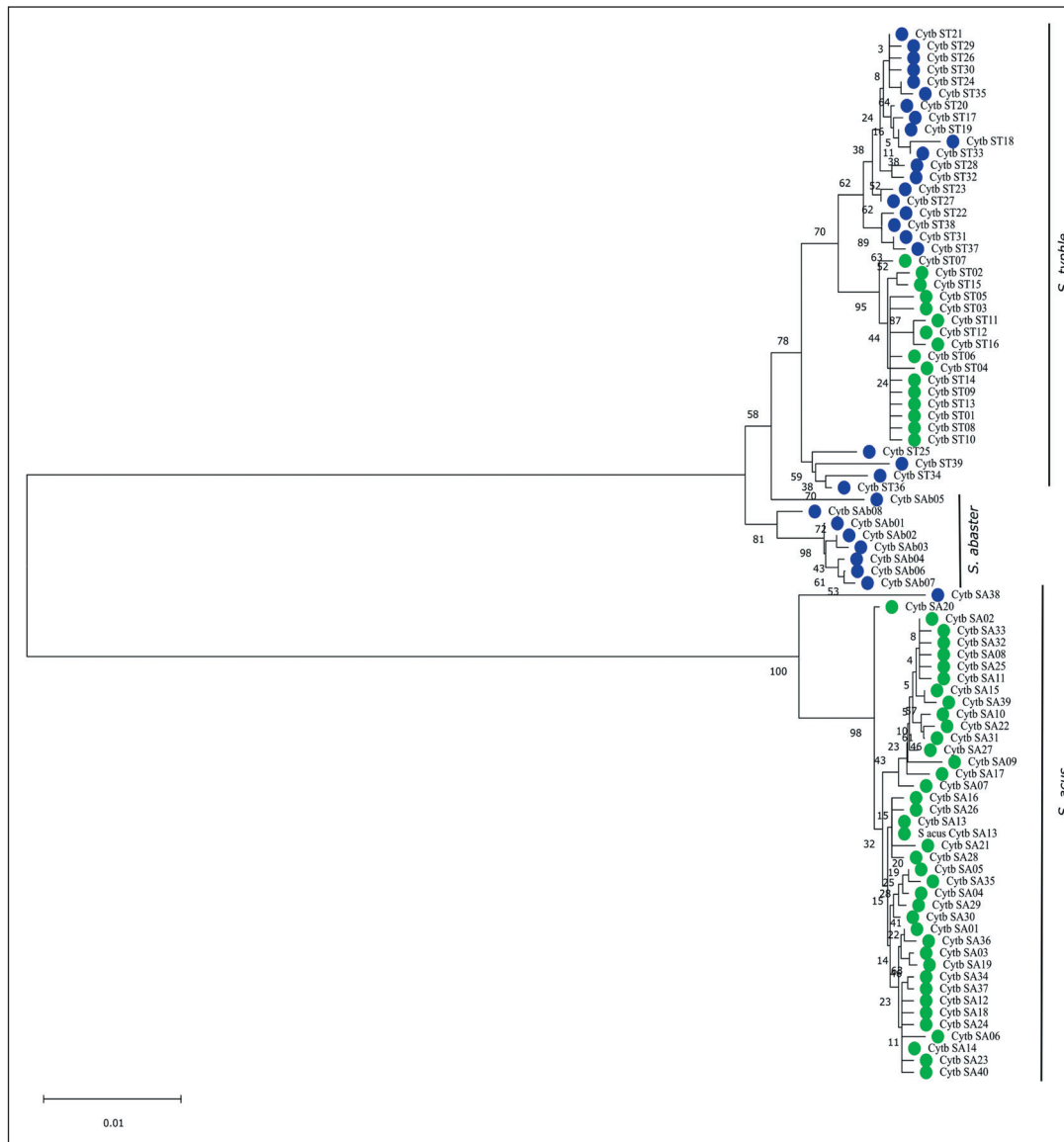
Locus	A	He	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
<b><i>Nerophis lumbriciformis</i> N=35</b>								
NL02383	14	0,798	0,771	0,5510	0,3710	0,1690	0,0610	0,3720
NL05025	6	0,547	0,500	0,8420	0,6810	0,5060	0,2520	0,5430
NL16858	13	0,850*	0,819	0,4850	0,3180	0,1430	0,0450	0,3420
NL00629	6	0,628	0,567	0,7860	0,6250	0,4460	0,1980	0,4900
NL00750	12	0,808	0,776	0,5490	0,3720	0,1790	0,0620	0,3670
NL06490	14	0,870	0,844	0,4340	0,2760	0,1090	0,0340	0,3290
NL07690	10	0,818	0,782	0,5450	0,3700	0,1850	0,0620	0,3620
NL12901	11	0,828	0,796	0,5220	0,3490	0,1640	0,0540	0,3560
Media/Global	10,8	0,768	0,732	0,0120	0,0007	0,0000	0,0000	0,0005
DE	3,2	0,116	0,126					
<b><i>N. maculatus</i> N=22</b>								
NL02383	14	0,892*	0,861	0,4000	0,2490	0,0910	0,0280	0,3210
NL05025	15	0,911	0,883	0,3510	0,2130	0,0680	0,0200	0,3090
NL16858	9	0,840*	0,781	0,5460	0,3680	0,1780	0,0600	0,3640
NL00629	1	0,000	0,000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
NL07690	12	0,887	0,855	0,4170	0,2620	0,1010	0,0300	0,3240
Media/Global	10,2	0,706	0,676	0,0319	0,0051	0,0001	0,0000	0,0117
DE	5,6	0,396	0,380					
<b><i>Entelurus aequoreus</i> N=8</b>								
NL02383	2	0,125	0,110	0,9930	0,9450	0,8990	0,7860	0,8880
NL05025	10	0,933	0,862	0,4040	0,2510	0,0960	0,0280	0,3200
NL16858	6	0,617*	0,553	0,8020	0,6200	0,4170	0,2030	0,5120
NL00629	1	0,000	0,000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
NL00750	7	0,924*	0,828	0,4790	0,3110	0,1430	0,0430	0,3370
NL06490	1	0,000	0,000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
NL07690	11	0,958	0,889	0,3450	0,2070	0,0690	0,0190	0,3060
NL12901	5	0,667	0,586	0,7760	0,6000	0,4090	0,1800	0,4820
Media / Global	5,4	0,528	0,479	0,0412	0,0057	0,0001	0,0000	0,0072
DE	3,9	0,423	0,387					

**Tabla 4.** Diversidad genética (A, He), potencial informativo (PIC) y probabilidad de no exclusión de loci microsátélites en signátidos Nerophinae de los Parques Nacionales y áreas adyacentes. NE falso parental sin conocer (NE-1P) o conocido el otro (NE-2P), conocida el par (NE-PP); de identidad individual (NE-I) o de parientes (NE-SI). \*Alelos nulos.

**Table 4.** Genetic diversity (A, He), informative potential (PIC) and non-exclusionary global probability (NE) combined over microsatellite loci in Nerophinae syngnathids of the National Parks and adjacent areas. NE false parental lacking (NE-1P) or known the other (NE-2P), known the couple (NE-PP); individual (NE-I) or sibling (NE-SI) identity. \* Null alleles

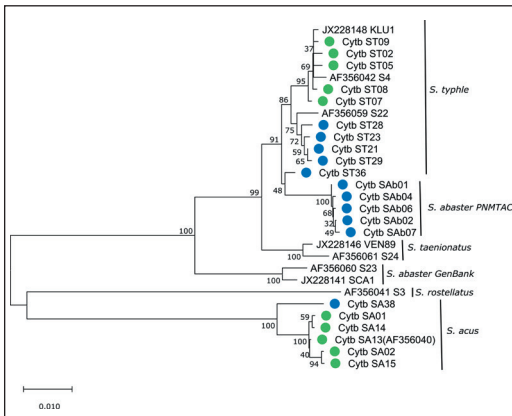
IC95%: 105-∞), mientras en PNMTAC y Mallorca no se pudo estimar (valor Ne infinito; IC95%: 55-∞ y 955-∞, respectivamente). Se observó diferenciación microsatélite significativa entre poblaciones

atlánticas y mediterráneas ( $F_{ST}$ : 7,3%), concordante con ADNmt (Fig. 4). No se detectó diferenciación significativa entre pares de muestras espaciales y temporales de PNMTAC y Mallorca (promedio



**Figura 5.** Árbol NJ (Neighbour-Joining) de relaciones genéticas entre todos los haplotipos del marcador mitocondrial Citocromo b (Cytb) detectados en especies del Género *Syngnathus* en Parques Nacionales y áreas adyacentes. Significación de nodos: *Bootstrap* (1,000 réplicas). Los colores verde y azul corresponden a presencia en PNMTIAG y PNMTAC, respectivamente.

**Figure 5.** NJ (Neighbour-Joining) tree showing the relationships among all haplotypes of mitochondrial marker Cytochrome b (Cytb) detected in species of Genus *Syngnathus* in National Parks and adjacent areas. Significance of the nodes: *Bootstrap* (1,000 replicates). Green and blue colors correspond to the presence in PNMTIAG and PNMTAC, respectively.



**Figura 6.** Árbol NJ (Neighbour-Joining; cita) de relaciones de los haplotipos Citocromo b (Cytb) más frecuentes detectados en especies del Género *Syngnathus* en Parques Nacionales españoles respecto a secuencias de referencia de especies europeas congénicas (Mwale *et al.* 2013): *S. abaster* (AF356060\_S23; JX228141\_SCA1), *S. typhle* (AF356042\_S4; AF356059\_S22; JX228148\_KLU1), *S. acus* (AF356040), *S. rostellatus* (AF356041\_S3) y *S. taenionatus* (AF356061\_S24; JX228146\_VEN89). Significación de nodos: *Bootstrap* (1,000 réplicas). Los colores verde y azul corresponden a presencia en PNMTIAG y PNMTAC, respectivamente.

**Figure 6.** NJ (Neighbour-Joining) tree showing the relationships among the most frequent haplotypes of the marker Cytochrome b (Cytb) detected in species of Genus *Syngnathus* in the Spanish National Parks respect to reference sequences of congeneric European species (Mwale *et al.* 2013): *S. abaster* (AF356060\_S23; JX228141\_SCA1), *S. typhle* (AF356042\_S4; AF356059\_S22; JX228148\_KLU1), *S. acus* (AF356040), *S. rostellatus* (AF356041\_S3) and *S. taenionatus* (AF356061\_S24; JX228146\_VEN89). Node significance: *Bootstrap* (1,000 replicates). Green and blue colors correspond to the presence in PNMTIAG and PNMTAC, respectively.

$F_{ST}$  pareados: 0,1%;  $\Phi_{ST}$ : 4%), salvo entre ST3-17 y ST4-18 con ADNmt, posiblemente por bajo tamaño muestral. El análisis de estructura genética reveló dos grupos poblacionales atlántico y mediterráneo diferenciados, agrupando PNMTAC y Mallorca en un mismo clúster, independientemente de K (Fig. 12).

Para la especie *S. abaster* detectada en PNMTAC y Mallorca, el análisis de haplotipos Cytb sustentó su clasificación morfológica en un grupo monofilético que sugiere un linaje críptico diferenciado de otras poblaciones mediterráneas más orientales de la especie, con mayor distancia genética que respecto a otras especies, como *S. typhle* (Fig. 5). La diversidad genética obtenida en este estudio con microsatélites aislados en *S.*

*abaster* (DIEKMANN *et al.* 2009) concuerda con variación intraespecífica, sin indicios de mezcla ambigua de distintas especies. No se detectaron desviaciones de HW, sugiriendo panmixia, ni LD significativo entre pares de loci por población ni global en las muestras analizadas. La diversidad y riqueza alélica con microsatélites resultó similar entre muestras temporales en PNMTAC, aunque más elevada en SAB3-18 con ADNmt, posiblemente influenciado por menor tamaño muestral en 2016 y 2017 (Tabla 5). No se detectó diferenciación significativa ( $F_{ST}$ : 1,5%) ni subestructura genética, con un único clúster más probable agrupando todos los individuos de este linaje críptico de *S. abaster* en áreas PNMTAC.

El análisis temporal de *N. maculatus* en PNMTAC y Mallorca se vio condicionado por el desigual tamaño muestral. El agrupamiento espacial mostró niveles ligeramente menores de diversidad genética en PNMTAC que en Mallorca, con los estimadores menos afectados por tamaño muestral tanto con microsatélites como ADNmt (media  $H_e$ ,  $A_R$ ,  $\pi$ ; Tabla 5). El coeficiente de diferenciación entre PNMTAC y Mallorca fue reducido y no significativo con ambos tipos de marcadores (<0,1%;  $P>0,05$ ), concordante con un único grupo poblacional más probable ( $K=1$ ) en el análisis de estructura genética.

En *N. lumbriciformis* se identificó una única muestra poblacional en Ría de Vigo, anexa a PNMTIAG, con baja variabilidad respecto a otras especies de Nerophinae con 16S-rDNA, aunque similar diversidad genética con microsatélites ( $H_e$ : 0,768;  $A$ : 10,8; Tabla 5). No se observó diferenciación genética significativa entre las áreas de muestreo analizadas en el interior (Arcade) y desembocadura (Cabo Estai) de la Ría de Vigo ( $F_{ST}$ : 0,2%;  $\Phi_{ST}$ : 0,6%), ni subestructura genética ( $K$  más probable de 1).

Los restantes peces pipa analizados en PNMTAC (*N. ophidion*) y PNMTIAG (*E. aequoreus*) mostraron muestras genéticas escasas ( $N < 10$ ) y bajo polimorfismo en microsatélites, limitando el análisis poblacional. Algunos ejemplares de *N. ophidion* en PNMTAC mostraron baja calidad de ADN, con amplificación interindividual variable interloci ( $\leq 50\%$  NL02383 y NL05025;  $>75\%$  NL0769 y NL1685). El análisis multilocus en esta especie

	11	1111111112	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	3333333333	3333333333	3333333344	445
	1224678900	1222346770	0001111122	3333444444	4555556666	6666789990	0001122233	3444445566	6777888933	380
	1151142912	3569068121	4681235639	0138123478	9136789023	4589174670	1392613545	8234671491	3456467425	733
N <i>Ophiodon</i> AF354994	GCTTCTGCTG	ACTGCGCAAC	GCCAGAGTCC	ATCATATATAC	TATCACACAC	TGAGCTAATA	TAAAAAGTGA	ATTAGAAAAA	TCATTATCC	AGC
16S_NL01	TT.CTC...A	. .CT. .G.CT	A. .G.G.CTA	T.A.G.TACA	ATA. ---.T.	CTT.TCGTCT	AG.C.CTA.C	CGC.ACTG..	CA.-C.GT.T	G.T
16S_NL02	TT.CTC...A	. .CT. .G.CT	A. .G.G.CTA	T.A.G.TACA	ATA. ---.T.	CTT.TCGT.T	AG.C.CTA.C	CGC.ACTG..	CA.-C.GT.T	G.T
16S_NL03	TT.CTC...A	. .CT. .G.CT	A. .G.G.CTA	T.A.G.TACA	ATA. ---.T.	CTT.TCGTCT	AG.CGCTA.C	CGC.ACTG..	CA.-C.GT.T	G.T
16S_NL04	TT.CTC...A	. .CTA.G.CT	A. .G.G.CTA	T.A.G.TACA	ATA. ---.T.	CTT.TCGTCT	AG.C.CTA.C	CGC.ACTG..	CA.-C.GT.T	G.T
16S_NM01	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	C.A.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA..C	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	...
16S_NM02	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	C.A.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA.AC	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	...
16S_NM03	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	C.A.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA..C	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	...
16S_NM04	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	CCA.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA..C	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	.A
16S_NM05	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	C.A.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA..C	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	...
16S_NO01	TGC...ATA	.GT...TTC..	.TT.ATA..A	C.A.GG.....	.GCTCITT	.TA.C.....	.G.GCA..C	.CCGAGGG.G	.A...GA.T..	...
16S_NO02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
16S_NO03	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....C.....	.....
16S_NO04	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....
16S_NO05	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....

Figura 7. Haplotipos de ADNmt ribosomal 16S rDNA detectados en peces pipa del Género *Nerophis*.

Figure 7. Haplotypes of the mitochondrial marker 16S rDNA in pipefish species of the Genus *Nerophis*.

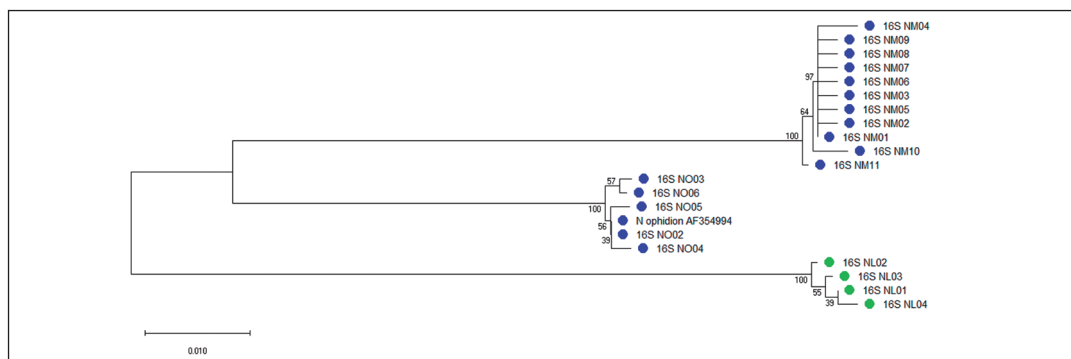


Figura 8. Árbol NJ (Neighbour-Joining) de relaciones genéticas entre todos los haplotipos del marcador mitocondrial 16S rDNA detectados en peces pipa del Género *Nerophis* en los Parques Nacionales y áreas adyacentes. Significación de nodos: *Bootstrap* (1,000 replicates). Los colores verde y azul corresponden a presencia en PNMTIAG y PNMTAC, respectivamente.

Figure 8. NJ (Neighbour-Joining) tree showing the relationships among all haplotypes of mitochondrial marker 16S rDNA detected in species of the Genus *Nerophis* in the National Parks and adjacent areas. Significance of the nodes: *Bootstrap* (1,000 replicates). Green and blue colors correspond to the presence in PNMTIAG and PNMTAC, respectively.

permitió obtener estimas preliminares de diversidad genética (He: 0,842; A: 4,8) y la identificación individual, descartando remuestreos, mediante los loci más informativos (NL02383, NL1685, NL0769, con 5, 6 y 9 alelos por locus). Para *E. aequoreus* en la muestra analizada en PNMTIAG se obtuvieron estimas preliminares de diversidad genética con microsatélites, siendo particularmente elevada con ADNmt (He: 0,545; A: 5,4; H: 7; h: 0,964; Tabla 5).

Las muestras genéticas de caballito de mar *H. guttulatus* en PNMTAC y Mallorca fueron escasas y con peor estado de conservación que las de peces pipa. Uno de los ejemplares en Mallorca reveló variantes genéticas diferenciales respecto a PNMTIAG-Cíes, el otro no pudo ser analizado

por mala calidad del ADN, acorde al avistamiento (flotación en superficie). En PNMTIAG se obtuvieron estimas preliminares de diversidad genética con microsatélites y ADNmt (He: 0,632; A: 5,5; H: 5; h: 0,667; Tabla 5). Todos los ejemplares mostraron alta probabilidad de asignación genotípica a poblaciones de referencia en la costa gallega (LÓPEZ *et al.* 2015), con ausencia de diferenciación genética significativa respecto a las mismas (promedio  $F_{ST}$ : 0,1%;  $\Phi_{ST}$ : 0,9%;  $P > 0,05$ ).

**Parentesco molecular y asignación parental**

En todas las especies analizadas se detectó bajo parentesco interindividual (r) por población (Ta-



Especie	ADNmt*				Microsatélites						
	N	H	h	$\pi$	N	A	AR	He	F <sub>IS</sub>	r (FS %)	
SA1-16	35	14	0,866	0,0030	40	10,44	9,12	0,620	0,018	-0,002 (0,4)	
SA2-16	22	9	0,779	0,0029	22	8,78	8,78	0,623	0,036	0,001(0,4)	
SA2-17	70	25	0,865	0,0026	69	11,11	8,62	0,614	0,030	0,012 (1,5)	
SA2-18	82	17	0,831	0,0023	82	11,56	8,68	0,658	0,050	-0,005 (1,3)	
SA4-18	2	1	0,000	0,0000	2	1,89	-	0,556	0,500	0,056 (-)	
ST1-16	28	15	0,931	0,0028	32	15,56	5,54	0,716	0,079	0,014 (0,4)	
ST3-17	12	9	0,939	0,0035	12	8,89	5,69	0,761	0,097	0,015 (1,3)	
ST3-18	6	6	1,000	0,0063	6	6,11	5,54	0,744	0,144	-0,021 (-)	
ST4-17	13	8	0,859	0,0019	13	9,44	5,80	0,768	0,102	0,007 (-)	
ST4-18	11	6	0,727	0,0050	11	8,56	5,71	0,782	0,143	0,009 (-)	
SAB3-16	6	2	0,533	0,0005	6	6,57	5,93	0,767	0,081	-0,059 (-)	
SAB3-17	10	3	0,378	0,0005	10	8,14	5,69	0,829	0,139	-0,011 (-)	
SAB3-18	21	5	0,810	0,0014	21	11,14	5,38	0,746	0,016	0,018 (0,9)	
SAB4-18	2	2	1,000	0,0159	2	3,71	-	1,000	0,143	-0,259 (-)	
HG2-16/17	9	5	0,667	0,0020	9	5,50	5,50	0,632	0,004	0,011 (-)	
HG4-18	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	
NL1-16	31	4	0,187	0,0004	35	10,75	-	0,769	0,024	-0,006 (1,7)	
NM3-16/18	7	3	0,524	0,0017	6	4,60	2,68	0,705	0,270	0,03 (4,8)	
NM4-17/18	17	9	0,735	0,0020	16	9,20	2,93	0,723	<b>0,268</b>	-0,062 (2,9)	
EA2-17/18	8	7	0,964	0,0049	8	5,38	-	0,545	0,388	-0,083 (3,6)	

**Tabla 5.** Diversidad genética de peces signátidos en los Parques Nacionales y áreas adyacentes (Códigos en la Tabla 1). \* Cytb (Géneros *Syngnathus* e *Hippocampus*) / 16S-rDNA (Géneros *Nerophis* y *Entelurus*). N: Tamaño muestra; H: N° haplotipos, h/ $\pi$ : diversidad haplotípica/nucleotídica; A: N° alelos, AR: Riqueza alélica, He: Heterocigosis esperada; F<sub>IS</sub>: índice fijación (negrita: P<0,05); r: coeficiente parentesco (FS: % diadas r>0,375).

**Tabla 5.** Genetic diversity of syngnathid fish in the National Parks and adjacent areas (Codes in the Table 1). \* Cytb (Genera *Syngnathus* and *Hippocampus*) / 16S-rDNA (Genera *Nerophis* and *Entelurus*). N: Sample size; H: Haplotype No., h/ $\pi$ : haplotypic/nucleotidic diversity; A: Allele No., AR: Allelic richness, He: expected heterozygosity; F<sub>IS</sub>: Fixation index (bold: P<0,05); r: relatedness coefficient (FS: % dyads r>0,375).

bla 5) y entre pares de poblaciones por especie (*S. acus* -0,06; *S. typhle* -0,01; *S. abaster* -0,07; *H. gutturalatus* 0,01, *N. maculatus* -0,01), concordante con valores F<sub>IS</sub> no significativos por población (Tabla 5), y escenarios salvajes en signátidos (LÓPEZ *et al.* 2015), excepto para *N. maculatus* en Mallorca. Unas pocas diadas (pares de individuos) en la misma o distintas muestras mostraron valores de r, sugerentes de alto parentesco en la misma población o migrantes entre poblaciones anexas (r>0,375; LÓPEZ *et al.* 2012; 2015). Globalmente representan una baja proporción por población (FS < 5%; Tabla 5), con los valores mayores en *N.*

*maculatus* y *E. aequoreus* (>3,5%), que podrían sugerir cierta estructura familiar local en estas especies, a validar con mayor número de muestras y loci polimórficos.

El análisis de microsatélites en 26 puestas familiares en *S. acus* y *S. typhle* confirmó la contribución alélica del progenitor masculino conocido por lote de puesta. Se detectó maternidad múltiple por puesta en todas las analizadas de *S. typhle* en Ría de Vigo y en la mayoría de *S. acus* (83% Ría Vigo; 79% PNMTIAG). Las restantes puestas de *S. acus* resultaron compatibles con un único geno-

	1222233	344445
	1463355677	856780
	8662428925	798345
<u>H guttulatus (AF192664)</u>	<u>GAAAATCAGG</u>	<u>AAACTA</u>
Cytb_HG01	.....AA	..G...
Cytb_HG02	.....AA	...G.
Cytb_HG03	.....AA	.....
Cytb_HG04	.....AA	.G....
Cytb_HG05	.....AA	.....
Cytb_HG06	..T....AA	.....
Cytb_HG07	A....A.AA	.....
Cytb_HG08	.....AA	G.....
Cytb_HG09	....C..AA	.....
Cytb_HG10	.....AA	.....G
Cytb_HG11	.....GAA	.....
Cytb_HG12	.....A.	.....
Cytb_HG13	.G.....AA	.....
Cytb_HG14	....G...AA	.....
Cytb_HG15	....G...AA	...T..
Cytb_HG16	...G...AA	.....

Figura 9. Haplotipos de los marcadores mitocondriales Citocromo b (Cytb) y ADNr 16S de *Enterulus aequoreus*

Figure 9. Haplotypes of the mitochondrial markers Cytochrome b (Cytb) and 16S rDNA in *Enterulus aequoreus*

	33
	46
	69
<u>E aequoreus 16S (KY065539)</u>	<u>TC</u>
16S_EA01	..
16S_EA02	C.
16S_EA03	.T
	11112222 378
	1303450335 921
	1577350134 285
<u>E aequoreus Cytb (KY857646)</u>	<u>ATAAAGTTAT CCA</u>
Cytb_EA01	..G..A.C.. .TG
Cytb_EA02	.CGG...C... .G
Cytb_EA03	G.GG...C.C .G
Cytb_EA04	..G...C... .G
Cytb_EA05	..GGG.CCG. A.G

Figura 10. Haplotipos del marcador mitocondrial Citocromo b (Cytb) de *Hippocampus guttulatus* en Islas Cíes respecto a poblaciones de referencia de la costa gallega.

Figure 10. Haplotypes of the mitochondrial marker Cytochrome b (Cytb) of *Hippocampus guttulatus* in Cíes Islands respect to reference populations from Galician coast

tipo materno y monogamia por puesta (Tabla 6). Los genotipos maternos inferidos no resultaron coincidentes con ninguna de las hembras *S. acus* analizadas genéticamente, sugiriendo hembras no detectadas, al ser limitados los ejemplares avisados sin muestra genética analizada.

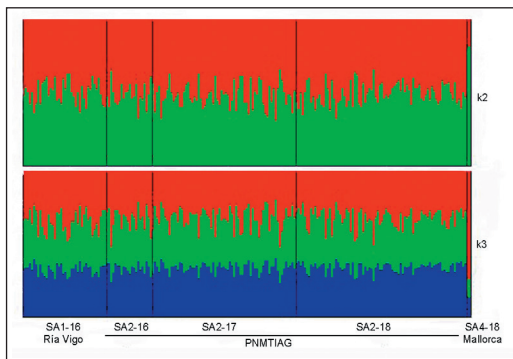


Figura 11. Estructura genética poblacional de *Syngnathus acus* en Parques Nacionales y áreas adyacentes (las líneas verticales separan las distintas poblaciones, con barras individuales por cada ejemplar).

Figure 11. Population genetic structure of *Syngnathus acus* in the National Parks and adjacent areas (populations are separated by vertical lines, each specimen is represented by individual bars)

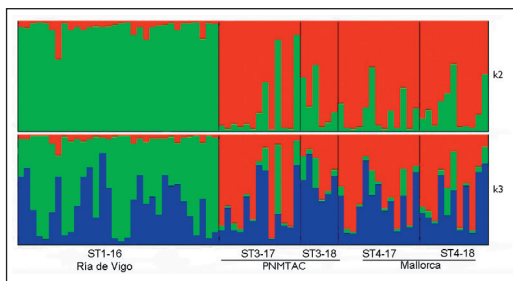


Figura 12. Estructura genética poblacional de *Syngnathus typhle* en Parques Nacionales y áreas adyacentes (las líneas verticales separan las distintas poblaciones, con barras individuales por cada ejemplar).

Figure 12. Population genetic structure of *Syngnathus typhle* in the National Parks and adjacent areas (populations are separated by vertical lines, each specimen is represented by individual bars)

## DISCUSIÓN

### Identificación genética de signátidos

El análisis morfológico y genético permitió identificar ocho especies de signátidos en las muestras genéticas analizadas en censos visuales durante el período 2016 a 2018 en los parques nacionales marítimo-terrestres españoles y áreas adyacentes (PLANAS et al. 2022), con presencia mayoritaria de peces pipa y una única especie

de caballito de mar (*H. guttulatus* en PNMTIAG y Mallorca). El análisis de ADNmt permitió clarificar algunas identificaciones inespecíficas o discordantes respecto a datos morfológicos (total 2,8%; 9 PNMTAC, 3 Mallorca), mayoritariamente entre especies de peces pipa. Estos datos sugie-

ren cautelas sobre la posible confusión y necesidad de revisión morfológica en censos visuales *in situ* y/o en estadios tempranos, tal como se ha descrito en distintas especies de signátidos (LÓPEZ *et al.* 2010; HABLUTZEL & WILSON 2011; WOODALL *et al.* 2018; GARCÍA *et al.* 2019).

	M	F	M:F	Nº lotes	N por lote	Media PF por lote	Rango PF por lote
ST1-16	9	28	0,32	6	14,8	2,83	2-4
SA1-16	41	88	0,47	6	15	2,33	1-3
SA2-16	10	11	0,91	2	15	2,5	2-3
SA2-17	21	49	0,43	4	13,8	2,25	2-3
SA2-18	35	49	0,71	8	12	1,75	1-3

**Tabla 6.** Análisis de maternidad en lotes de puestas en poblaciones de *Syngnathus acus* (SA) y *S. typhle* (ST) en las Islas Cíes y Ría de Vigo (Códigos en Tabla 1). M: Machos, F: Hembras; N: Tamaño muestral promedio de progenies por lote; PF: número mínimo de hembras progenitoras por lote.

**Table 6.** Maternity analyses in batches of progenies from populations of *Syngnathus acus* (SA) and *S. typhle* (ST) in the Cíes Islands and Ría de Vigo (Codes in Table 1). M: Males, F: Females; N: Mean progeny sample size per batch; PF: minimum number of parent females per batch.

En el caso de *S. abaster* en áreas PNMTAC, los datos morfológicos y genéticos concuerdan con datos previos en destacar que esta especie no constituye un taxón monofilético, sino que comprende distintos linajes genéticos divergentes como posibles especies crípticas (SANNA *et al.* 2013). Los haplotipos *S. abaster* detectados en PNMTAC mostraron mayor distancia genética respecto a secuencias de la misma especie, en áreas mediterráneas más orientales (Italia; MWALE *et al.* 2013), que a otras especies congénéricas (e.g., *S. typhle*). Si bien podría explicarse por confusión morfológica respecto a otros signátidos, no inusual en el área mediterránea (HABLUTZEL & WILSON 2011), el grupo monofilético de *S. abaster* en PNMTAC aparece claramente diferenciado de haplotipos *Cytb* de otras especies congénéricas con distribución mediterránea. Otras posibles confusiones con *S. schmidt* y *S. phlegon*, sin haplotipos *Cytb* previos, se discriminaron en base a rasgos merísticos (<http://species-identification.org/index.php>). Todas estas observaciones sugieren la presencia de un linaje críptico de *S. abaster* en PNMTAC sin diferencias morfo-

lógicas respecto al descrito en costas italianas, siendo necesarios futuros estudios respecto a otras poblaciones occidentales mediterráneas (SANNA *et al.* 2013). Procesos de diferenciación de poblaciones/especies crípticas se han asociado con aislamiento histórico evolutivo y dispersión limitada en diferentes organismos de hábitats costeros, incluyendo signátidos, como *S. abaster* y otros peces pipa del Pacífico (SANNA *et al.* 2013; SOGABE & TAKAGI, 2013; GARCÍA *et al.* 2019).

### Diversidad y estructura poblacional: Unidades de gestión

En este proyecto se evaluaron por primera vez los niveles de diversidad genética en poblaciones de signátidos en PNMTIAG y PNMTAC, y sus áreas adyacentes, especialmente consistentes en las especies más abundantes y mejor representadas.

Para la especie *S. acus* se presentan los primeros datos de diversidad genética poblacional en ámbito europeo. Los resultados obtenidos apuntan

a la estabilidad temporal de diversidad genética de la población de *S. acus* en PNMTIAG-Cíes, con conectividad genética respecto a áreas adyacentes de la Ría de Vigo, como parte del mismo acervo genético y una misma unidad de gestión. En este contexto, se ha sugerido que PNMTIAG-Cíes podría representar una zona de reproducción, dada la detección preferente de especímenes maduros de gran tamaño en periodo de freza, en zonas de baja exposición a corrientes oceánicas y presencia de comunidad de algas (PLANAS *et al.* 2022), siendo de gran interés investigar dinámicas de conectividad en futuros estudios. Los escasos datos de *S. acus* en Mallorca mostraron variantes mitocondriales y microsatélite privadas, sugiriendo diferenciación genética respecto al área atlántica en PNMTIAG, acorde a estudios filogeográficos en especies congénicas (WILSON & VERAGUTH 2010).

En *S. typhle* en PNMTAC, Mallorca y Ría de Vigo se observaron niveles similares de diversidad genética por población, con estabilidad temporal en el área mediterránea. Estos valores fueron similares a los descritos con microsatélites en poblaciones atlánticas y mediterráneas de la especie, incluyendo muestras próximas a PNMTIAG (Ría de Arousa, Galicia) y PNMTAC (costa levantina española) (WILSON & VERAGUTH 2010). Estas observaciones sugieren la presencia de una población estable en el área PNMTAC, con flujo génico respecto a Mallorca. La diferenciación genética significativa con microsatélites y ADNmt respecto a la población atlántica en Ría de Vigo es concordante con datos filogeográficos previos en esta especie (WILSON & VERAGUTH 2010).

En poblaciones de *S. abaster* en PNMTAC y Mallorca los resultados sustentan la presencia de un linaje mitocondrial críptico divergente respecto a otras poblaciones mediterráneas más orientales de la especie (SANNA *et al.* 2013). La comparación con datos previos en una población atlántica de esta especie (Formosa, Portugal) usando 5 loci comunes (DIEKMANN *et al.* 2009) mostró valores similares de diversidad genética, pero menor diversidad alélica, como estimador más sensible a reducción de tamaño

poblacional. Esta observación, en parte explicable por distinto tamaño muestral entre estudios, también podría sugerir menor variabilidad en poblaciones más reducidas y aisladas de linajes crípticos mediterráneos (SANNA *et al.* 2013). Evaluar la diferenciación genética del área PNMTAC respecto a poblaciones atlánticas, limitada en ausencia de genotipos o frecuencias alélicas detallados (DIEKMANN *et al.* 2009), sería de interés en futuros estudios combinado con marcadores de ADNmt.

Las restantes especies de peces pipa mostraron menor abundancia espacio-temporal en los muestreos genéticos. El efecto de limitaciones muestrales (N) se ha discutido en distintos organismos en base a simulaciones que demuestran capturas del 90% de la variabilidad en frecuencias alélicas y He, incluso con  $N < 10$ , incluyendo signátidos como dragones de mar (LARSON *et al.* 2014). Esto sustentaría las estimas de estos parámetros poblacionales con muestras limitadas en nuestro estudio, aunque resaltando la necesidad de futuros análisis ampliando el tamaño y distribución muestral. La población de *N. lumbriciformis*, detectada en Ría de Vigo mostró valores promedio de diversidad genética muy similares a los descritos previamente con microsatélites comunes en una población atlántica estable de la costa norte portuguesa (MONTEIRO *et al.* 2014; 2017). En poblaciones de *N. maculatus* en PNMTAC y Mallorca se presenta la primera evaluación de diversidad genética con microsatélites en el ámbito europeo. Los análisis genéticos sugieren patrones de diversidad (He media: 0,714) comparables a otras poblaciones simpátricas de signátidos en este estudio (e.g., *S. typhle*, *S. abaster*), que podría sugerir efectivos no detectados. La homogeneidad genética de *N. maculatus* entre PNMTAC y Mallorca sugiere flujo génico y apunta un único grupo poblacional como unidad de gestión, a evaluar en futuras ampliaciones muestrales, especialmente en PNMTAC. En *N. ophidion* se aportan las primeras estimas de variabilidad microsatélite, apoyando la trazabilidad individual de ejemplares analizados, pero recomendando caracterizar marcadores específicos en futuros estudios, dado el bajo éxito de amplificación cruzada desde la especie próxima *N. lumbrici-*

*formis* (MONTEIRO *et al.* 2014). En *E. aequoreus* en PNMTIAG se obtuvieron estimas preliminares de diversidad genética con microsatélites (He: 0,545; A: 5,4), sin datos previos en el ámbito europeo. Estos valores, en el rango inferior entre las especies de este estudio, podrían en parte explicarse por el sesgo asociado al uso de loci variables aislados en otras especies (*N. lumbriciformis*; MONTEIRO *et al.* 2014). La variabilidad genética mitocondrial en *E. aequoreus* resultó comparable a la descrita en otras poblaciones europeas, particularmente en la Ría de Vigo para *Cytb* y tamaño muestral similar (H: 7; h: 0,991;  $\pi$ : 0.0059; BRAGA-GONCALVES *et al.* 2017). Frente a la escasez en PNMTIAG, datos mitocondriales previos apuntan expansión poblacional de *E. aequoreus* en el NO Atlántico, sin subestructura genética asociada con migración pelágica en largas distancias por corrientes oceánicas, pero recomendando análisis demográficos a nivel local costero con loci más informativos (BRAGA-GONCALVES *et al.* 2017).

La muestra poblacional de caballito de mar *H. guttulatus* en PNMTIAG mostró valores de diversidad genética similares a los descritos con microsatélites en poblaciones de la costa atlántica gallega (media He: 0,62; media A: 9,5; LÓPEZ *et al.* 2015), con menor diversidad alélica posiblemente atribuible al limitado tamaño muestral. Para el marcador *Cytb* también se detectaron valores similares de diversidad respecto al promedio en poblaciones gallegas de esta especie (H: 10,5; h: 0,75;  $\pi$ : 0,0002), con menor h posiblemente influenciado por menor tamaño muestral. Estos resultados junto con la asignación genética de todos los ejemplares en PNMTIAG respecto a poblaciones gallegas de referencia (LÓPEZ *et al.* 2015), sustentarían un contexto poblacional de estabilidad temporal y flujo génico entre poblaciones de la costa gallega adyacentes a PNMTIAG (LÓPEZ *et al.*, 2015), como parte del linaje suratlántico de la especie (RIQUET *et al.* 2019).

### **Trazabilidad genealógica y sistema de apareamiento genético**

El potencial informativo combinado de microsatélites con elevada probabilidad de exclusión

teórica de un falso progenitor, conocido el otro, permite su aplicación en estudios de maternidad en estos signátidos, para identificar al parental femenino de puestas embrionarias. El alto potencial de exclusión de una pareja de progenitores podría ser útil en instalaciones de cría en cautividad con fines de investigación y/o conservación para alguna de estas especies en el futuro, como se ha descrito en otros signátidos (e.g., JONES *et al.* 1999; LÓPEZ *et al.* 2012; 2015). En este estudio, la aplicación de un panel coste-efectivo de cinco microsatélites permitió obtener las primeras evidencias del sistema de apareamiento genético en poblaciones de *S. acus* y *S. typhle* en PNMTIAG-Cíes y Ría de Vigo, de interés evolutivo y como medida de conservación asociada con tamaño efectivo poblacional. En el caso de *S. acus*, con sesgo de hembras en PNMTIAG-Cíes (PLANAS *et al.* 2022), se presentan los primeros datos de asignación parental en poblaciones salvajes europeas, que apuntan a un sistema preferente de poliginia (media de 2,2 hembras) por puesta, con indicios de monogamia en una fracción reducida de machos (~20%), similar en PNMTIAG-Cíes y Ría de Vigo. En la población de *S. typhle* en Ría de Vigo se detectó maternidad múltiple (media de 2,8 hembras) en todas las puestas, compatible con poliginia. A diferencia de la monogamia genética estricta por puesta descrita en caballitos de mar (LÓPEZ *et al.* 2015), se ha demostrado poliginandria genética en otras poblaciones salvajes de *S. typhle*, con una de las tasas de maternidad múltiple más altas (media de 3,1 hembras por puesta; JONES *et al.* 1999), consistente con observaciones en laboratorio, y evidencias de reversión del rol sexual y competencia en apareamiento más intensa en hembras que machos (MOBLEY *et al.* 2011).

## **CONCLUSIONES**

Este proyecto aporta la primera evaluación genética de peces signátidos en los parques nacionales (PNMTIAG y PNMTAC) mediante marcadores mitocondriales y microsatélite. La integración de datos genéticos y morfológicos permitió identificar una limitada diversidad de especies de signátidos distribuidas diferencialmente entre PNMTIAG y PNMTAC, pero

también alertas para estudios futuros sobre posibles errores de clasificación o presencia de especies crípticas. En las especies preferentes por área protegida se observó estabilidad y homogeneidad espacial y temporal de diversidad genética, pero diferenciación entre poblaciones atlánticas y mediterráneas de las especies presentes en ambas vertientes. La conectividad genética con poblaciones de áreas adyacentes es relevante en el mantenimiento demográfico y de diversidad genética por unidad de gestión, jugando las áreas protegidas un papel reservorio para su conservación. El estudio del sistema de apareamiento genético en poblaciones de peces pipa del área PNMTIAG sustenta maternidad múltiple preferente por puesta masculina, de interés evolutivo y demográfico poblacional. El banco de ADN y datos generados aportan referencias de partida en futuros estudios para monitorizar diversidad genética, validar refugios de reproducción, especies crípticas o analizar variación genómica adaptativa. Este estudio dentro del proyecto coordinado HIPPOPARQUES ha contribuido a mejorar el conocimiento de los recursos de peces signati-

dos en PNMTIAG y PNMTAC para apoyar la conservación de estas especies y hábitats costeros asociados.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Organismo Autónomo de Parques Nacionales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (HIPPOPARQUES 1580S/2015). Nuestro agradecimiento a los miembros del equipo y colaboradores del proyecto coordinado HIPPOPARQUES 1541S/2015, a la Xunta de Galicia y a la dirección de los Parques Nacionales por los permisos y por facilitar los muestreos. Agradecer el apoyo prestado por J. Terrados, P. Arechavala y J. Castro del IMEDEA-CSIC, el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura (CSIC) del Govern de les Illes Balears (Dirección General Pesca y Medio Marino), el personal del PNMTAC y los clubs náuticos Portixol y Cala Gamba. Agradecer la contribución de A. López en estudios previos en caballitos de mar, así como la colaboración y apoyo técnico de L. Bouzas, M. Villar, L. Insua y S. Gómez.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORE, F. W., LUIKART, G. & AITKEN, S. N. 2013. Conservation and the Genetics of Populations, 2nd ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- BRAGA GONCALVES, I. CORNETTI, L., COUPERUS, A. S., VAN DAMME, C. J. G. & MOBLEY, K. B. 2017. Phylogeography of the snake pipefish, *Entelurus aequoreus* (Family: Syngnathidae) in the northeastern Atlantic Ocean. *Biological Journal of the Linnean Society* 122: 787–800.
- CASEY, S.P., HALL, H. J., STANLEY, H. F. & VINCENT, A. C. J. 2004. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 261–272.
- CITES. 2020. The Checklist of CITES Species Website. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland. <http://checklist.cites.org>
- DIEKMANN, O. E., GOUVEIA, L., SERRÃO, E. A. & VAN DE VLIET, M. S. 2009. Highly polymorphic microsatellite markers for the black striped pipefish, *Syngnathus abaster*. *Molecular Ecology Resources* 9: 1460–1466.
- DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J. & OVENDEN, J. R. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14: 209–214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>
- EARL, D. A. & VONHOLDT, B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- GALBUSERA, P. H. A., GILLEMONT, S., JOUK, P., TESKE, P. R., HELLEMANS, B. & VOLCKAERT, F. A. M. J. 2007. Isolation of microsatellite markers for the endangered Knysna seahorse *Hippocampus capensis* and their use in the detection of a genetic bottleneck. *Molecular Ecology Notes* 7: 638–640.
- GARCIA, E., RICE, C. A., EERNISSE, D. J., FORSGREN, K. L., QUIMBAYO, J. P. & ROUSE, G. W. 2019. Systematic relationships of sympatric pipefishes (*Syngnathus* spp.): A mismatch between morphological and molecular variation. *Journal of Fish Biology* 95: 999–1012.
- GILBY, B. L., OLDS, A. D., CONNOLLY, R. M., YABSLEY, N. A., MAXWELL, P. S., TIBBETTS, I. R., SCHOEMAN, D. S. & SCHLACHER, T. A. 2017. Umbrellas can work under water: Using threatened species as indicator and management surrogates can improve coastal conservation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 199: 132–140
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- HABLÜTZEL, P. I. & WILSON, A. B. 2011. Notes on the occurrence of *Syngnathus rostellatus* (Teleostei: Syngnathidae) in the Mediterranean. *Marine Biodiversity Records* 4: e57.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- HAMILTON, H., SAARMAN, N., SHORT, G., SELLAS, A. B., MOORE, B., HOANG, T., GRACE, C. L., GOMON, M., CROW, K. & SIMISON, W. B. 2017. Molecular phylogeny and patterns of diversification in syngnathid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107: 388–403.
- HARDY, O. J. & VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.
- HÜBNER, K., GONZÁLEZ-WANGUEMERT, M., DIEKMANN, O. E. & SERRÃO, E. A. 2013. Genetic evidence for polygyny in the black-striped pipefish *Syngnathus abaster*: A microsatellite-based parentage analysis. *Journal of Heredity* 104: 791–797.
- IUCN. 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-2. <http://www.iucnredlist.org>.
- JONES, A. G., ROSENQVIST, G., BERGLUND, A. & AVISE, J. C. 1999. The genetic mating system of a sex-roller-reversed pipefish (*Syngnathus typhle*): a molecular inquiry. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46: 357–365.
- JONES, O. R. & WANG, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551–555.
- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L. & MARSHALL, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106.
- KOPELMAN, N. M., MAYZEL, J., JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N. A. & MAYROSE, I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across  $K$ . *Molecular Ecology Resources* 15: 1179–1191.
- KUTTER, R. H. 2009. Seahorses and their relatives. Seaford: Aquatic Photographics, Australia.
- KUMAR, S., STECHER, G. & TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

- LARSON, S., RAMSEY, C., TINNEMORE, D. & AMEMIYA, C. 2014. Novel microsatellite loci variation and population genetics within leafy seadragons, *Phycodurus eques*. *Diversity* 6: 33-42.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LÓPEZ A., VERA M., OTERO-FERRER F., PARDO B. G., MARTÍNEZ P., MOLINA L. & BOUZA C. 2010. Species identification and genetic structure of threatened seahorses in Gran Canaria Island (Spain) using mitochondrial and microsatellite markers. *Conservation Genetics* 11: 2431-2436.
- LÓPEZ, A., PARDO, B. G., PLANAS, M., QUINTAS, P., MARTÍNEZ, P. & BOUZA C. 2012. A microsatellite panel for mating system analysis and broodstock management of captive long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture* 356-357: 153-157.
- LOPEZ, A., VERA, M., PLANAS, M. & BOUZA, C. 2015. Conservation genetics of threatened *Hippocampus guttulatus* in vulnerable habitats in NW Spain: temporal and spatial stability of wild populations with flexible polygamous mating system in captivity. *PLoS One* 10: e0117538.
- MOBLEY, K. B., SMALL, C. M. & JONES, A. G. 2011. The genetics and genomics of Syngnathidae: pipefishes, seahorses and seadragons. *Journal of Fish Biology* 78: 1624-1646.
- MONTEIRO, N. M., SILVA, R. M., CUNHA, M., ANTUNES, A., JONES, A. G. & VIEIRA, M. N. 2014. Validating the use of colouration patterns for individual recognition in the worm pipefish using a novel set of microsatellite markers. *Molecular Ecology Resources* 14: 150-156.
- MONTEIRO, N. M., CARNEIRO, D., ANTUNES, A., QUEIROZ, N., VIEIRA, M. N. & JONES, A. G. 2017. The lek mating system of the worm pipefish (*Nerophis lumbriciformis*): a molecular maternity analysis and test of the phenotype-linked fertility hypothesis. *Molecular Ecology* 26: 1371-1385.
- MWALE, M., KAISER, H., BARKER, N. P., WILSON, A. B. & TESKE, P. R. 2013. Identification of a uniquely southern African clade of coastal pipefishes *Syngnathus* spp. *Journal of Fish Biology* 82: 2045-2062.
- OSPAR, 2008. Liste OSPAR des espèces et habitats menacés et/ou en déclin. 5 pp. <https://www.ospar.org/work-areas/bdc/species-habitats>
- OTERO-FERRER, F., HERRERA, R., LÓPEZ, A., SOCORRO, J., MOLINA, L. & BOUZA, C. 2015. First records of *Hippocampus algiricus* in the Canary Islands (north-east Atlantic Ocean) with an observation of hybridization with *Hippocampus hippocampus*. *Journal of Fish Biology* 87: 1080-1089.
- PÄÄBO, S., THOMAS, W. K., WHITFIELD, K. M., KUMAZAWA, Y. & WILSON, A. C. 1991. Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *Journal of Molecular Evolution* 33: 426-430
- PALUMBI, S. R., MARTIN, A., ROMANO, S., MCMILLAN, W. O., STICE, L. & GRABOWSKI, G. 1991. The simple fool's guide to PCR, Ver. 2.0. Department of Zoology. University of Hawaii Special Publication, Hawaii.
- PARDO, B. G., LÓPEZ, A., MARTÍNEZ, P. & BOUZA, C. 2007. Novel microsatellite loci in the threatened European long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus*) for genetic diversity and parentage analysis. *Conservation Genetics* 8: 1243-1245
- PIRY, S., ALAPETITE, A., CORNUET, J. M., PAETKAU, D., BAUDOUIN, L. & ESTOUP, A. 2004. GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536-539.
- PLANAS, M., PIÑEIRO-CORBEIRA, C., BOUZA, C., CASTEJÓN-SILVO, I., VERA, M., REGUEIRA, M., BÁRBARA, I., TERRADOS, J., CHAMORRO, A., BARREIRO, R., HERNÁNDEZ-URCERA, J., ALEJO, I., NOMBELA, M., GARCÍA, M. E., PARDO, B. G., PEÑA, V., DÍAZ-TAPIA, P., CREMADES, J. & MORALES-NIN, B. 2022. Signátidos de los Parques Nacionales de las Islas Atlánticas y del Archipiélago de Cabrera. En J. Amengual (ed.) *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2015-2018*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RIQUET, F., LIAUTARD-HAAG, C., WOODALL, L., BOUZA, C., LOUISY, P., HAMER, B., OTERO-FERRER, F., AUBLANC, P., BÉDUNEAU, V., BRIARD, O., EL AYARI, T., HOCHSCHEID, S., BELKHIR, K., ARNAUD-HAOND, S., GAGNAIRE, P. & BIERNE, N. 2019. Parallel pattern of differentiation at a genomic island shared between clinal and mosaic hybrid zones in a complex of cryptic seahorse lineages. *Evolution* 73: 817-835.
- RISPOLI, V. F. & WILSON, A. B. 2008. Sexual size dimorphism predicts the frequency of multiple mating in the sex-role reversed pipefish *Syngnathus typhle*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 30-38.
- ROTH, O., KELLER, I., LANDIS, S. H., SALZBURGER, W. & REUSCH, T. B. H. 2012. Hosts are ahead in a marine host-parasite coevolutionary arms race: innate immune system adaptation in pipefish *Syngnathus typhle* against *Vibrio* phylotypes. *Evolution* 66: 2528-2539.
- ROUSSET, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.



- SANNA, D., BIAGI, F., ALAYA, H. B., MALTAGLIATI, F., ADDIS, A., ROMERO, A., DE JUAN, J., QUIGNARD, J.-P., CASTELLI, A., FRANZOI, P., TORRICELLI, P., CASU, M., CARCUPINO, M. & FRANCALACCI, P. 2013. Mitochondrial DNA variability of the pipefish *Syngnathus abaster*. *Journal of Fish Biology* 82: 856-876.
- SOGABE, A. & TAKAGI, M. 2013. Population genetic structure of the messmate pipefish *Corythoichthys haematopterus* in the northwest pacific: evidence for a cryptic species. *SpringerPlus* 2: 408.
- VAN DE VLIET, M. S., DIEKMAN, O. E. & SERRÃO, E. T. A. 2009. Highly polymorphic microsatellite markers for the short-snouted seahorse (*Hippocampus hippocampus*), including markers from a closely related species the long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus*). *Conservation Genetics Resources* 1: 93.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- WANG, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- WAYCOTT, M., DUARTE, C. M., CARRUTHERS, T. J. B., ORTH, R. J., DENNISON, W. C., OLYARNIK, S., CALLADINE, A., FOURQUREAN, J. W., HECK, K. L., HUGHES, A. R., KENDRICK, G. A., KENWORTHY, W. J., SHORT, F. T. & WILLIAMS, S. L. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 12377-12381.
- WILSON, A. B. 2006. Interspecies mating in sympatric species of *Syngnathus* pipefish. *Molecular Ecology* 15: 809-824.
- WILSON, A. B., VINCENT, A., AHNESJÖ, I. & MEYER, A. 2001. Male pregnancy in seahorses and pipefishes (Family Syngnathidae): rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *Journal of Heredity* 92: 159-166.
- WILSON, A. B. & VERAGUTH, I. E. 2010. The impact of Pleistocene glaciation across the range of a widespread European coastal species. *Molecular Ecology* 19: 4535-4553.
- WOODALL, L. C., KOLDEWEY, H. J. & SHAW, P. W. 2011. Historical and contemporary population genetic connectivity of the European short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* and implications for management. *Journal of Fish Biology* 78: 1738-1756.
- WOODALL, L. C., KOLDEWEY, H. J., BOEHM, J. T. & SHAW, P. W. 2015. Past and present drivers of population structure in a small coastal fish, the European long snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Conservation Genetics* 16: 1139-1153.
- WOODALL, L. C., OTERO-FERRER, F., CORREIA, M., CURTIS, J. M. R., GARRICK-MAIDMENT, N., SHAW, P. W. & KOLDEWEY, H. J. 2018. A synthesis of European seahorse taxonomy, population structure, and habitat use as a basis for assessment, monitoring and conservation. *Marine Biology* 165: 19.