

AZTi

MEMBER OF
BASQUE RESEARCH
& TECHNOLOGY ALLIANCE

www.azti.es



UNIÓN EUROPEA

FONDO EUROPEO MARÍTIMO
Y DE PESCA (FEMP)



**GALPE
MUR**

Grupo de Acción Local de Pesca
y Acuicultura de la Región de Murcia



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN



Región de Murcia

Informe Final de actividades del proyecto

Informe Final
para:

Asociación Nacional de Acuicultura de atún rojo (ANATÚN)

Sukarrieta, 23 de noviembre de 2021

Tipo documento Informe Final
Título documento Fin de actividades del proyecto
Fecha 30/11/2021
Proyecto Biblioteca Genética de los atunes estabulados en las granjas de la Costa de la Región de Murcia
Cliente Asociación Nacional de Acuicultura de atún rojo (ANATÚN)

Responsable proyecto Rodríguez Ezpeleta, Naiara (E-Mail: nrodriguez@azti.es)

Revisado por Unai Cotano (E-Mail: ucotano@azti.es)
Fecha

Aprobado por Unai Cotano (E-Mail: ucotano@azti.es)
Fecha 30 Noviembre 2021

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	6
3.2. SELECCIÓN DE MARCADORES DIAGNÓSTICO.....	6
3.3. DESARROLLO DE ENSAYOS DE GENOTIPADO.....	8
3.4. VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS DE GENOTIPADO.....	9
4. RESULTADOS.....	10
5. CONCLUSIONES.....	16
6. BIBLIOGRAFÍA.....	16

1. ANTECEDENTES

La Asociación Nacional de Acuicultura de atún rojo (ANATÚN) ha solicitado el desarrollo de un banco genético o biblioteca genética con los atunes estabulados en las granjas de engorde en jaulas flotantes de la Región de Murcia con el fin de realizar la identificación genética inequívoca de esos especímenes.

Teniendo en cuenta las problemáticas derivadas de la utilización de los métodos actualmente acreditados que resultan en identificaciones erróneas en algunos casos (ver sección Objetivos), AZTI puede desarrollar un método basado en marcadores nucleares (y no mitocondriales como los ahora disponibles), gracias a un trabajo reciente realizado por el equipo de genética de AZTI.

2. INTRODUCCIÓN

La pesca ilegal, no documentada y no reglamentada induce a la sobrepesca y la mala gestión de los recursos. Por otro lado, existe una exigencia cada vez mayor de los consumidores para conocer el origen y propiedades de los productos pesqueros. Es conocido que la sustitución (voluntaria o no) de especies puede resultar en consecuencias graves en cuanto a la calidad y seguridad alimentarias, así como a la sostenibilidad de los recursos. Por ello, la disponibilidad de metodologías rápidas, poco costosas y fiables para identificar especies es crucial. Esto es sobre todo importante en el caso de especies muy similares para las que las características morfológicas no son suficientes para distinguirlas, como es el caso de algunos túnidos entre sí (e.g. atún rojo del Atlántico y atún rojo del Pacífico o juveniles de rabil y patudo). Los métodos genéticos se presentan como una alternativa fiable, rápida y escalable que puede además aplicarse en productos congelados, troceados y altamente procesados. Por ello, el desarrollo de métodos basados en ADN para identificación de especies pesqueras es

un campo que crece muy rápido y que está contribuyendo de manera significativa a mejorar las inspecciones pesqueras y control de productos.

En el caso del atún rojo, existen metodologías de identificación genética de especie, pero la mayoría se basan en marcadores mitocondriales, los cuales están sujetos a error por las conocidas introgresiones mitocondriales entre *Thunnus orientalis*, *T. thynnus* y *T. alalunga* (Chow et al. 2006). Estas introgresiones han sido responsables de la identificación errónea de algunos especímenes en granjas del Mediterráneo, resultando en la imposibilidad de su comercialización en el mercado nacional debido a la disconformidad con el nombre de la especie declarada. Asimismo, en una de las instalaciones de engorde de atún rojo de la costa de la Región de Murcia se han estabulado ejemplares de atún rojo que, una vez sacrificados para su comercialización, presentaban tanto la 2ª aleta dorsal como la aleta anal una longitud extremadamente larga y una tonalidad amarillenta que hace pensar que pudieran ser túnidos de otra especie distinta a *T. thynnus*. De igual forma, en la campaña de pesca de atún rojo de 2020, en las almadrabas de El Estrecho han capturado ejemplares con estas mismas características, aletas demasiadas largas y tonalidades amarillentas.

Por tanto, debido a la irresolución de los marcadores mitocondriales para identificar especies de túnidos y que los pocos marcadores nucleares desarrollados para este fin no discriminan entre todas las especies y solo se pueden usar como complemento a los marcadores mitocondriales (Viñas, Tudela 2009), es necesario desarrollar y aplicar marcadores nucleares que de manera inequívoca y coste-efectiva identifiquen a qué especie pertenecen los especímenes de las granjas de atún. Partiendo de los marcadores identificados en un estudio previo desarrollado por Díaz-Arce et al (2016) en el que se demuestra el potencial de los marcadores nucleares para discriminar de manera inequívoca entre especies del género *Thunnus* sin depender del genoma mitocondrial, se validarán las sondas para los marcadores con mayor poder de diagnóstico identificados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO y EXTRACCIÓN DE ADN

Se han muestreado 50 especímenes morfológicamente identificados como atún rojo (*T. thynnus*) para que con el método validado se identifiquen genéticamente. De cada espécimen se ha obtenido un trozo de tejido del cual se ha extraído el ADN usando el Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, WI, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se ha suspendido en agua Milli-Q y se ha determinado su concentración mediante el Quant-iT dsDNA HS assay kit using a Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). La integridad del ADN se ha verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, migrando unos 100 ng teñidos con GelRed™.

3.2. SELECCIÓN DE MARCADORES DIAGNÓSTICO

Para la identificación de especímenes de atún rojo (*T. thynnus*) basada en el uso de marcadores genéticos, se ha realizado un esquema de identificación por pasos (**Figura 1**) que implica discriminación de esta especie de entre todas las especies del género *Thunnus*. Este esquema de identificación se ha realizado para minimizar el número de pasos necesarios para identificar inequívocamente especímenes de atún rojo y teniendo en cuenta la relación filogenética entre todas las especies dentro del género *Thunnus*. La obtención de marcadores que discriminen entre las especies *T. thynnus* y *T. orientalis* será especialmente compleja dada la cercanía evolutiva de ambas especies.

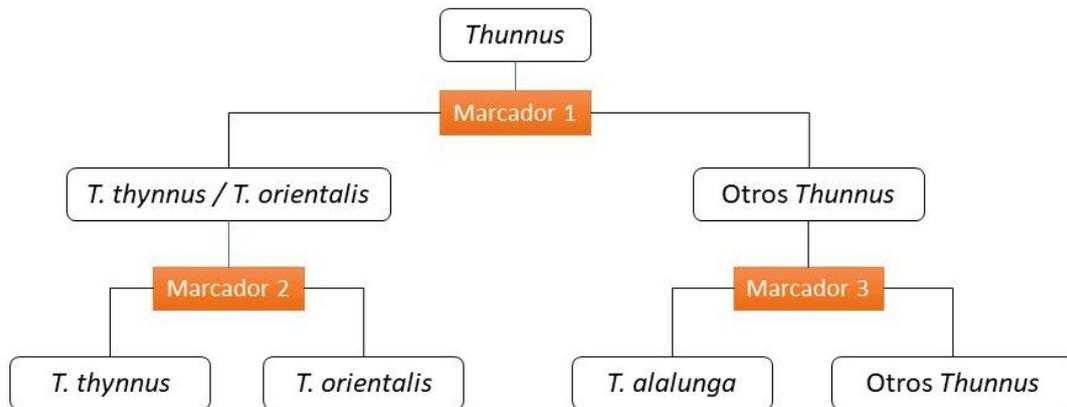


Figura 1. Esquema de identificación planificado donde se indica los grupos de especies que discrimina cada grupo de marcadores candidatos.

La identificación de marcadores para cada paso se ha basado en el juego de datos de Díaz-Arce et al. (2016) así como en un juego de datos de atún rojo no publicado (Díaz-Arce et al. en preparación). El juego de datos consta de un ensamblaje de secuencias de individuos de diferentes especies del género *Thunnus* obtenidas mediante una técnica de secuenciación masiva llamada RAD-seq que proporciona una representación reducida del genoma. En total, para la selección de marcadores se han utilizado 5 individuos de *T. orientalis*, 4 individuos de *T. alalunga*, 234 individuos de *T. thynnus* y 23 individuos de otras especies del género *Thunnus*. De entre el catálogo de secuencias ensambladas, se identificaron y clasificaron las posiciones variables con dos posibles versiones alternativas que estuvieran fijadas dentro de cada especie siguiendo el patrón de diferenciación genética que respondiera al esquema de identificación mostrado en la **Figura 1**.

Según se ha visto en estudios previos, las especies *T. thynnus* y *T. orientalis* son especies evolutivamente muy cercanas y comparten un ancestro común relativamente reciente en la escala evolutiva, por lo que para seleccionar marcadores que diferenciases entre estas especies se utilizó un software específico, llamado TRES (Kavakiotis et al. 2015) que evalúa el poder discriminativo de cada posición variable entre los individuos de ambas especies incluidas en el juego de datos. En ausencia de

marcadores con un poder discriminativo del 100%, se eligieron 2 marcadores del tipo “Marcador 2” de entre los 10 marcadores mejor evaluados. El poder de discriminación combinado de dichos marcadores se estimó utilizando el método leave-one-out implementado en el software específico GENECLASS2 (Piry et al. 2004).

Además, cada grupo de marcadores candidatos seleccionados se filtraron para minimizar el porcentaje de genotipos incompletos en la base de datos y se seleccionaron solo aquellas posiciones variables que no tuvieran otras posiciones variables en al menos las 30 posiciones nucleotídicas en ambos flancos de la cadena de ADN.

3.3. DESARROLLO DE ENSAYOS DE GENOTIPADO

De entre los marcadores genéticos seleccionados dentro de cada grupo, se ha testado su viabilidad para el diseño de sondas de hibridación tipo Taqman® utilizando en la aplicación disponible en la web del proveedor “ThermoFisher” (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>).

Estas sondas de hibridación permiten la identificación del genotipo presente en esa posición del genoma para cada muestra, y por tanto la asignación de la muestra a uno de los grupos de discriminación de dicho marcador.

3.4. VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS DE GENOTIPADO

Para la **validación técnica** del “Marcador 1” que diferencia las especies de atún rojo (*T. orientalis* y *T. thynnus*) del resto de especies del género *Thunnus*, se utilizó ADN de dos individuos diferentes de cada una de las siguientes especies: *T. thynnus*, *T. alalunga*, *T. albacares*, *T. obesus*, *T. maccoyii*, *T. atlanticus*. Para la **validación técnica** de los marcadores tipo “Marcador 2” y “Marcador 3” que diferencian entre las dos especies de atún rojo *T. thynnus* y *T. orientalis* y entre *T. alalunga* y otras especies del género *Thunnus* respectivamente se utilizó ADN de cinco individuos de *T. thynnus*, cinco de *T. orientalis*, cuatro individuos de *T. alalunga* y un individuo de *T. maccoyii*. Todas las muestras utilizadas para la validación técnica de los marcadores se utilizaron para la selección de los mismos.

Para la **validación biológica**, se usaron muestras de especie conocida que no se habían utilizado para la selección de marcadores: *T. thynnus* (18 individuos), *T. alalunga* (17 individuos), *T. maccoyii* (3 individuos), *T. orientalis* (5 individuos), así como 2 muestras de referencia para cada una de las dos alternativas para cada marcador de genotipo conocido.

Para realizar la **identificación de especie en 100 muestras de tejido ciegas** proporcionadas por Taxon, se siguió el esquema de discriminación planificado ([Figura 1](#)). En cada ensayo realizado se introdujeron dos muestras de *T. alalunga* y de *T. thynnus* respectivamente de genotipos conocidos como referencia. Para asignar la especie de origen se utilizó el criterio Rannala & Mountain integrado en el software GENECLASS2 (Piry et al. 2004) utilizando como referencia los genotipos de muestras de *T. thynnus* y *T. orientalis* utilizados para la selección de marcadores así como las utilizadas para la validación de los marcadores y requiriendo un porcentaje mínimo de asignación del 80%, utilizado en estudios previos con aplicaciones similares (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2019).

4. RESULTADOS

De entre las 136,623 posiciones variables dentro del género *Thunnus* genotipadas en al menos el 90% de los individuos de cada especie incluidos en el juego de datos, se seleccionaron 9 posiciones candidatas del tipo “Marcador 1”, 10 del tipo “Marcador 2” y 110 del tipo “Marcador 3”. De entre los que presentaban viabilidad para el tipo de diseño Taqman, se han seleccionado uno del tipo “Marcador 1” y “Marcador 3” para los ensayos de validación. No se encontró ningún marcador con poder de discriminación del 100% para el “Marcador 2” y por lo tanto se eligieron 2 marcadores con un poder de asignación combinado del 97,4%.

En la **validación técnica**, el test de replicabilidad con las muestras usadas para seleccionar los marcadores resultó en genotipos idénticos a los obtenidos previamente con la técnica de secuenciación RAD-seq, validando los ensayos desarrollados.

En la **validación biológica**, las muestras se separaron según lo esperado para cada caso y de manera acorde con las 4 muestras de referencia incluidas en cada ensayo (**Tabla 1**). En los ensayos de validación de los “Marcadores 2” una pequeña proporción de muestras de *Thunnus thynnus* y *Thunnus orientalis* mostraron genotipos heterocigotos, lo cual entra dentro de lo esperado, teniendo en cuenta no se encontraron marcadores fijados que diferenciasen entre las dos especies.

Tabla 1. Genotipos obtenidos para las muestras utilizadas en la validación biológica y especie asignada para cada muestra. Los genotipos homocigotos para el alelo 1 (1/1), homocigotos para el alelo 2 (2/2) o heterocigotos (1/2) se indican para cada ensayo. “Marcador 1”: *T. thynnus* y *T. orientalis* (2/2), *T. alalunga* y otras especies (1/1); “Marcador 3”: *T. alalunga* (2/2) y otras especies (1/1). “Marcador 2(1)”/“Marcador 2(2)”: *T. thynnus* (1/1) y *T. orientalis* (2/2); se indica porcentaje de asignación basado en los “Marcador 2(1)” y “Marcador 2(2)” para la especie identificada en el ensayo.

Número de muestra	Especie (según morfología)	Marcador				Especie asignada	Valor de asignación (%)
		1	2 (1)	2(2)	3		
1	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/2	-	<i>T. thynnus</i>	96.2
2	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
3	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
4	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
5	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
6	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
7	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
8	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/2	-	<i>T. thynnus</i>	96.2
9	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/2	-	<i>T. thynnus</i>	96.2
10	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
11	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
12	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
13	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
14	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
15	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
16	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
17	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
18	<i>T. thynnus</i>	2/2	1/1	1/1	-	<i>T. thynnus</i>	99.9
19	<i>T. orientalis</i>	2/2	1/2	1/2	-	<i>T. orientalis</i>	86.3
20	<i>T. orientalis</i>	2/2	1/2	1/2	-	<i>T. orientalis</i>	86.3
21	<i>T. orientalis</i>	2/2	2/2	1/2	-	<i>T. orientalis</i>	99.9
22	<i>T. orientalis</i>	2/2	2/2	2/2	-	<i>T. orientalis</i>	100.0
23	<i>T. orientalis</i>	2/2	2/2	1/2	-	<i>T. orientalis</i>	99.9
24	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
25	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
26	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
27	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
28	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-

29	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
30	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
31	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
32	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
33	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
34	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
35	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
36	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
37	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
38	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
39	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
40	<i>T. alalunga</i>	1/1	-	-	2/2	<i>T. alalunga</i>	-
41	<i>T. maccoyii</i>	1/1	-	-	1/1	<i>Thunnus sp.</i>	-
42	<i>T. maccoyii</i>	1/1	-	-	1/1	<i>Thunnus sp.</i>	-
43	<i>T. maccoyii</i>	1/1	-	-	1/1	<i>Thunnus sp.</i>	-

El 100% de las **muestras ciegas** proporcionadas fueron identificadas como *T. thynnus* / *T. orientalis* tras el test con el “Marcador 1”. Los test realizados con los “Marcadores 2” para diferenciar entre estas dos últimas especies asignan 93 de las 100 muestras a *T. thynnus*, y las 7 muestras restantes no se asignan de manera robusta a ninguna de las dos especies (**Tabla 2**), siendo tres de ellas más probablemente *T. thynnus* y cuatro *T. orientalis* según el porcentaje de asignación. Esta incertidumbre está también en línea con los resultados de la validación biológica que encuentran algunas muestras heterocigotas.

Tabla 2. Asignación de especie de 100 muestras de origen desconocido basadas en los “Marcadores 2” que discriminan entre *T. thynnus* y *T. orientalis*. Las muestras que no se asignan con un valor de asignación > 80% a ninguna de las dos especies se indican con un asterisco (*) junto al número de muestra.

Número de muestra	Marcador			Especie asignada	Valor de asignación (%)
	1	2(1)	2(2)		
1*	2/2	1/2	1/1	<i>T. thynnus</i>	62.8
2	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
3	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
4	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
5	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
6	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
7	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
8	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
9	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
10	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
11	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
12	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
13	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
14	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
15	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
16	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
17	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
18	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
19	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
20	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
21	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
22	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
23	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
24	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
25	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
26	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
27	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
28	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
29*	2/2	1/2	1/1	<i>T. thynnus</i>	62.8
30	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
31	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
32	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
33	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7

34	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
35	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
36	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
37*	2/2	1/1	2/2	<i>T. orientalis</i>	70.4
38	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
39	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
40	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
41	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
42	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
43	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
44	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
45	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
46	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
47	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
48	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
49	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
50	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
51*	2/2	1/1	2/2	<i>T. orientalis</i>	70.4
52	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
53	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
54	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
55	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
56	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
57	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
58	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
59	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
60	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
61	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
62	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
63*	2/2	1/1	2/2	<i>T. orientalis</i>	70.4
64	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
65	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
66	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
67	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
68	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
69	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
70	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
71	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
72	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
73	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7

74	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
75	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
76	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
77	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
78	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
79*	2/2	1/2	1/1	<i>T. thynnus</i>	62.8
80	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
81	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
82	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
83	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
84	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
85	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
86	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
87*	2/2	1/1	2/2	<i>T. orientalis</i>	70.4
88	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
89	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
90	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
91	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
92	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
93	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
94	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
95	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
96	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
97	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
98	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7
99	2/2	1/1	1/2	<i>T. thynnus</i>	92.6
100	2/2	1/1	1/1	<i>T. thynnus</i>	99.7

5. CONCLUSIONES

El ensayo desarrollado para identificar especie de atún muestra una eficacia del 100% para determinar si un espécimen es *T.orientalis*/*T.thynnus* y otra especie Thunnus y, en el segundo caso, si es *T. alalunga* u otra especie. En cuanto a la identificación entre *T. orientalis* y *T. thynnus*, el método es eficaz en más del 97%, lo cual sería quizá mejorable aumentando el número de muestras de referencia de *T. orientalis* y el número de marcadores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Chow, S, T Nakagawa, N Suzuki, H Takeyama, T Matsunaga. 2006. Phylogenetic relationships among Thunnus species inferred from rDNA ITS1 sequence. Journal of Fish Biology 68:24-35.
- Díaz-Arce, N, H Arrizabalaga, H Murua, X Irigoien, N Rodríguez-Ezpeleta. 2016. RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas. Molecular Phylogenetics and Evolution 102:202-207.
- Kavakiotis, I, A Triantafyllidis, D Ntelidou, P Alexandri, H-J Megens, RPMA Crooijmans, MAM Groenen, G Tsoumakas, I Vlahavas. 2015. TRES: Identification of Discriminatory and Informative SNPs from Population Genomic Data. Journal of Heredity 106:672-676.
- Piry, S, A Alapetite, J-M Cornuet, D Paetkau, L Baudouin, A Estoup. 2004. GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. Journal of Heredity 95:536-539.
- Rodríguez-Ezpeleta, N, N Díaz-Arce, JF Walter III, et al. 2019. Determining natal origin for improved management of Atlantic bluefin tuna. Frontiers in Ecology and the Environment 17:439-444.
- Viñas, J, S Tudela. 2009. A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus Thunnus). PLOS ONE 4:e7606.