



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Júlia Losada Tourinho

Estrutura populacional e filogeografia de *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

Rio de Janeiro

2013

Júlia Losada Tourinho

Estrutura populacional e filogeografia de *Panulirus argus* (Latreille, 1804)



—Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Mateo Solé-Cava

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T727 Tourinho, Júlia Losada.
Estrutura populacional e filogeografia de *Panulirus argus*
(Latreille, 1804) / Júlia Losada Tourinho. – 2013.
177 f.

Orientador: Antonio Mateo Solé-Cava.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Biotecnologia.

1. Lagosta – Teses. 2. Filogeografia– Teses. 3. Genética de
populações – Teses. 4. Complexo IV da Cadeia de Transporte de
Elétrons. 5. Palinuridae. 6. DNA Mitocondrial. I. Solé-Cava, Antonio
Mateo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 599:595.728

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Júlia Losada Tourinho

Estrutura populacional e filogeografia de *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de março de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Mateo Solé-Cava (Orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marcos Domingos Siqueira Tavares
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Carla Zilberberg
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Solé, por todos os ensinamentos, críticas, orientações e conselhos, tanto profissionais como pessoais, que com certeza contribuíram para o que sou atualmente. Por ter confiado em mim e aceitado ser meu orientador.

Ao Cris, por ser meu co-orientador extraoficial, por compartilhar comigo seu projeto e por sempre me ensinar e me ajudar nesses seis anos e meio de convivência.

À CAPES por fornecer minha bolsa de doutorado e a todos os membros da pós-graduação.

Aos laboratórios de Porífera e Polychaeta por cederem seus espaços e horários de máquinas de PCR.

Às técnicas do sequenciador, Aretusa e Bianca, e ao técnico do laboratório, Itamar.

A todos que ajudaram com amostras tão valiosas e importantes: Ghennie, por trazer quase todas as amostras da Colômbia; Solé, por trazer as amostras da Venezuela; Lígia e Ricardinho, por aproveitarem de uma viagem de turismo para trazer amostras de Cartagena; Yoamel Milán-García, por não só fornecer as amostras de Cuba, como por ajudar tanto no trabalho de laboratório; Haydée pelas amostras de Salvador; E ao Cris por ter realizado todas as outras coletas na costa brasileira.

A todos que passaram pelo LBDM nesses quatro anos e ajudaram muitas vezes a transformar horas de trabalho em prazer: Ghennie, Nathália, Serginho, Haydée, Bianca, Marta, Rebeca, Carla, André, Izabela, Rayssa, Lívia, Tereza, Carol, Cintia. Em especial ao Anderson por me ajudar tanto e reservar horas de trabalho para tirar todas as minhas dúvidas, e ao Daniel por ser um grande amigo, por todas as conversas e apoio, e por sempre estar disponível pra me ajudar. Ao Pedro, por todas as caronas, cervejas e conversas, por ceder seu quarto de São Paulo e por ser amigo. Ao André, por gentilmente disponibilizar seu computador/servidor para rodar minhas análises.

Ao Prof. Dr. Marcos Tavares, por me receber em seu laboratório, me ensinar tanto sobre este grupo incrível dos Crustáceos, me ajudar com valiosos conselhos e

também ceder amostras para este trabalho. A todos do Laboratório de Carcinologia do MZUSP, em especial, à Aline, Allysson, Will, Lu, Ariane e Mauro, pela companhia, ajuda e amizade. À Isabel e ao Juan Camilo, por me acolherem tantas vezes em São Paulo com carinho.

Aos meus alunos do IFRJ, com quem eu aprendi mais do que ensinei.

Às queridas Joyce e Maria, alunas dedicadas e amorosas, cobaias na minha primeira experiência de orientação.

À minha família, pelo apoio de sempre. Em especial aos meus pais, por sempre darem valor ao meu esforço e trabalho, por tentarem compreender o que eu faço e por acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, Lígia e Myrtis, por serem tão bons exemplos de dedicação, esforço e capacidade. E, sobretudo, por serem minhas amigas.

Às minhas irmãs por escolha, Cleo e Camila, por tantos anos de amizade, compreensão e companheirismo.

Aos amigos distantes, mas presentes, Juliana e Marino.

À minha grande amiga Sandra, por ser minha companheira nos altos e baixos da vida do Rio de Janeiro e do doutorado. Por me ajudar a redescobrir a beleza do Rio através dos olhos colombianos.

Ao meu Ale, pelo amor e apoio, por sempre acreditar em mim. E por me ajudar a colorir todas as redes de haplótipos, fornecer computador para realizar análises e por tantas horas de discussão sobre meus resultados.

E, sobretudo, às lagostas.

RESUMO

TOURINHO, Júlia Losada. **Estrutura populacional e filogeografia de *Panulirus argus* (Latreille, 1804)**. 2013. 177 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Panulirus argus (Latreille, 1804) é uma das principais espécies de lagosta no Atlântico, sendo um dos maiores recursos pesqueiros do Atlântico Ocidental, onde apresenta um alto valor comercial. A forte exploração da espécie resulta em uma grande pressão sobre suas populações. Recentemente, foi descoberto que sob o binômio *P. argus* estão contidas duas espécies crípticas que ocorrem em alopatria, uma na região do Caribe e outra na costa brasileira. Esta tese tem como objetivo estudar como se estruturam geneticamente as populações dessas duas espécies, com o propósito de fornecer mais informações para a determinação de estoques e um correto manejo das espécies, e analisar os processos históricos evolutivos que moldaram suas histórias demográficas. Para tal, foram estudados dois marcadores mitocondriais (região controle e o gene da Citocromo Oxidase I) e *loci* de microssatélites de indivíduos de 7 regiões do Caribe (Florida, Bahamas, Turks e Caicos, Porto Rico, Cuba, Colômbia e Venezuela) e 11 estados do Brasil (Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo). Dentro de cada espécie foram observadas duas linhagens mitocondriais diferentes, que co-ocorriam, de maneira homogênea, ao longo de suas distribuições. Hipotetizo que essas linhagens foram formadas a partir de um evento de vicariância com contato secundário ou como consequência de um efeito gargalo seguido de expansão. As duas linhagens são evidentes nas sequências da região controle mitocondrial, mas no gene da COI foram evidentes apenas em *P. cf. argus* do Caribe. As linhagens do Brasil se separaram há aproximadamente 233 - 288 mil anos e cada uma sofreu expansão em tempos diferentes, a primeira se expandiu há 100 mil anos e a segunda linhagem há 50 mil anos. As linhagens do Caribe se separaram cerca de 1 milhão de anos atrás e possuem o mesmo tempo de expansão, 50 mil anos. Os microssatélites não revelaram subdivisão populacional para nenhuma das duas espécies, porém os marcadores, juntos, sugeriram um fluxo gênico diferenciado entre localidades expostas a diferentes correntes marítimas. Considerando que essas lagostas são intensamente exploradas, é importante ser cuidadoso no momento de definir estoques pesqueiros. Para a espécie do Brasil, dois estoques pesqueiros foram sugeridos, o primeiro do Pará à Bahia e o segundo do sul da Bahia a São Paulo. Para a espécie do Caribe, foi mantida e reforçada a hipótese de quatro estoques sugerida pela FAO (Norte, Sul, Centro-Norte e Centro-Sul).

Palavras-chave: Palinuridae. *Panulirus*. Lagosta. Filogeografia. Genética de populações. Microssatélites. Região controle. Citocromo Oxidase I

ABSTRACT

Panulirus argus (Latreille, 1804) is one of the main lobster species in the Atlantic, and one of the largest fisheries in the western Atlantic, with a high commercial value. The heavy exploitation of the species results in much pressure on its populations. Recently, it was discovered that under the name *P. argus* there are two cryptic species that occur in allopatry, one in the Caribbean and the other on the coast of Brazil. This thesis studies the population genetic structure of those two species with the purpose of providing more information to delimitate stocks for fisheries management, and for understanding the historical processes that have shaped their evolutionary demographic histories. For this, we analysed two mitochondrial markers (control region and the Cytochrome Oxidase I gene) and microsatellite markers of individuals from 7 localities in the Caribbean (Florida, Bahamas, Turks and Caicos, Puerto Rico, Cuba, Colombia, and Venezuela) and 11 States of Brazil (Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, and São Paulo). Within each species two different mitochondrial lineages were observed. They occurred throughout their distributions, and it is hypothesized that they were formed from a vicariance event with secondary contact or are the result of a genetic bottleneck followed by expansion. The lineages of *P. cf. argus* from Brazil were only observed in the mitochondrial control region and were separated approximately 233-288 thousand years ago, and each lineage underwent expansion at different times: the first expanded 100,000 years ago and the second 50,000 years ago. The lineages of the Caribbean species were found for the two mitochondrial markers. They were separated about 1 million years ago and have had the same expansion time, 50,000 years. Microsatellites revealed no population subdivision for either species, but the molecular markers together suggest a differential gene flow between localities exposed to different currents. Since these lobsters are heavily exploited, it is important to be conservative when defining their fishing stocks. For the species from Brazil, two fishing stocks are suggested, the first from Pará to Bahia States and the second from Southern Bahia to São Paulo State. For the species of the Caribbean, our data give support to the four stocks suggested by FAO (North, South, North Central and South Central).

Keywords: Palinuridae. *Panulirus*. Lobster. Phylogeography. Population genetics. Microsatellite. Control region. Cytochrome Oxidase I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa de distribuição de <i>Panulirus argus</i>	26
Figura 2 –	Foto de um indivíduo de <i>Panulirus cf. argus</i> de Curaçao.....	28
Figura 3 –	Mapa com as localidades amostradas de <i>Panulirus argus</i>	37
Figura 4 –	Imagem do alinhamento parcial de sequências da região controle mitocondrial de indivíduos de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	41
Figura 5 –	Método do iniciador com cauda.....	47
Figura 6 –	Árvore de Neighbor-joining de sequências de COI.....	56
Figura 7 –	Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil, de acordo com a distância genética corrigida.....	60
Figura 8 –	Rede de haplótipos da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	61
Figura 9 –	Proporção de cada linhagem de haplótipos da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil por localidade amostrada.....	62
Figura 10 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica a partir de sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	63
Figura 11 –	Análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C).....	68
Figura 12 –	Gráficos de <i>Extended Bayesian Skyline Plot</i> com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil para a linhagem A (A) e linhagem B (B).....	71
Figura 13 –	Rede de haplótipos do gene da enzima Citocromo Oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	73
Figura 14 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	74

Figura 15 –	Análise da distribuição das diferenças feita com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita).....	79
Figura 16 –	Gráfico de Extended Bayesian Skyline Plot com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	79
Figura 17 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	84
Figura 18 –	Análise fatorial de correspondência por indivíduo (A) e por localidade de coleta (B) de acordo com os dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	87
Figura 19 –	Valores de LnP(D) para cada valor de K, obtidos com os dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	88
Figura 20 –	Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de duas populações (K=2) de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	88
Figura 21 –	Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida.....	92
Figura 22 –	Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial da linhagem A de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida.....	92
Figura 23 –	Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial da linhagem B de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida.....	93
Figura 24 –	Rede de haplótipos da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	94
Figura 25 –	Proporção de cada linhagem de haplótipos da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe por localidade.....	95
Figura 26 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica de sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	97

Figura 27 –	Análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C).....	101
Figura 28 –	Gráficos de <i>Extended Bayesian Skyline Plot</i> para a linhagem A (A) e linhagem B (B) da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	103
Figura 29 –	Rede de haplótipos do gene da enzima Citocromo Oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	105
Figura 30 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica de sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	106
Figura 31 –	Análise da distribuição das diferenças sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C) com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	113
Figura 32 –	Gráficos de <i>Extended Bayesian Skyline Plot</i> para a linhagem A (A) e linhagem B (B) de sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	114
Figura 33 –	Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	117
Figura 34 –	Análise fatorial de correspondência por indivíduo (A) e população (B) de acordo com os dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	118
Figura 35 –	Gráfico com o número de partições (K) mais provável a partir dos valores de $\ln P(D)$ obtidos com os dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	119
Figura 36 –	Gráfico com o número de partições (K) mais provável a partir da estatística de Delta K obtida com os dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	119
Figura 37 –	Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de duas populações (K=2) de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	120
Figura 38 –	Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de três populações (K=3) de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	120

Figura 39 – Oscilação do nível do mar ao longo do último ciclo glacial.....	129
Figura 40 – Mapa batimétrico da costa brasileira mostrando os limites da plataforma continental e a profundidade do nível do mar.....	131
Figura 41 – Perfis morfológicos oceânicos de cinco locais da costa brasileira	132
Figura 42 – Mapa com as principais correntes superficiais que chegam ao Brasil.....	136
Figura 43 – Mapa com as principais correntes do Caribe.....	143
Figura 44 – Mapa com os estoques sugeridos pela FAO.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número total de amostras de <i>Panulirus argus</i> e as respectivas regiões de coleta.....	36
Tabela 2 –	Sequências dos iniciadores utilizados nas ampliações e nos sequenciamentos da região controle do DNA mitocondrial de <i>P. argus</i>	40
Tabela 3 –	Sequências dos iniciadores utilizados nas ampliações de microssatélites, suas respectivas temperaturas de anelamento e a espécie na qual foram utilizados.....	49
Tabela 4 –	Painéis de genotipagem utilizados com seus marcadores de microssatélites e temperatura de anelamento, fluoróforo de marcação respectivos.....	51
Tabela 5 –	Total de indivíduos amostrados de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil utilizados para cada marcador, por localidade.....	58
Tabela 6 –	Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil por localidade.....	58
Tabela 7 –	Número de haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de <i>P. cf. argus</i> do Brasil considerando apenas sítios onde ocorrem transversões, por localidade.....	59
Tabela 8 –	Valores de F_{ST} par a par entre as sequências da região controle mitocondrial de populações de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	63
Tabela 9 –	Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com as sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	65
Tabela 10 –	Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com as sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	66
Tabela 11 –	Testes de neutralidade Tajima D e F_S de Fu para todas as sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil em conjunto e para as linhagens separadamente.....	67

Tabela 12 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil sob um cenário de expansão demográfica.....	69
Tabela 13 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil sob um cenário de expansão espacial.....	70
Tabela 14 –	Número de indivíduos (N), haplótipos (N _H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) do gene da enzima Citocromo Oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil por localidade.....	72
Tabela 15 –	Valores de F _{ST} par a par entre as populações com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	76
Tabela 16 –	Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	76
Tabela 17 –	Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	77
Tabela 18 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	78
Tabela 19 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com o gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil...	78
Tabela 20 –	Excesso de homozigotos detectados na análise com o programa Micro-Checker com os genótipos de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	81
Tabela 21 –	Valores de heterozigosidades observada (H _O) e esperada (H _E) para todos os <i>loci</i> de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	82
Tabela 22 –	Média harmônica dos valores do índice de Jost D (acima da diagonal) e valores de F _{ST} (abaixo da diagonal) par a par entre as populações para os 16 <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	83

Tabela 23 –	Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com a informação de <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	86
Tabela 24 –	Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil.....	86
Tabela 25 –	Total de indivíduos de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe amostrados e utilizados para cada marcador por localidade.....	90
Tabela 26 –	Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe por localidade.....	90
Tabela 27 –	Número de haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe considerando apenas sítios onde ocorrem transversões, por localidade.....	91
Tabela 28 –	Valores de F_{ST} par a par entre as populações com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	96
Tabela 29 –	Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	98
Tabela 30 –	Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	99
Tabela 31 –	Testes de neutralidade Tajima D e F_S de F_u para todas as sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe em conjunto e para as linhagens separadamente.....	100
Tabela 32 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	102
Tabela 33 –	Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com sequências da região controle mitocondrial de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	102
Tabela 34 –	Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) do gene da enzima Citocromo Oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	104

Tabela 35 – Valores de F_{ST} par a par entre sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de populações de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	107
Tabela 36 – Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	108
Tabela 37 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	109
Tabela 38 – Testes de neutralidade D de Tajima e F_S de Fu para todas as sequências em conjunto e para as linhagens separadamente com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	110
Tabela 39 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	111
Tabela 40 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	112
Tabela 41 – Excesso de homozigotos detectados na análise com o programa Micro-Checker com genótipos de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	116
Tabela 42 – Valores de heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) para todos os <i>loci</i> de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	116
Tabela 43 – Valores do índice D de Jost (acima) e de F_{ST} (abaixo) par a par entre as populações para os 8 <i>loci</i> de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	117
Tabela 44 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos <i>a priori</i> com dados de microssatélites de <i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe.....	121

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Conectividade no ambiente marinho e estrutura populacional	20
1.2	Genética pesqueira e identificação de estoques	21
1.3	Filogeografia	23
1.4	Família Palinuridae	24
1.5	Espécie estudada: <i>Panulirus argus</i> (Latreille, 1804)	25
1.5.1	<u>Distribuição e biologia</u>	25
1.5.2	<u>Aspectos taxonômicos</u>	30
1.5.3	<u>Importância econômica e definição de estoques</u>	32
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Coleta e armazenamento das amostras	35
3.2	Extração de DNA	38
3.3	DNA mitocondrial	39
3.3.1	<u>Amplificações do mtDNA por PCR e sequenciamento</u>	39
3.3.2	<u>Análise dos dados</u>	41
3.4	Microssatélites	46
3.4.1	<u>Amplificação e genotipagem</u>	46
3.4.2	<u>Análise dos dados</u>	52
4	RESULTADOS	55
4.1	Análise filogenética	55
4.2	<i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil	57
4.2.1	<u>Região controle mitocondrial</u>	57
4.2.2	<u>Citocromo Oxidase I</u>	72
4.2.3	<u>Microssatélites</u>	80
4.3	<i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe	89
4.3.1	<u>Região controle mitocondrial</u>	89
4.3.2	<u>Citocromo Oxidase I</u>	104
4.3.3	<u>Microssatélites</u>	115
5	DISCUSSÃO	122

5.1	Confirmação taxonômica de <i>Panulirus argus</i>	122
5.2	<i>Panulirus cf. argus</i> do Brasil	123
5.2.1	<u>Diversidade genética e filogeografia</u>	123
5.2.2	<u>Estrutura populacional</u>	133
5.3	<i>Panulirus cf. argus</i> do Caribe	139
5.3.1	<u>Diversidade genética e filogeografia</u>	139
5.3.2	<u>Estrutura populacional</u>	142
5.4	Considerações finais e conservação de recursos pesqueiros	146
6	CONCLUSÃO	149
	REFERÊNCIAS	150
	APÊNDICE – Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster <i>Panulirus argus</i>	167

INTRODUÇÃO

As lagostas espinhosas são recursos pesqueiros importantes em toda sua distribuição. Além de sua relevância econômica, estas lagostas possuem papel importante na comunidade marinha através de sua posição na cadeia alimentar, sendo predadoras de várias espécies bentônicas e presas de grandes predadores (PHILLIPS, 2006). *Panulirus argus* é uma das principais espécies de lagosta no Atlântico, sendo um dos maiores recursos pesqueiros do Atlântico Ocidental, onde apresenta um alto valor comercial. A forte exploração da espécie resulta em uma grande pressão sobre suas populações. Com isso, é necessária a elaboração de estratégias efetivas de manejo que evitem a redução da diversidade e a eliminação dos diferentes estoques pesqueiros, sendo para isso crítico que se tenha entendimento da dinâmica populacional dessas espécies.

Recentemente foi descoberto que sob o nome *P. argus* estão contidas duas unidades evolutivas independentes, consideradas inicialmente subespécies e posteriormente confirmadas como espécies crípticas que ocorrem em alopatria, uma na região do Caribe e outra na costa brasileira (SARVER; SILBERMAN; WALSH, 1998; TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012).

Esta tese tem como proposta estudar a filogeografia e estruturação populacional das espécies caribenha e brasileira de *P. cf. argus*, assim como discutir os fatores históricos que moldaram suas histórias demográficas, a fim de contribuir para a compreensão de sua história evolutiva e gerar dados para apoiar uma estratégia adequada de seu manejo como recurso pesqueiro.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Conectividade no ambiente marinho e estrutura populacional

O ambiente marinho oferece uma variedade de mecanismos para a dispersão de indivíduos dentro e entre populações. A extensão de uma dispersão exitosa é um grande determinante da dinâmica populacional, sendo responsável por conectar indivíduos de uma espécie ao longo de sua distribuição (COWEN; SPONAUGLE, 2009). Para a maioria dos invertebrados sésseis ou bentônicos com mobilidade limitada, a troca de indivíduos entre populações ocorre principalmente durante o estágio larval pelágico, sendo assim a larva a principal fase dispersora do ciclo de vida (COWEN; SPONAUGLE, 2009; THORPE; SOLÉ-CAVA; WATTS, 2000).

A capacidade de dispersão larval está diretamente relacionada com seu tempo de duração (COWEN; SPONAUGLE, 2009). Porém, processos e fatores biológicos, como comportamento larval, predação, associações biológicas, disponibilidade de habitat e sobrevivência depois do assentamento podem interferir direta ou indiretamente na conectividade das populações (BUTLER MJ et al., 2011; COWEN; SPONAUGLE, 2009). Além disso, processos e fatores físicos, como temperatura, salinidade, topografia marinha, intensidade e direção dos ventos, velocidade e direção das correntes, frentes oceânicas, giros e redemoinhos, entre outros, podem alterar padrões de dispersão de larvas e impedir ou diminuir a troca de indivíduos entre localidades aparentemente conectadas (COWEN; SPONAUGLE, 2009; SELKOE; HENZLER; GAINES, 2008; YEUNG; LEE, 2002; YEUNG et al., 2001).

Todas as espécies devem ser conservadas como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). A informação sobre os limites entre populações e seus níveis de diferenciação genética é importante para sua conservação, pois auxilia em definir sua resposta a impactos naturais ou antropogênicos. A perda de variabilidade devido aos efeitos da deriva genética e endocruzamento é maior quando ocorre redução do tamanho populacional, colocando populações em risco de extinção. Fatores como fidelidade a locais de reprodução e capacidade de dispersão podem afetar a

distribuição de indivíduos e ocasionar fragmentação da espécie. O uso de marcadores moleculares, como o DNA mitocondrial e *loci* de microssatélites, já está amplamente estabelecido para estudos populacionais e para diferenciação de espécies proximamente relacionadas (BURTON, 2009; DINIZ-FILHO et al., 2008).

O DNA mitocondrial é haploide, não sofre recombinação (com algumas exceções: GALTIER et al. (2009); PIGANEAU; GARDNER; EYRE-WALKER (2004)) e possui herança materna. Através da distribuição e frequência de seus haplótipos é possível a identificação e detecção de espécies crípticas, além da detecção de fluxo gênico e estruturação populacional histórica (BURTON, 2009; DINIZ-FILHO et al., 2008). Já os microssatélites são marcadores co-dominantes, não-codificantes e altamente polimórficos, compostos por variações no número de pequenas sequências repetitivas (1 – 6 nucleotídeos). São marcadores úteis para análise de variabilidade e estruturação populacional, inclusive para estimar tamanho efetivo e detectar migrantes (BURTON, 2009; HANSEN; KENCHINGTON; NIELSEN, 2001).

1.2 Genética pesqueira e identificação de estoques

A queda na produtividade pesqueira ressaltou o problema da sobre-exploração e de seus efeitos deletérios para a manutenção de recursos pesqueiros (WARD, 2000). Além de causar redução no tamanho populacional, a pesca excessiva também pode levar a uma alteração na dinâmica populacional através da seleção de tamanho dos organismos pescados, retirando das populações sempre os maiores indivíduos (ANDERSON et al., 2008). A retirada dos indivíduos maiores pode provocar um impacto na distribuição etária das populações pescadas, causando uma dinâmica populacional não linear instável, o que pode levar a explosões populacionais, seguidas de extinções (ANDERSON et al., 2008).

O manejo pesqueiro tem como principal objetivo assegurar a sustentabilidade dos recursos e proteger as populações das espécies exploradas (WARD, 2000, 2002). Para isso é necessário aperfeiçoar a exploração de forma a permitir o rendimento máximo sustentado, que consiste na quantidade máxima de capturas que se pode retirar de uma unidade populacional de recurso pesqueiro ao longo dos anos sem colocar em risco a sua capacidade de regeneração no futuro. Caso isso

não ocorra, a exploração intensiva e predatória desses recursos pode levar não só a uma séria diminuição na viabilidade das espécies exploradas, mas também na extinção, local ou generalizada, dos seus estoques (THORPE; SOLÉ-CAVA; WATTS, 2000).

Estoque pode ser entendido como um grupo de indivíduos que se cruzam ao acaso, mantêm uma homogeneidade ecológica na exploração de recursos alimentares e época reprodutiva, e são diferenciados de grupos semelhantes (CARVALHO; HAUSER, 1994). Porém, o conceito de estoque pode ser definido de diversas outras maneiras, dependendo da ênfase dada para homogeneidade, importância do isolamento reprodutivo, e sua relevância para a exploração (BOOKE, 1981, 1999; CARVALHO; HAUSER, 1994; IHSEN et al., 1981; OVENDEN, 1990).

A estimativa do tamanho populacional e da distribuição dos estoques pesqueiros geralmente é feita usando os dados da história de vida, parasitas, microquímica, merística e morfometria e padrão de correntes marítimas. Atualmente, porém, os marcadores moleculares têm sido cada vez mais empregados para este fim. Em muitos países, o controle dos estoques é feito essencialmente com base em dados moleculares, por serem mais precisos e menos influenciados pelo meio-ambiente que os métodos usados tradicionalmente (PALSBØLL; BÉRUBÉ; ALLENDORF, 2007; THORPE; SOLÉ-CAVA; WATTS, 2000). No Brasil, os estudos de genética marinha já foram capazes de delimitar estoques de peixes, como a Guaiuba (VASCONCELLOS et al., 2008) e a Corvina (VASCONCELLOS, 2012), e invertebrados como camarões (GUSMÃO et al., 2006; VOLOCH; SOLÉ-CAVA, 2005) e moluscos (LAZOSKI; GUSMÃO; BOUDRY, 2011; OLIVEIRA et al., 2005).

Em geral, para delinear o manejo pesqueiro, que inclui o desenvolvimento de políticas, planejamento e execução de estratégias, deve-se obter informação sobre aspectos biológicos e ambientais. Devem ser levadas em conta, também, as informações sobre aspectos operacionais das pescarias, fatores econômicos, políticos e socioculturais (AVISE, 2004; CARVALHO; PITCHER, 1994; EVANS; GRAINGER, 2002; RYMAN, 1991).

1.3 Filogeografia

Os padrões de distribuição da biodiversidade observados atualmente são resultado de processos ecológicos e evolutivos passados que moldaram a história demográfica das populações. O estudo da distribuição espacial de linhagens genealógicas de uma mesma espécie ou de espécies proximamente relacionadas é chamado de filogeografia (AVISE, 2009). O maior objetivo da filogeografia é decifrar os componentes espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolutivos que os geraram (BEHEREGARAY, 2008). Com uma amostragem apropriada de indivíduos e genes, podem-se testar hipóteses biogeográficas, descrever a evolução do isolamento reprodutivo de populações, e inferir processos subjacentes à origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (BEHEREGARAY, 2008).

A história demográfica de uma espécie é influenciada diretamente pelo ambiente. Portanto, conhecendo os processos de mudanças climáticas que geraram eventos geológicos e climáticos maiores e alterações de habitat, é possível criar hipóteses sobre como essas mudanças ambientais podem ter influenciado os padrões atuais de distribuição da diversidade biológica. Ao mesmo tempo, entender como uma espécie reage evolutivamente a mudanças no ambiente permite fazer previsões sobre seu futuro, auxiliando no desenvolvimento de estratégias adequadas de manejo visando sua conservação.

Utilizando a teoria da coalescência e baseado na teoria da neutralidade (KIMURA; OHTA, 1974), a variação e a relação genealógica entre sequências de DNA podem ser utilizadas para reconstruir os processos evolutivos e os eventos demográficos passados de uma população ou espécie, como variação do tamanho populacional, eventos de fragmentação e seleção, entre outros (AVISE, 2009; KNOWLES; MADDISON, 2002; ROSENBERG; NORDBORG, 2002). Além de poderem ser organizadas em genealogias, as variantes do DNA mitocondrial de indivíduos de diferentes populações também podem ser utilizadas para a construção de redes de haplótipos, de modo a incorporar processos populacionais na reconstrução do relacionamento entre haplótipos e permitir relações mais complexas entre eles (POSADA; CRANDALL, 2001).

1.4 Família Palinuridae

As lagostas espinhosas pertencem à família Palinuridae Latreille, 1802, infraordem Achelata, e possuem grande importância comercial para a pesca e aquicultura. A família é composta por 12 gêneros e aproximadamente 56 espécies e 5 subespécies reconhecidas (CHAN, 2010). Nesta família, o gênero *Panulirus* White, 1847 é considerado como o de evolução mais recente e é também o mais diversificado, possuindo 21 espécies e 5 subespécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais dos principais oceanos (CHAN, 2010; GEORGE; MAIN, 1967). Destas espécies, apenas quatro ocorrem no lado oeste do Oceano Atlântico, *Panulirus guttatus* (Latreille, 1804), *P. argus* (Latreille, 1804), *P. echinatus* Smith, 1869 e *P. laevicauda* (Latreille, 1817), sendo *P. argus* a mais abundante.

As lagostas do gênero *Panulirus* são reconhecidas por possuir um órgão estridulatório, uma placa antenular larga com espinhos dorsais e ausência de pleópodos no primeiro e sexto somitos abdominais, entre outras características (HOLTHUIS, 1991). Elas são forrageadoras generalistas e possuem populações numerosas e bem distribuídas, ocupando em geral substratos de corais e rochosos (PHILLIPS, 2006). A maior parte das espécies deste gênero é explorada por atividades pesqueiras e, destas espécies, todas estão consideradas atualmente como completamente exploradas (PHILLIPS, 2006). Das 21 espécies, apenas cinco foram usadas em trabalhos de genética populacional: *P. cygnus*, *P. interruptus*, *P. inflatus*, *P. argus* e *P. japonicus* e não foi encontrada evidência de estruturação populacional em nenhum deles (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2006, 2008; INOUE et al., 2007; KENNINGTON et al., 2013; NARO-MACIEL et al., 2011b; SILBERMAN; SARVER; WALSH, 1994).

Dentro de outros gêneros da família Palinuridae, marcadores moleculares foram úteis para determinar a variação intra e interespecífica (CANNAS et al., 2006), para encontrar estruturação populacional (BABBUCCI et al., 2010; GOPAL et al., 2006; MATTHEE et al., 2007; PALERO et al., 2008, 2010, 2011; TOLLEY et al., 2005), e para estabelecer relações filogenéticas e tempo de divergência entre espécies (GROENEVELD et al., 2007; PALERO; CRANDALL; et al., 2009; PALERO; LOPES; et al., 2009; PATEK; OAKLEY, 2003; PTACEK et al., 2001).

No Brasil, as lagostas representam o segundo recurso pesqueiro para exportação mais rentável do país. As espécies mais pescadas são respectivamente: a lagosta vermelha, *P. argus*; a lagosta verde, *P. laevicauda*; e a lagosta pintada, *P. echinatus*. *P. argus* é a lagosta mais abundante, correspondendo a mais de 80% da biomassa de lagostas produzida no país (NETO; DORNELLES, 1996). Em 2007, o país exportou 2.078 toneladas de lagostas congeladas, gerando uma receita de mais de 90 milhões de dólares (IBAMA, 2007).

1.5 Espécie estudada: *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

1.5.1 Distribuição e biologia

Panulirus argus (Latreille, 1804) é uma lagosta que ocorre no lado oeste do oceano Atlântico, com distribuição descrita desde a Carolina do Norte (Estados Unidos) até o Rio de Janeiro (Brasil), incluindo Bermuda, Golfo do México e o mar do Caribe (HOLTHUIS, 1991) (Figura 1). Existem duas espécies consideradas sinônimas de *P. argus*, ambas descritas para o Caribe: *Palinurus ricordi* (Guérin-Méneville, 1836) e *Palinurus americanus* (Edwards, 1837).

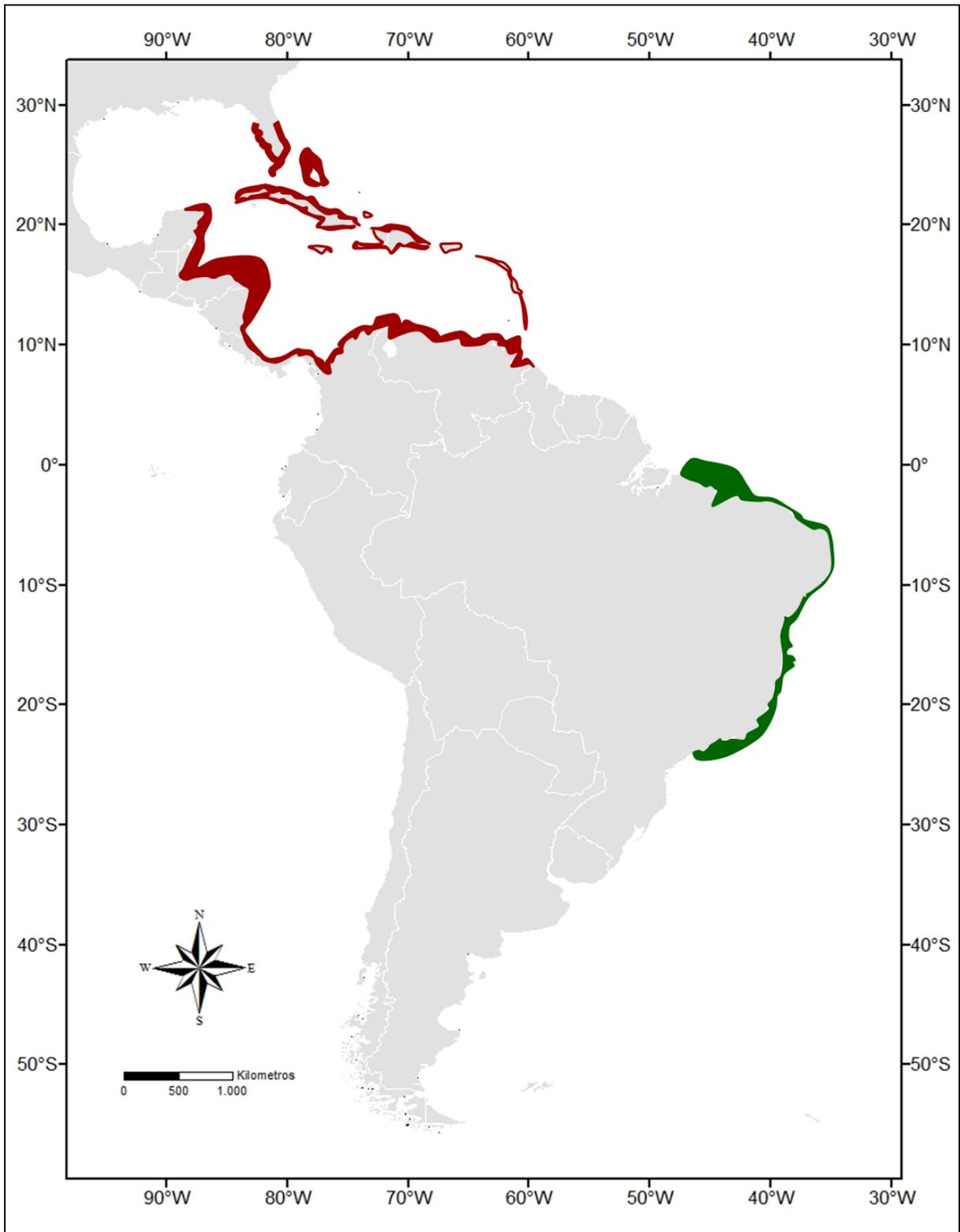


Figura 1 – Mapa de distribuição de *Panulirus argus*. A área realçada mostra a distribuição da espécie no Caribe (vermelho) e no Brasil (verde).

P. argus é conhecida no Brasil como lagosta-vermelha e é reconhecida principalmente por apresentar quatro manchas ocelares grandes, brancas ou amareladas, rodeadas por uma cor escura, no segundo e sexto segmentos de seu abdômen, além de outras manchas menores espalhadas dorso-lateralmente (Figura 2).

Essa espécie possui carapaça com fortes espinhos em linhas longitudinais aproximadamente regulares, e espinhos supra-orbitais grandes, comprimidos e curvados para cima e para frente. Seus olhos são grandes e proeminentes e têm antênulas medindo cerca de $2/3$ do comprimento do corpo, com o flagelo externo mais curto e grosso que o interno, ciliado distalmente. Suas antenas são grandes e pesadas, com vários espinhos presentes no pedúnculo e com flagelo ciliado internamente. Suas patas ambulatórias apresentam extremidades agudas e seu abdome é liso e com somitos cruzados por sulcos interrompidos no meio. Os seus pleópodos são ausentes no primeiro somito abdominal e a divisão proximal do telson possui alguns espinhos fortes (MELO, 1999). Apresenta dimorfismo sexual caracterizado pela presença de aberturas genitais na base do quinto par de patas, no macho, e do terceiro par, na fêmea; pleópodos duplos na fêmea; uma quela na extremidade do quinto par de patas da fêmea, utilizado para o rompimento da massa espermatofórica depositada no esterno (MARX; HERRNKIND, 1985).



Figura 2 – Foto de um indivíduo de *Panulirus cf. argus* de Curaçao, da coleção de carcinologia do Smithsonian Institute (USNM 1160029).

P. argus é uma espécie de ciclo de vida longo, e realiza uma série de mudanças de ambiente e de profundidade de ocupação entre sua fase larval e a maturidade sexual. Sua reprodução compreende três etapas: (1) acasalamento emparelhado do macho com a fêmea, em contato direto das respectivas regiões ventrais; (2) desenvolvimento embrionário, identificado pela presença de ovos aderidos aos pleópodos; (3) pós-desova, identificada pela presença de restos de massa espermatófórica e ausência de ovos no abdômen. São espécies ovulíparas, com fecundação externa e desenvolvimento embrionário externo, com período de incubação de quatro a seis semanas (FONTELES FILHO, 2007).

A sua larva, chamada de filosoma, é planctônica e tem uma duração de 6 a 10 meses, passando por 11 estágios larvais pelágicos (BAISRE, 1964; LEWIS, 1951). Durante esse período, as larvas estão sujeitas ao movimento das correntes marinhas, sendo este a fase de maior dispersão do ciclo de vida das lagostas. A larva filosoma se transforma em puerulus, sendo levada através de correntes pela plataforma continental até chegar à costa. Ao se estabelecer em substrato de algas, ocorre a muda para pós-puerulus, larva com hábitos bentônicos e carapaça endurecida, de cor marrom-avermelhada (BUTLER; HERRNKIND; HUNT, 1997). Após esse estágio, já como juvenis (24 a 36 meses de idade), as lagostas adquirem a coloração típica da espécie, definem suas características sexuais e dispersam para as zonas de alimentação (BERRILL, 1975). Juvenis tardios e sub-adultos costumam ocupar áreas rochosas sem vegetação e buscam refúgios em cavernas, corais e esponjas (ARCE et al., 1997; BERRILL, 1975; HERRNKIND; JERNAKOFF; BUTLER, 1994). Após atingirem a maturidade sexual, tornam-se adultos a partir de 36 meses e reprodutores a partir de 48 meses (FONTELES FILHO, 2007). A distribuição espacial de *P. argus* tem abundância com tendência crescente no sentido perpendicular à costa e atinge seu máximo na faixa de profundidade de 41 a 50 metros (FONTELES FILHO, 2007).

As lagostas do gênero *Panulirus* fazem desovas em vários momentos, com variação de tempo individual e dentro da população (FONTELES FILHO, 2007). Por este motivo, e devido à sua grande distribuição, indivíduos de *P. argus* em período reprodutivo ocorrem ao longo de todos os meses do ano (FONTELES FILHO, 2007). Porém, uma maior intensidade reprodutiva parece ocorrer nos meses de primavera e verão. No Brasil, as épocas de maior reprodução ocorrem de janeiro a abril e de setembro a outubro no nordeste brasileiro (FONTELES FILHO, 2007). Em Cuba, o

maior número de fêmeas com ovos é visto entre março e maio, com um pico menor em setembro (CRUZ; LUCKHURST; MULLER, 2001). Na plataforma da Nicarágua, a maior atividade reprodutiva observada ocorre em março e de setembro a novembro (CRUZ; LUCKHURST; MULLER, 2001). Na Colômbia, picos de reprodução foram registrados em maio e de setembro a outubro (GALLO; ROJAS; CORREA, 1998).

O comprimento dos indivíduos de *P. argus* ao atingir a maturidade também pode variar conforme a região. Em média, o comprimento da carapaça na primeira maturidade varia entre 78 e 83 mm (ARCE; LEON, 2001). No Brasil, o comprimento total médio registrado para fêmeas é de 20,1 cm (FONTELES FILHO, 2007).

1.5.2 Aspectos taxonômicos

O status taxonômico de *P. argus* foi questionado por Sarver e colaboradores (1998), que compararam fragmentos de dois genes mitocondriais, 16S e COI, de amostras de *P. argus* do Brasil (Rio Grande do Norte) e do Caribe (Miami, Jamaica, Antígua, Panamá e Venezuela). O grau de diferenciação genética encontrado foi de 8,3% para o gene 16S e 19,8% para o gene COI, consistente com o nível de divergência já observado entre subespécies e espécies em outros grupos de organismos (AVISE, 2004). Como essas lagostas também apresentam algumas diferenças morfológicas, os autores sugeriram a separação de *P. argus* em duas subespécies, *P. argus argus*, presente no Caribe, e *P. argus westonii*, presente no Brasil.

Em um trabalho mais recente, Diniz e colaboradores (2005) descreveram iniciadores para a amplificação da região controle do DNA mitocondrial de *P. argus*. Os autores realizaram uma avaliação preliminar da estrutura populacional desta espécie, em seis localidades do Caribe e duas do Brasil, e encontraram resultados similares aos de Sarver e colaboradores (1998), mas não tomaram decisões em relação ao status taxonômico das lagostas estudadas.

Estudos moleculares que fiz durante meu mestrado utilizando as três regiões mitocondriais (COI, 16S e RC) e depois, durante o período do doutorado, adicionando o gene nuclear ANT (ATP/ADP translocase), junto com uma amostragem mais completa, mostraram uma divergência profunda entre indivíduos

do Caribe e do Brasil, se tratando de duas espécies: uma ocorre do sul dos Estados Unidos à Venezuela, e a outra ocorre na costa brasileira (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012; TOURINHO, 2009). A distribuição das duas espécies não é completamente restrita, já que existe registro da ocorrência da espécie do atlântico sul-ocidental na Flórida (SARVER; FRESHWATER; WALSH, 2000). Nesse trabalho, Sarver e colaboradores verificaram que duas amostras coletadas na Flórida possuíam haplótipo do DNA mitocondrial compatível com os haplótipos obtidos a partir de indivíduos coletados no Brasil (SARVER; FRESHWATER; WALSH, 2000).

Apesar da separação de *P. argus* em duas subespécies ter sido sugerida em 1998, essa classificação foi provisional e, portanto, não foi considerada para a avaliação desse recurso pesqueiro pelos governos e organizações de pesca internacionais. Além disso, não foi feita uma descrição taxonômica detalhada dessas duas subespécies (e tampouco foi designado um holótipo para cada uma). Como a localidade tipo de *P. argus* é classificada como desconhecida (HOLTHUIS, 1991), não é possível determinar qual espécie deve manter o binômio *P. argus*. Uma análise morfológica dos possíveis sítios da espécie, que se encontram no Museu de História Natural de Paris, deve ser realizada para esclarecer sua origem e, conseqüentemente, os indivíduos que coincidirem com a descrição do holótipo devem manter o nome de *P. argus*, enquanto uma nova espécie deve ser descrita para os demais indivíduos. Como dito anteriormente, as subespécies denominadas por Sarver e colaboradores (1998) (*P. argus argus* e *P. argus westonii*), não foram formalmente descritas, não foram apresentadas fotos ou desenhos e não tiveram tipos designados. Devido aos autores terem feito uma sugestão de nomenclatura provisional, o nome *Panulirus argus westonii* não está disponível (capítulo 1, artigo 15 do código internacional de nomenclatura zoológica; ICZN, 1999; CHAN, 2010) e não pode ser usado na descrição da nova espécie. Por este motivo, as duas espécies continuarão sendo referidas como *P. cf. argus* do Caribe e *P. cf. argus* do Brasil ao longo deste trabalho.

1.5.3 Importância econômica e definição de estoques

P. argus é a espécie de maior importância econômica no oeste do Oceano Atlântico, com uma produção em torno de 35 mil toneladas em 2010 (SIBENI; CALDERINI, 2012). Esta espécie é pescada e comercializada ao longo de toda a sua distribuição. Seus principais produtores, Cuba, Bahamas, Brasil, Nicarágua, Honduras e Estados Unidos, são responsáveis por cerca de 90% do total pescado (COCHRANE; CHAKALALL, 2001; SIBENI; CALDERINI, 2012).

Desde 1997, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), junto com a Comissão de Pesca do Atlântico Centro-Occidental (WECAFC), tem realizado *Workshops* com os objetivos de avaliar a situação da pesca de *P. argus* ao longo de sua distribuição, estimular a pesquisa e garantir o manejo sustentável desse recurso. Uma das resoluções desses encontros é urgência de se ter um controle mais efetivo da pesca dessa lagosta pelos países envolvidos. Muitos países ainda não regulam a pesca da lagosta e outros não o fazem de maneira eficiente. Para que isso seja feito, é fundamental que os estoques pesqueiros dessa espécie sejam corretamente identificados ao longo de toda a sua área de distribuição.

Nas reuniões da FAO e da WECAFC em 1997 e 1998, COCHRANE e CHAKALALL (2001) e MEDLEY e VENEMA (2001) definiram estoques de *P. argus* com base na natureza das plataformas costeiras e no conhecimento das correntes da região. Os estoques sugeridos por eles foram Norte (Norte de Cuba, Florida, Bahamas, Ilhas de Turks e Caicos e Bermudas), Centro Norte (México, Belize e Sul de Cuba), Centro Sul (Colômbia, Nicarágua, Honduras e Jamaica) e Sul (Venezuela e Brasil). Porém, são necessários estudos mais aprofundados sobre a estrutura populacional e sistemática desta espécie para uma delimitação de estoques mais precisa e eficaz.

Até recentemente, poucos trabalhos na literatura utilizaram marcadores genéticos para estudar a estrutura populacional de *P. argus*, e esses estudos sempre foram feitos em partes restritas de sua distribuição (DINIZ; MACLEAN; OGAWA; CINTRA; et al., 2005; NARO-MACIEL et al., 2011).

O primeiro estudo genético-populacional com a lagosta-vermelha, por exemplo, utilizou eletroforese de alozimas e detectou restrições ao fluxo gênico entre

seis locais diferentes no Caribe (Elliot Key e Key West, Flórida; Cancun; Jamaica; Ilhas Virgens; e Trinidad) (MENZIES; KERRIGAN, 1979). Entretanto, outros trabalhos que compararam populações do Caribe, também com alozimas (GLAHOLT; SEEB, 1992; HATELEY; SLEETER, 1993), e com RFLP de DNA mitocondrial total (SILBERMAN; SARVER; WALSH, 1994), não detectaram estruturação genética naquela região. No Brasil, um estudo com alozimas não detectou heterogeneidade genética entre amostras de localidades com influência de correntes marítimas diferentes (Corrente do Norte do Brasil e Corrente do Brasil) (OGAWA et al., 1991).

P. argus é uma espécie de ciclo de vida longo e com larva planctônica de longa duração. Porém, apesar de possuírem um alto potencial de dispersão, as larvas apresentam comportamento ontogenético de migração vertical (OVM), diminuindo sua dispersão com o passar do tempo (BUTLER MJ et al., 2011).

Durante ao menos três meses, estas larvas estão sujeitas ao sistema de correntes marítimas locais (BUTLER MJ et al., 2011; RUDORFF et al., 2009a, 2009b), o que pode diminuir o fluxo gênico entre áreas aparentemente conectadas (YEUNG; LEE, 2002; YEUNG et al., 2001).

Dois correntes marítimas principais passam pela costa brasileira em sentidos opostos, originadas pela bifurcação da Corrente Sul-Equatorial ao chegar à costa nordeste brasileira: a Corrente do Norte do Brasil (mais ao norte, Corrente das Guianas), que desvia para o norte, e a Corrente do Brasil, que se volta para o sul. Esse sistema de correntes pode dificultar o fluxo de larvas de lagosta entre o norte e o sudeste brasileiro, contribuindo para a estruturação genética destas populações.

O conhecimento da história evolutiva de *P. cf. argus* do Caribe e *P. cf. argus* do Brasil é crucial para entendermos como estas espécies respondem às mudanças no clima e no ambiente e o quanto elas são ou podem se tornar frágeis a impactos ambientais ou antropogênicos. O estudo genético dessas espécies pode não só elucidar suas histórias evolutivas passadas como também gera informação sobre sua situação atual, incorporando mais informação para a determinação de políticas de manejo desses recursos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar como se estruturam geneticamente as espécies de *Panulirus cf. argus* com o propósito de fornecer mais informações para a determinação de estoques e um correto manejo das espécies, e entender os processos históricos evolutivos que moldaram suas histórias demográficas.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar geneticamente as populações de *P. cf. argus* do Caribe e verificar a presença de estoques distintos no Caribe;
- 2) Caracterizar geneticamente as populações de *P. cf. argus* do Brasil e verificar a presença de estoques distintos ao longo da costa brasileira;
- 3) Formular hipóteses sobre a evolução das populações de *P. cf. argus* no Atlântico Sul Ocidental;
- 4) Formular hipóteses sobre a evolução das populações de *P. cf. argus* na região do Caribe.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e armazenamento das amostras

Amostras de *P. cf. argus* foram coletadas a partir da pesca artesanal ou compradas frescas em mercados regionais, em diversas localidades no litoral brasileiro e no Caribe (Tabela 1; Figura 3). As amostras coletadas foram identificadas morfolologicamente (HOLTHUIS, 1991) e um fragmento de um pereópodo ou de tecido muscular foi retirado com auxílio de tesoura e pinça, armazenado em etanol 90% e transportado ao laboratório para as posteriores análises genéticas. Outras amostras foram obtidas na coleção de carcinologia do Museu de Zoologia da USP (MZUSP) (Tabela 1).

Tabela 1 – Número total de amostras de *Panulirus argus* e as respectivas regiões de coleta. **ID** é a sigla que será usada para denominar a localidade de amostragem ao longo desta tese.

Localidade		ID	N	
Cuba	Norte de La Habana	CBN	10	
	Norte de Villa Clara	CBN	8	
	Sul de Matanzas	CBS	35	
Colômbia	San Andrés	AS	2	
	Cartagena	CT	9	
	La Guajira	LG	8	
	Santa Marta	SM	20	
Venezuela	Caracas	Ven	10	
	Pará	Belém	PA	12
Brasil (N/NE)	Maranhão	São Luiz	MA	29
	Piauí	Luiz Correa	PI	20
	Ceará	Fortaleza	CE	74
	Rio Grande do Norte	Natal	RN	86
	Pernambuco	Recife	PE	10
	Alagoas	Maceió	AL	30
	Bahia	Salvador	BA	7
	Bahia	Alcobaça	BA2	42
	Espírito Santo	Marataízes	ES	59
	Brasil (SE)	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	RJ
São Paulo		Ubatuba (MZUSP)	SP	4
Total			476	

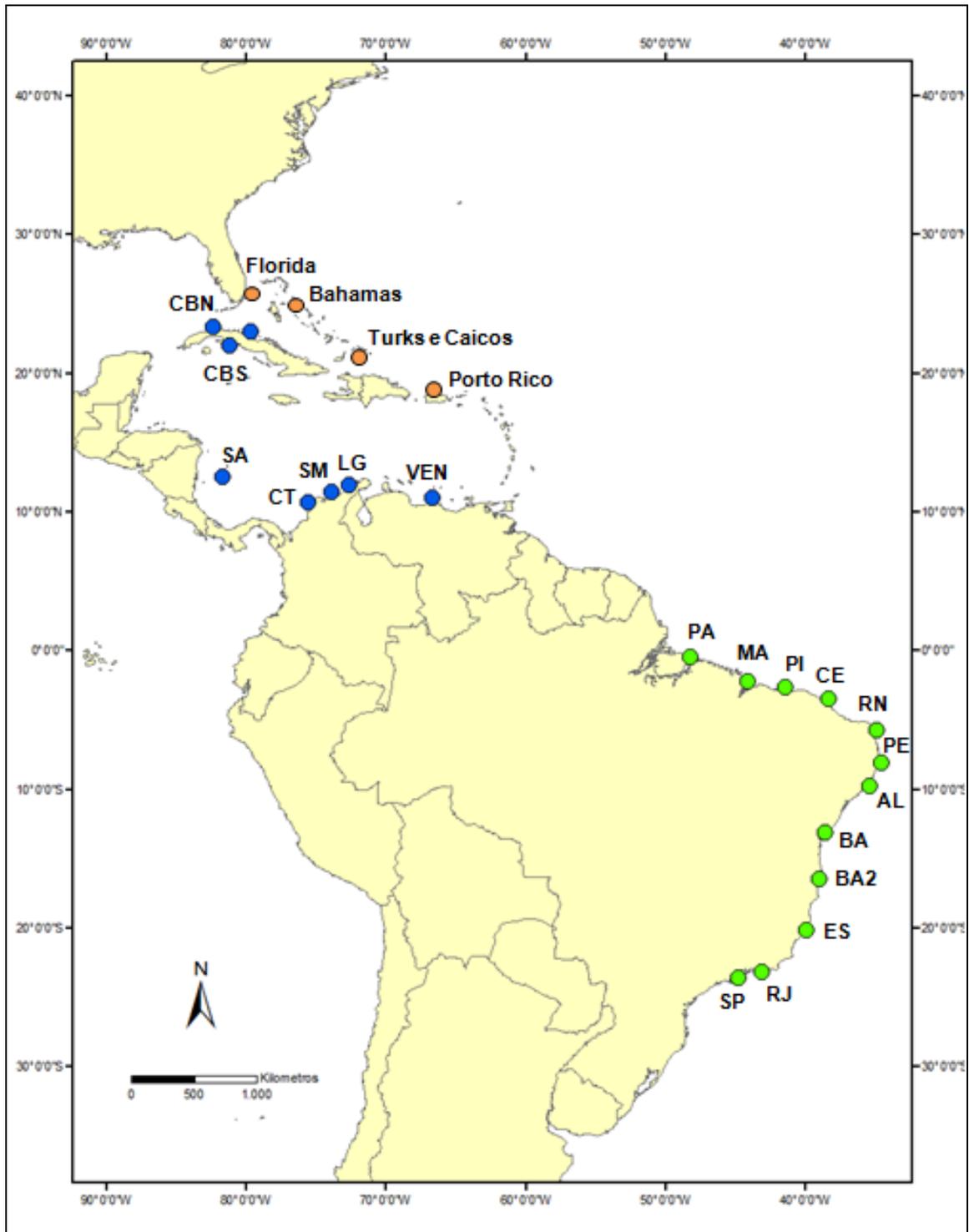


Figura 3 – Mapa com as localidades amostradas de *Panulirus argus*. Os pontos em laranja são as localidades de origem das seqüências obtidas pela base de dados GenBank.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras coletadas foi feita a partir de uma modificação no protocolo de extração salina (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Um fragmento de tecido de aproximadamente 20 mg foi macerado, com o auxílio de um bastão estéril, em 500 μ L tampão de lise (SDS 1%; NaCl 50 mM; EDTA 50 mM; Tris HCl 50 mM, pH 8,0) com 60 μ g de proteinase K e incubado a 55 °C em um banho-maria durante, no mínimo, duas horas para a digestão completa do tecido. Após esse período, o extrato obtido foi centrifugado a 14000 RPM (rotações por minuto) durante 15 minutos, para a precipitação dos restos celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 300 μ L de uma solução de cloreto de sódio 5 M. O extrato foi centrifugado novamente a 14000 RPM durante 15 minutos e 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para outro tubo. A esse sobrenadante, foi adicionado igual volume de isopropanol absoluto gelado e o extrato armazenado no congelador durante ao menos 2 horas para otimizar a precipitação do DNA. Após esse período, o extrato foi centrifugado mais uma vez a 14000 RPM por 15 minutos visando à completa precipitação do DNA. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 750 μ L de etanol 70% gelado, para a retirada do excesso de sal, e seco à temperatura ambiente durante 2 horas. A presença de DNA de alto peso molecular foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) em tampão TBE 0,5X (concentração final: 0,045 M Tris Base; 0,045 M Ácido Bórico; 1 mM EDTA), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta. Adicionalmente, foi feita a quantificação do DNA extraído em nanofotômetro e o DNA foi diluído, quando necessário, para uma concentração aproximada de 30 ng/ μ L. Os extratos que continham DNA foram, por fim, estocados em freezer a -20 °C.

3.3 DNA Mitocondrial

3.3.1 Amplificações do mtDNA por PCR e sequenciamento

Foram utilizadas sequências de dois *loci* mitocondriais: a região controle (RC) e a região 5' do gene da enzima Citocromo Oxidase I (COI). Para a amplificação da RC foram utilizados os iniciadores CrIF e CrIR (DINIZ; MACLEAN; OGAWA; CINTRA; et al., 2005), descritos para a amplificação da região controle mitocondrial da espécie *P. cf. argus*. Para a amplificação da COI foram utilizados os iniciadores universais LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al., 1994). Após uma baixa eficácia inicial da amplificação e posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados com os iniciadores universais, foi visto que o iniciador reverso (HCO2198) não era totalmente complementar às sequências de *P. cf. argus* e foi verificada a existência de sítios com maior afinidade com a ponta 3' deste iniciador em uma região menos de 100 bases anterior aos sítios de alinhamento com o iniciador *forward* (LCO1490) em várias sequências de indivíduos do Brasil. Utilizando o alinhamento das sequências obtidas com sucesso de *Panulirus* spp. e sequências do genoma mitocondrial completo de três espécies do gênero *Panulirus* disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), foram desenhados dois novos iniciadores reversos, COIarg1 e COIarg2, mais internos e compatíveis com as espécies estudadas (Tabela 2).

As reações de amplificação foram feitas em um termociclador utilizando 1 µL de DNA, 1 U da enzima Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dinucleotídeo (dNTP), 0,2 µM de cada iniciador, 2,5 mM de MgCl₂ e tampão de PCR 1X (Promega), em 25 µL de volume final de reação. Para detectar possíveis contaminações, foram incluídos controles negativos, consistindo de reações contendo água no lugar do DNA molde, em todas as amplificações. Os parâmetros de termociclagem para a amplificação com os dois iniciadores foram os seguintes: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 50 segundos cada de desnaturação a 93 °C, anelamento a 48 °C e extensão a 72 °C e, por fim, uma

extensão final de 5 minutos a 72 °C, para permitir a finalização da duplicação de todas as fitas de DNA.

Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Para confirmar o tamanho das bandas foi utilizado um padrão de peso molecular (100 pb, Sigma). Os produtos de PCR que continham entre 30-50 ng/ μ L de DNA foram purificados através do uso de esferas magnéticas ou do kit de purificação em colunas Illustra GFX (GE Healthcare). Em seguida, os produtos de PCR purificados foram diretamente sequenciados, utilizando os mesmos iniciadores descritos anteriormente, através do método dideoxi (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), em sequenciadores automáticos (ABI 3130/3500) no Laboratório de Biodiversidade Molecular (Depto. de Genética – UFRJ).

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados nas ampliações e nos sequenciamentos da região controle do DNA mitocondrial de *P. aff. argus*.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Marcador	Referências*
CrIF	GCA AAG AAT ATA GCA AGA ATC AA	RC	1
CrIR	AAC CTT TTT ATC AGG CAT C	RC	1
LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	COI	2
HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	COI	2
COIarg1	CAG TTA GAA GTA TCG TAA TGG C	COI	3
COIarg2	AAA GAG GTG TTC AGG TTC CG	COI	3

* 1) DINIZ e colaboradores (2005); 2) FOLMER e colaboradores (1994); 3) Este trabalho.

Além das sequências geradas neste trabalho, foram incluídas sequências de 326 indivíduos publicadas para ambos marcadores, provenientes de quatro regiões do Caribe, sendo elas: Flórida (29), seis localidades nas Ilhas Bahamas (243), sul da Ilha de Turks e Caicos (24) e Porto Rico (30) (NARO-MACIEL et al., 2011b). Estas sequências foram disponibilizadas na base de dados GenBank sob os números JF921208 - JF921533 (RC) e JF921534 - JF921859 (COI).

3.3.2 Análise dos dados

Os eletroferogramas obtidos foram editados com o programa SEQMAN II 4.0 (DNASTAR Inc.). Após a edição, as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) presente no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) e os alinhamentos obtidos foram inspecionados visualmente e editados, quando necessário.

A região controle mitocondrial de *P. cf. argus* do Brasil apresentou uma variação na repetição do nucleotídeo “C” a partir da posição 588 do alinhamento, seguida de repetições de “CT” e “T” (Figura 4). Esse polimorfismo de tamanho de fragmento causa um problema de alinhamento e atrapalha a análise correta deste fragmento. Assim, optou-se por retirar esta região das sequências e, conseqüentemente, das análises.

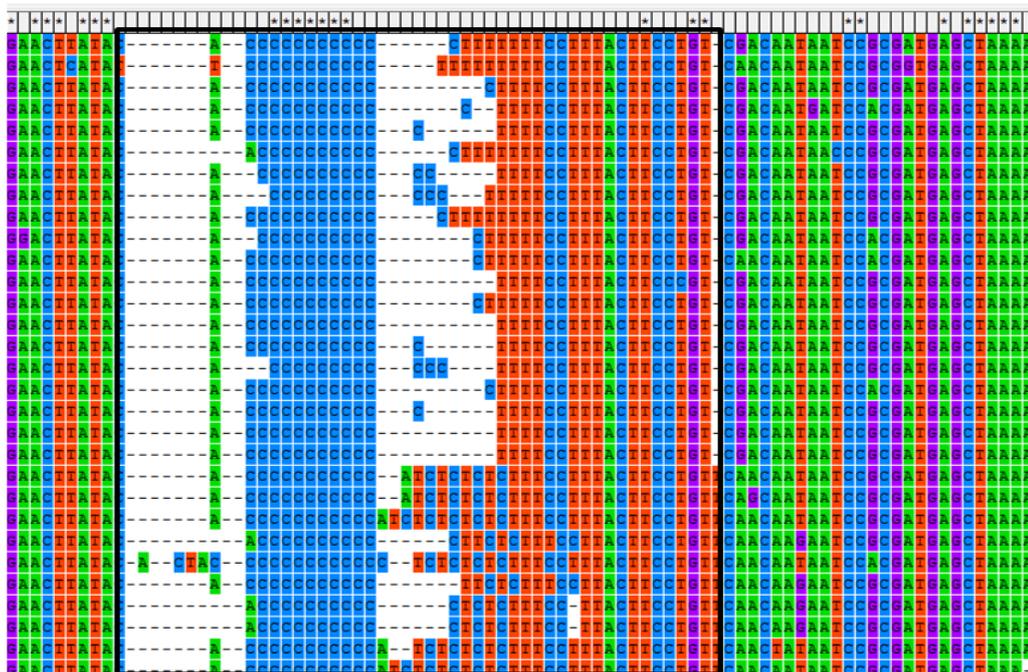


Figura 4 – Imagem do alinhamento parcial de sequências da região controle mitocondrial de indivíduos de *Panulirus cf. argus* do Brasil destacando a região com variação no número de repetições de nucleotídeos.

Os alinhamentos das sequências da região controle mitocondrial tanto dos indivíduos do Caribe como dos indivíduos do Brasil apresentaram

inserções/deleções (indels). Dado que esta é uma região não codificante do DNA mitocondrial, no alinhamento dos indivíduos do Brasil, os indels foram substituídos por nucleotídeos de modo a criar uma substituição do tipo transição no sítio e este ser incluído nas análises quando essas contarem com uma abordagem de deleção global. As transições foram escolhidas por serem mais frequentes que as transversões e por terem um peso menor em algumas análises (NEI; KUMAR, 2000).

Para verificar se os indivíduos coletados formam um único grupo filogenético ou se pertencem às espécies diferentes previamente propostas (*P. cf. argus* do Caribe e *P. cf. argus* do Brasil (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012)), foram realizadas uma análise de distância com o método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) e uma análise filogenética de Máxima Verossimilhança com as sequências do gene da enzima COI. O modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado foi obtido com o programa FINDMODEL (FINDMODEL, 2012), uma implementação na internet do programa MODELTEST (POSADA; CRANDALL, 1998). Uma sequência da espécie *P. echinatus* foi usada como grupo externo.

A região controle mostrou variabilidade em excesso e, para verificar a possibilidade de ocorrência de múltiplas substituições (homoplasias) em um mesmo sítio devidas à saturação mutacional, foi realizado um gráfico de saturação (*saturation plot*) para cada alinhamento. Esse gráfico foi construído com o número relativo de cada tipo de substituição (transições e transversões) contra a distância genética estimada por máxima verossimilhança corrigida com o modelo evolutivo indicado pelo programa FINDMODEL. O número de transversões e transições par a par foram obtidos com o programa MEGA e as distâncias genéticas foram estimadas pelo programa PAUP 4.0b (SWOFFORD, 2003).

Os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram calculados com o programa DNASP 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O mesmo programa foi utilizado para criar os arquivos de entrada para os programas ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) e NETWORK 4.5 (Fluxus-engineering.com).

Redes de máxima parcimônia reconstruindo o relacionamento filogenético entre os haplótipos foram geradas com o algoritmo MEDIAN-JOINING (BANDELTT; FORSTER; ROHL, 1999) presente no programa NETWORK. Devido à alta variabilidade dos marcadores estudados nas duas espécies e para reduzir a complexidade dos dados, foram escolhidas as opções dos algoritmos “star

contraction” (FORSTER et al., 2001) e “MP” (POLZIN; DANESCHMAND, 2003) quando necessárias. O primeiro algoritmo identifica agrupamentos de nós em formato de estrela, típicos de populações que sofreram expansão demográfica, e reduz estes nós regressando ao nó fundador, ajudando a identificar esses eventos de expansão e, ao mesmo tempo, simplificando redes muito complexas. Já o segundo algoritmo identifica e retira ligações e vetores desnecessários gerados nos cálculos das redes. Para a região controle mitocondrial apenas transversões foram utilizadas na reconstrução das redes de haplótipos.

O cálculo dos índices de fixação F_{ST} par a par (WEIR; COCKERHAM, 1984) e a Análise Molecular de Variância (AMOVA) foram realizados no programa ARLEQUIN e a Análise Espacial Molecular de Variância (SAMOVA) foi feita utilizando o programa SAMOVA 1.0 (DUPANLOUP; SCHNEIDER; EXCOFFIER, 2002).

A AMOVA utiliza as frequências haplotípicas e o número de mutações entre haplótipos para calcular estatísticas Φ , análogas às estatísticas F, estimando assim a significância dos componentes da variância molecular associados com diferentes níveis hierárquicos definidos *a priori*: dentro das populações (Φ_{ST}), entre populações dentro dos grupos (Φ_{SC}) e entre grupos (Φ_{CT}) através de um procedimento de permutações não paramétrico. Os agrupamentos que maximizam as porcentagens de variância entre grupos, minimizando a variância dentro dos grupos, são interpretados como os que refletem a subdivisão geográfica mais provável (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). Para testar a significância dos índices de fixação, foram feitas 1.000 permutações de haplótipos, indivíduos ou populações entre indivíduos, populações ou grupos de populações. Após cada permutação, os índices foram recalculados para obtenção das distribuições nulas (EXCOFFIER; HECKEL, 2006).

A SAMOVA é semelhante à AMOVA, porém incorpora a informação espacial (coordenadas geográficas). Esta análise testa todas as possibilidades de agrupamentos otimizando a posição geográfica, de acordo com o número de populações definidas *a priori* (DUPANLOUP; SCHNEIDER; EXCOFFIER, 2002). Essa análise é mais indicada para uma abordagem exploratória dos dados, sem agrupamentos definidos *a priori*. Valores de K (K = número de grupos) entre 2 e 10 foram testados e apenas agrupamentos que respeitavam a distribuição geográfica linear foram considerados nas comparações. A partir dos resultados obtidos com a

SAMOVA, foram testados agrupamentos escolhidos *a priori* com a análise molecular de variância (AMOVA).

Para verificar a existência de correlação entre a distância geográfica e a distância genética, utilizou-se o teste de Mantel (MANTEL, 1967) realizado no programa ARLEQUIN. O teste de Mantel é realizado através da comparação dos elementos de duas matrizes. No teste, correlacionaram-se uma matriz de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ e uma matriz de distância geográfica, utilizando 1000 permutações. As distâncias geográficas entre as localidades foram calculadas no aplicativo Google Earth, seguindo o caminho mais curto entre as localidades ao longo da costa.

Os testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_S de Fu (FU, 1997) foram realizados com o programa ARLEQUIN para detectar se houve desvios em relação à neutralidade nas sequências de ambos marcadores. Estes testes foram desenvolvidos para verificar a ocorrência de seleção natural em regiões do DNA, ou seja, avaliar se essas regiões estão em equilíbrio mutação-deriva, porém fatores demográficos como expansão ou redução populacional podem influenciar de mesmo modo a variação e conseqüentemente são também detectados por esses testes, passando a ser usados regularmente para análises de demografia molecular, muito mais do que para sua função original (ARIS-BROSOU; EXCOFFIER, 1996; FU; LI, 1993; TAJIMA, 1996). O teste D de Tajima utiliza informação de frequência de mutações (sítios segregantes), detectando a expansão populacional através do excesso de mutações únicas, substituições presentes em apenas uma sequência, enquanto o teste F_S de Fu utiliza informação da distribuição dos haplótipos (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002).

Sempre que a hipótese de neutralidade foi rejeitada, as hipóteses de seleção e de expansão demográfica e espacial foram testadas através de uma análise da distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) (ROGERS; HARPENDING, 1992) e uma análise *extended bayesian skyline plot* (HELED; DRUMMOND, 2008).

A análise de distribuição de diferenças foi realizada no programa ARLEQUIN. De acordo com este modelo, a distribuição do número de diferenças par-a-par entre sequências de uma população apresentam formas distintas de acordo com seu histórico demográfico. Assim, populações estáveis apresentam distribuição geométrica e populações que sofreram uma súbita redução do tamanho populacional (gargalo populacional) tem um comportamento multimodal (várias ondas), enquanto a distribuição das diferenças tende a ser unimodal (uma única

onda) em populações que sofreram expansão populacional recente que tenha eliminado os haplótipos raros e tenha deixado apenas um haplótipo comum, ou expansão da distribuição geográfica com alta taxa de migração atual entre populações próximas (EXCOFFIER, 2004; ROGERS; HARPENDING, 1992). Caso a hipótese nula de expansão populacional seja rejeitada, é provável que a significância nos testes de neutralidade seja devida ao efeito da seleção natural. Caso contrário, não é possível rejeitar a hipótese nula de que a população tenha sofrido uma expansão populacional.

A estimativa do tempo decorrido desde o evento de expansão populacional, assim como os tamanhos populacionais (de fêmeas, por se tratar de DNA mitocondrial) antes e após esse evento, foram estimados a partir dos valores de τ , θ_0 e θ_1 obtidos na análise da distribuição das diferenças (ROGERS; HARPENDING, 1992). Para estimativa do tempo decorrido desde a expansão foi utilizada a fórmula $t = \tau/2u$, onde t é o tempo decorrido desde o evento de expansão, tau (τ) é um parâmetro que estima a unidade de tempo mutacional, e u é a taxa global de evolução do haplótipo. Para estimativa de u multiplica-se a taxa de mutação por sítio por ano (μ) pelo número de nucleotídeos do haplótipo. A taxa de mutação para COI foi calculada como 3 vezes a taxa de substituição (0,9-1,1% de divergência/Milhões de anos estimada para decapodos), 2,7-3,3% de divergência/Milhões de anos, seguindo o exemplo de NARO-MACIEL e colaboradores (2011) e PALERO e colaboradores (2008). Como a região controle mitocondrial é mais variável que o gene da Citocromo Oxidase I, para estimar sua taxa de mutação foi seguido o protocolo de BALDWIN e colaboradores (1998) como exemplificado em MCMILLEN-JACKSON e BERT (2003), comparando as sequências de RC e COI dos mesmos indivíduos. Foi obtida uma razão a partir da média das divergências entre haplótipos de cada marcador, e esta razão foi multiplicada pela taxa de divergência utilizada para o gene COI. Esse cálculo foi feito de maneira independente para cada suposta espécie. Para *P. cf. argus* do Brasil, a taxa de mutação estimada foi de cinco vezes a taxa usada para COI, ou seja, 13,5-16,5% Divergência/milhão de anos, e para *P. aff. argus* a taxa foi de 9,12-11,13% Divergência/milhão de anos. O tempo de geração considerado foi de quatro anos (FONTELES FILHO, 2007). Os cálculos dos tempos de divergência foram feitos utilizando a ferramenta “*Mismatch calculator*” disponível no site www.uni-graz.at/zoowww/mismatchcalc/index.php.

A outra análise de demografia molecular, *extended bayesian skyline plot*, permite que a história demográfica de uma população seja reconstruída sem dependência de um modelo paramétrico prévio da história demográfica. A análise usa o procedimento de amostragem padrão MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) para estimar a distribuição posterior do tamanho efetivo da população ao longo do tempo, dado um modelo de substituição nucleotídeo-específico e uma taxa de substituição (HELED; DRUMMOND, 2008). Para obter resultados confiáveis e um tamanho de amostra efetivo adequado (ESS), a análise foi feita empregando o modelo de relógio molecular estrito e 300.000.000 gerações, e seus valores finais foram conferidos com o programa TRACER 1.2 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007) com um *burn-in* de 10%.

3.4 Microssatélites

3.4.1 Amplificação e genotipagem

Microssatélites são sequências simples de nucleotídeos (1-6 nucleotídeos) repetidas em tandem. São altamente polimórficos e distribuídos ao longo do genoma, em regiões codificantes e não-codificantes. O alto nível de polimorfismo, sua fácil interpretação e o fato de serem codominantes fazem estes marcadores serem altamente utilizados em estudos de genética de populações.

Para a espécie *P. aff. argus* já foram descritos pares de iniciadores para 25 sistemas (*loci*) de microssatélites (DINIZ et al., 2004; DINIZ; MACLEAN; OGAWA; PATERSON; et al., 2005; TRINGALI; SEYOUM; SCHMITT, 2008). Apesar de serem iniciadores a princípio específicos, não está claro quais foram desenhados utilizando indivíduos do Caribe ou do Brasil como molde. Nos testes realizados nesta tese, 24 dos iniciadores foram aplicados com sucesso para as amostras do Brasil, mas apenas 11 funcionaram nas amostras do Caribe (Tabela 3).

Para a genotipagem, foi escolhido um método de “iniciador com cauda” (SCHUELKE, 2000) (Figura 5). Neste método, um dos iniciadores é sintetizado com uma sequência extra pré-definida de 18 pb (M13: TGT AAA ACG ACG GCC AGT),

chamada cauda. Essa sequência não é complementar ao DNA alvo e foi adicionada à região 5' do iniciador *forward*. Após alguns ciclos de amplificação, a sequência da cauda se incorpora ao fragmento alvo (Figura 5). Um terceiro iniciador é utilizado na reação, complementar à sequência da cauda e marcado com um fluoróforo. Após alguns ciclos de amplificação, este iniciador se anela à fita de DNA com a cauda incorporada e, a partir dele, a sequência alvo será sintetizada e ficará marcada com o fluoróforo necessário para sua análise em um sequenciador automático (Figura 5). Para permitir essa incorporação, o iniciador reverso é adicionado em uma quantidade duas vezes maior que o iniciador marcado e quatro vezes maior que o iniciador *forward*. Com isso, o iniciador *forward* é utilizado apenas nos primeiros ciclos da reação. Após esses primeiros ciclos, o iniciador *forward* se esgota, e o iniciador marcado passa a ser utilizado na reação. As maiores vantagens dessa técnica são o baixo custo para marcar as fitas e a possibilidade de alternar o uso de diferentes fluorescências em um mesmo grupo de *loci*.

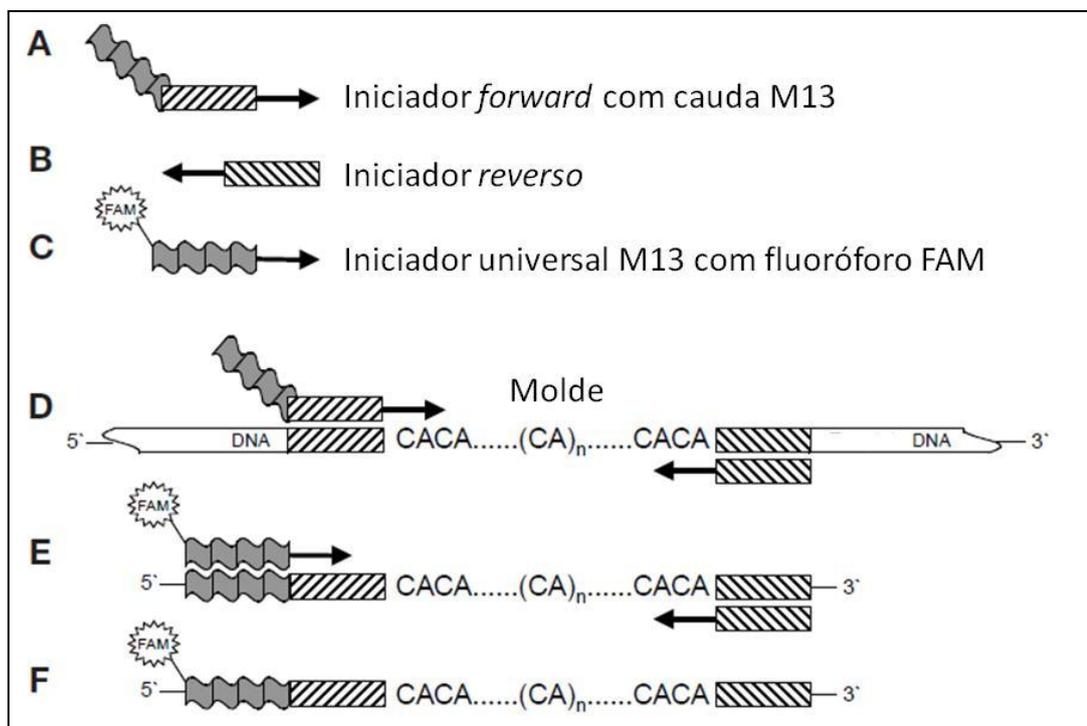


Figura 5 – Método do iniciador com cauda. (A-C) Iniciadores utilizados. (D) Nos primeiros ciclos de PCR, os iniciadores *forward* com cauda M13 são incorporados ao produto de PCR; (E) Estes produtos são, então, alvo do iniciador M13 marcado com fluoróforo; (F) Após cada ciclo com o iniciador marcado, fitas marcadas com fluoróforo são acumuladas no produto final para análise. Figura adaptada de Schuelke (2000).

Cada marcador foi amplificado em reações individuais. As reações de PCR para a genotipagem foram feitas com 1 μL de DNA, 0,1 μM do iniciador *forward*, 0,2 μM do iniciador marcado, 0,4 μM do iniciador reverso, 1 U de enzima Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl_2 e 1,5 μL de tampão de PCR (5X), em 15 μL de volume final de reação. As condições das reações de PCR seguiram um ciclo inicial de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 45 seg. a 93 °C, 40 seg. a temperatura de anelamento (Tabela 4) e 40 seg. a 72 °C, seguindo por 8 ciclos de 45 seg. a 93 °C, 40 seg. a 53 °C e 40 seg. a 72 °C, e por fim, um ciclo final de extensão de 30 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 0,5X, corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Os tamanhos de fragmentos amplificados, bem como a concentração das amostras, foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular 100 pb Gene Ruler Plus (Fermentas).

O desenho experimental previu o agrupamento dos produtos de PCR de cada marcador em quatro painéis, de acordo com o fluoróforo associado e o tamanho do fragmento, a fim de maximizar o número de *loci* analisados em cada eletroforese no sequenciador (Tabela 4). Para isso, 0,5 μL da reação de PCR de cada amostra foram diluídos em 9,25 μL de formamida misturada com 0,25 μL do marcador de tamanho GeneScan 500-LIZ (Applied Biosystems). A reação foi aquecida a 95 °C por 5 min para desnaturação das fitas de DNA e imediatamente colocada no gelo por alguns minutos. Após este processo, as amostras foram aplicadas em um sequenciador ABI3500. Os eletroferogramas resultantes foram analisados no programa GENEMARKER 1.97 (SoftGenetics LLC), no qual foi feita a determinação dos genótipos. Todos os genótipos foram revisados individualmente.

Tabela 3 – Sequências dos iniciadores utilizados nas ampliações de microssatélites, suas respectivas temperaturas de anelamento e a espécie na qual foram utilizados.

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Espécie	Referência
Par1F	GAC GGA CAG AAA TAG ATG GAT AGA	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par1R	ACG AAA TAG GCG AGC AAG AA	Caribe	
Par2F	TGT TTG ATT AGT GAG GTT GTC TG	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par2R	GAC AGA TAG GTA GAT AGA TTG ACA GAT		
Par3F	TTA CCG GGT TGA CAG GAG AC	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par3R	GTC CGT GTG GTC CGA TAT TC	Caribe	
Par4F	TTA GTT TTA CTG GTC AGG ATG G	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par4R	GTC CAG CCA CCC TAG TCA C		
Par6F	GAA GTT TCC CTA ATG TTC GTC CT	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par6R	GCA AAC AGT GGA CCG AGA GA		
Par7F	TGG GTA ACG GTA AGA CTA TTG A	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par7R	CAG ACA GAT GGA CGG AGAGA		
Par8F	CCC TCT CTC TAT CTT TCT CTA TCT C	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par8R	GAG GGT CGA AGC AAA TGA AC		
Par10F	CAA GCA AAG CAC AGA AGC AT	Brasil	DINIZ et al. 2005
Par10R	AAC CAG CGT TCC AGT CAG TT		
argus1F	ATA ACA ATC ACG GGC ACA CA	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus1R	TCG CAT AGC CAG TAG CAA GA		
argus2F	TTA ACC TGT CAC CAC AAT CCA	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus2R	GGA ACG TGG GTC TAT GTG G		
argus3F	GTG GCA CGG ACA ACT GAA C	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus3R	TAC CCG GCT TAC GCT AGG AT		
argus4F	CCT CCT CTT TCT CCC TCC AC	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus4R	TCG ATA TCT TTG CAA GGT GC		
argus5F	CAG ACA GAG ATA CAT TGA GAG CTG	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus5R	TCC CAT GCA CTC CCA TCT		
argus6F	CAC CGG CAT GAC TGA CAT AG	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus6R	AGA TAG ACA GAT AGC TAG ATA GAC AGA		

Tabela 3 – Sequências dos iniciadores utilizados nas ampliações de microssatélites, suas respectivas temperaturas de anelamento e a espécie na qual foram utilizados. (Conclusão)

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Espécie	Referência
argus7F	GAC GAT GTT TCC CCG AGT AG	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus7R	GCA GAC AGA CAG GCA GAC AG	Caribe	
argus9F	CCA ACA GTA ACC AGT AGT TTA GAT TTT	Brasil	DINIZ et al. 2004
argus9R	CTA CCT ATC TGT CTA TCT ATT TAT CC	Caribe	
<i>Par-FWC04F</i>	ATT CCT GGT CAG TTT CCC TTC	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC04R</i>	AGA AGG AAG GAT TTG GAG AGG		
<i>Par-FWC05F</i>	AGA GAG ACG CTG CTG TTC TTC	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC05R</i>	AAA GGG CAT CCT CGG TAG AGT C	Caribe	
<i>Par-FWC07F</i>	GTT CTA AGG CTT CAC GGT GTC	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC07R</i>	CTC ATT ATC GCT GGA TCG	Caribe	
<i>Par-FWC08F</i>	GAA AGA GCT CCT CGT CTA GCA	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC08R</i>	TCA GTG AAG CTG TGC TCC TAA	Caribe	
<i>Par-FWC14aF</i>	CAC CCA CCC ACA GAC CTA TAC	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC14aR</i>	CAG CCC AGA GAG TCT TTT GTT	Caribe	
<i>Par-FWC14bF</i>	AAA TGT CTC TCC TTC GTC TCG	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC14bR</i>	CAG ACA GAC CCC AGA AGT GTA	Caribe	
<i>Par-FWC16_F</i>	GAT TTT GCC TTT GCT TTC CAC	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC16_R</i>	ACT GGA GCC ACA GAT GAA CAG A	Caribe	
<i>Par-FWC18_F</i>	TGG CAA CGT CAT TAA AGT CA	Brasil	TRINGALI et al. 2008
<i>Par-FWC18_R</i>	ACT GCT GTT GCT GTC CTA GC	Caribe	

Tabela 4 – Painéis de genotipagem utilizados com seus marcadores de microssatélites e temperatura de anelamento, fluoróforo de marcação respectivos.

Painel	Marcadores	Fluoróforo	Temperatura de anelamento (°C)
1	Par2	PET	64
	Par6	NED	60
	Par10	6FAM	64
	<i>Par-FWC05</i>	VIC	58
	<i>Par-FWC14a</i>	NED	58
	<i>Par-FWC16</i>	PET	58
	<i>Par-FWC18</i>	6FAM	58
2	Par1	6FAM	58
	Par3	PET	58
	Par4	PET	60
	Par7	NED	58
	Par8	6FAM	60
	<i>Par-FWC04</i>	NED	58
	<i>Par-FWC07</i>	VIC	58
3	argus1	VIC	58
	argus2	PET	58
	argus3	6FAM	58
	argus4	NED	56
	argus5	6FAM	62
4	argus6	VIC	58
	argus7	6FAM	58
	argus9	VIC	58
	<i>Par-FWC08</i>	PET	58
	<i>Par-FWC14b</i>	NED	58

3.4.2 Análises dos dados

O programa CREATE 1.3 (COOMBS; LETCHER; NISLOW, 2008) foi usado para preparar os arquivos de entrada dos programas utilizados nas análises a partir dos arquivos com os indivíduos genotipados de cada espécie. As frequências gênicas e o número de alelos de cada *locus* para cada população foram obtidos com o programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 1995) (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>). A versão online do programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995) (<http://genepop.curtin.edu.au/>) foi utilizada para as análises de desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci*, com 10.000 iterações.

Para verificar a ocorrência de problemas de genotipagem, como a presença de alelos nulos, alelos intermediários ou gagueira (*stutter*), foi utilizado o programa MICRO-CHECKER (CASTRO et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2004; VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O programa se baseia na premissa de que erros de genotipagem levam a um excesso de homozigotos e conseqüentemente a um desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e, dessa forma, calcula a frequência esperada de homozigotos e compara com a frequência observada. O programa também analisa a distribuição de alelos e suas frequências em relação ao seu tamanho, para verificar a presença de *drop-out* de alelos e outros artefatos ligados às análises de microssatélites.

Para saber qual índice de fixação, F_{ST} ou R_{ST} (SLATKIN, 1995), é o mais adequado para medir a diferenciação genética, foi realizado um teste utilizado o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). O índice de fixação R_{ST} assume um modelo de evolução dos alelos “passo a passo” (*stepwise mutation model, SMM*), no qual o tamanho dos alelos reflete a diferenciação entre eles. Por outro lado, o F_{ST} assume um modelo de alelos infinitos (*infinite allele model, IAM*), no qual apenas o estado do alelo deve ser levado em consideração, uma vez que um alelo qualquer ao sofrer uma mutação poderia, em tese, assumir qualquer estado.

O teste implementado no programa SPAGEDI faz a comparação entre os dois índices através de uma abordagem de permutação de alelos entre populações e reamostragem, verificando se o tamanho dos alelos influencia o

resultado final de diferenciação entre populações. Se o resultado da análise indica uma diferença significativa entre os índices calculados antes e depois da permutação, o tamanho dos alelos traz informação sobre a estrutura populacional e o índice R_{ST} deve ser escolhido, porém, se o resultado não é significativo, o índice F_{ST} deve ser utilizado por apresentar menor variância (BALLOUX; GOUDET, 2002; HARDY et al., 2003). O cálculo dos valores do índice de fixação foi realizado com o programa ARLEQUIN.

O índice D_{ST} (JOST, 2008) foi calculado com o programa SMOGD (CRAWFORD, 2010). Este índice é uma forma alternativa de medir a divergência entre populações, utilizando a informação de diversidade alélica e não só a heterozigosidade evitando, assim, o viés provocado por níveis muito altos de heterozigosidade sobre o F_{ST} .

Para visualizar como a diversidade genética dos indivíduos está distribuída, foi realizada uma análise fatorial de correspondência (AFC) no programa GENETIX 4.05 (BELKHIR et al., 2004). Esta análise distribui a variação genética entre os indivíduos em um espaço multidimensional.

A estrutura populacional foi analisada com uma AMOVA, no programa ARLEQUIN. A análise foi feita de maneira semelhante à descrita para o DNA mitocondrial.

A estruturação populacional também foi analisada com uma análise Bayesiana de atribuição como a implementada no programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Esta análise busca atribuir os indivíduos analisados a um número de K populações, definidas para explicar melhor os dados obtidos. Essa análise não necessita da atribuição *a priori* dos indivíduos às populações, sendo o indivíduo a unidade da análise. Foram feitas 10 análises independentes para cada um dos valores de K . Os valores de K analisados variaram entre um e 10. Em cada uma das análises foram utilizadas 10.000 réplicas de *burn-in* seguidas por 1.000.000 de réplicas de cadeias de Markov (MCMC) e foi considerado um modelo de ancestralidade mista (*admixture*) e frequências alélicas correlacionadas. As médias dos valores de verossimilhança entre todas as corridas foram calculadas e o valor de K mais provável foi inferido como aquele que tinha o maior valor médio de $\ln P(D)$ (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Outra abordagem utilizada para identificar o número de agrupamentos (ou populações) mais provável foi o

método ΔK descrito por EVANNO, REGNAUT e GOUDET (2005). A estatística ΔK é definida como uma medida de segunda ordem da taxa de mudança na função da probabilidade dependente de K, e é esperado que o maior valor de ΔK indique o valor de K mais provável. Os valores de $\ln P(D)$ e ΔK foram calculados pelo programa STRUCTURE Harvester (EARL; VONHOLDT, 2011). Os dados obtidos pelas 10 análises independentes no STRUCTURE para o K escolhido foram compiladas pelo programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) utilizando a opção de algoritmo “Greedy” e a estrutura obtida foi visualizada no programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2003). A existência de correlação entre a distância geográfica e genética foi avaliada através de um teste de Mantel, calculado da mesma maneira daquele citado na seção 3.5.2 para sequências de DNA.

4 RESULTADOS

Aqui serão apresentados os resultados da análise filogenética e das análises populacionais, divididos por espécie e marcador. O capítulo começa com o resultado da análise filogenética, seguido dos resultados das análises populacionais por marcador para *Panulirus cf. argus* do Brasil e finalizando com os resultados das análises populacionais por marcador de *P. cf. argus* do Caribe.

4.1 Análise filogenética

As sequências das duas localidades, Brasil e Caribe, formaram dois agrupamentos reciprocamente monofiléticos em ambas as análises (Figura 6). Os dois agrupamentos formados divergiram de 11,8 a 15,5% (K2P).

Devido à alta divergência entre as sequências dos indivíduos provenientes de localidades do Caribe em relação às provenientes do Brasil, as análises populacionais foram realizadas para cada região separadamente, considerando que se trata de duas espécies (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012; TOURINHO, 2009).

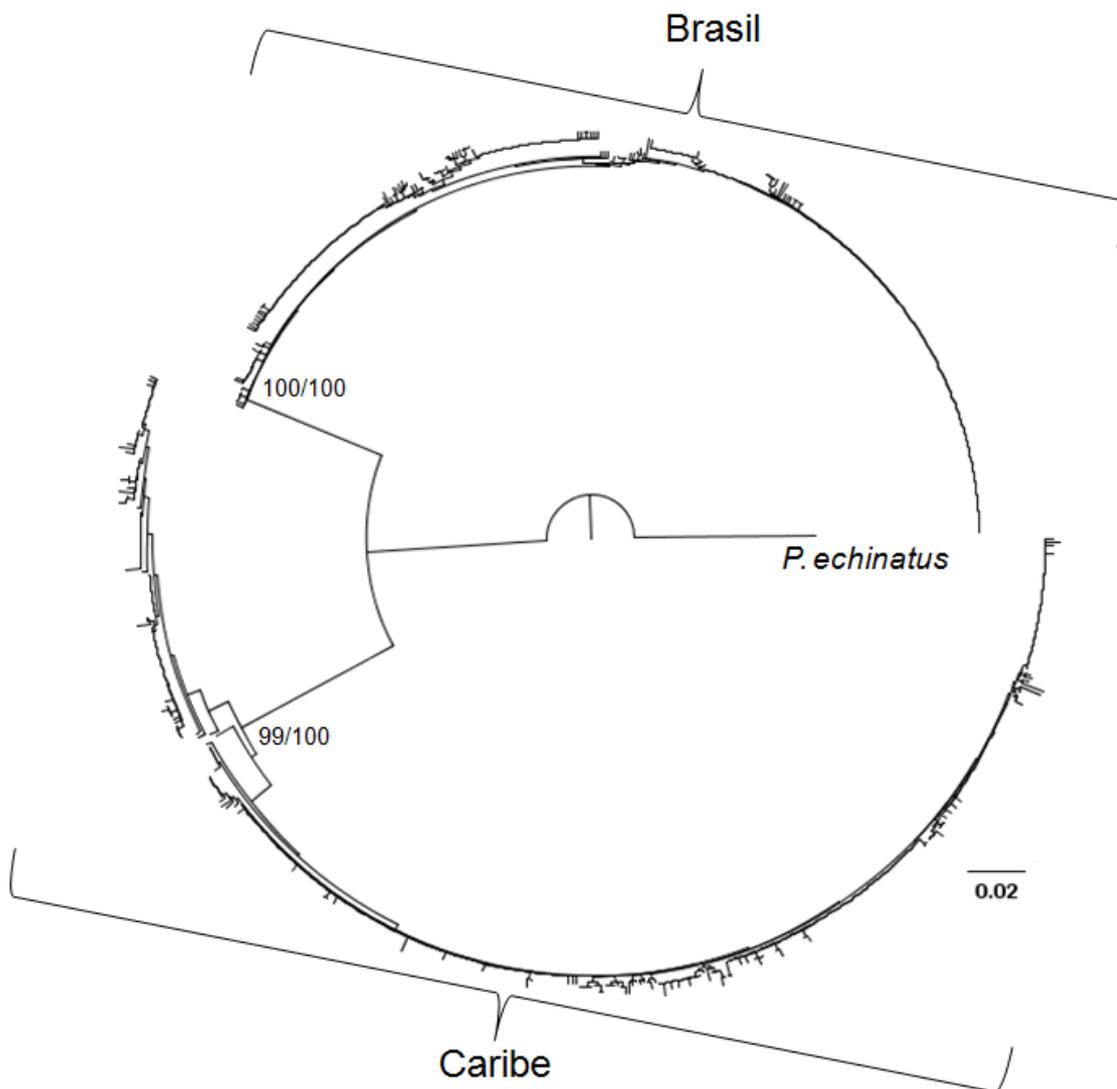


Figura 6 – Árvore de Neighbor-joining de sequências de COI, mostrando a relação entre as sequências dos indivíduos de *Panulirus argus* coletados no Caribe e no Brasil. *P. echinatus* foi utilizado como grupo externo. Nos ramos estão mostrados os valores de bootstrap para a análise de Neighbor-joining e de Máxima Verossimilhança, respectivamente.

4.2 *Panulirus cf. argus do Brasil*

4.2.1 Região controle mitocondrial

A região controle mitocondrial de 343 indivíduos foi sequenciada resultando em um alinhamento final de 689 pares de base (pb) (Tabela 5). Em 20 sítios foram encontrados eventos de inserção/deleção (indels) e estes foram substituídos por eventos de transição como já explicado no capítulo anterior. Este marcador mostrou alta variabilidade, com diversidades haplotípica e nucleotídica de $h = 0,999$ e $\pi = 0,023$ (Tabela 6). O alinhamento final apresentou 185 sítios polimórficos, sendo 115 informativos para parcimônia e 70 sítios com mutações únicas (*singletons*). No total foram encontrados 328 haplótipos, sendo apenas 15 compartilhados. A divergência média total (distância p) foi de 0,025, variando de 0 a 0,055. Devida à alta variabilidade encontrada, foi gerado um novo alinhamento, excluindo sítios onde se identificavam apenas transições. Neste alinhamento foram encontrados 92 haplótipos, com diversidade haplotípica de 0,840 e nucleotídica de 0,009 (Tabela 7). Dos 92 haplótipos encontrados, 22 foram compartilhados.

Tabela 5 – Total de indivíduos amostrados de *Panulirus cf. argus* do Brasil utilizados para cada marcador, por localidade. N = total indivíduos coletados; RC = Região controle mitocondrial, COI = gene da enzima citocromo oxidase I e Microssatélites: total de indivíduos analisados para todos os marcadores.

Localidade	N	RC	COI	Microssatélites
PA	12	12	12	12
MA	29	27	26	23
PI	20	20	20	20
CE	74	62	61	54
RN	86	77	72	64
PE	10	10	6	5
AL	30	28	29	21
BA	7	7	7	7
BA2	42	37	34	25
ES	59	58	58	53
RJ	1	1	1	1
SP	4	4	4	4
Total	374	343	330	289

Tabela 6 – Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
PA	12	10	0,970	0,026
MA	27	27	1,000	0,025
PI	20	20	1,000	0,025
CE	62	58	0,998	0,024
RN	77	77	1,000	0,025
PE	10	10	1,000	0,026
AL	28	28	1,000	0,026
BA	7	7	1,000	0,026
BA2	37	36	0,998	0,025
ES	58	57	0,999	0,025
RJ	1	1	-	-
SP	4	4	1,000	0,032
Total	343	328	0,999	0,023

Tabela 7 – Número de haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de *P. cf. argus* do Brasil considerando apenas sítios onde ocorrem transversões, por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
PA	12	5	0,742	0,010
MA	27	17	0,912	0,010
PI	20	12	0,900	0,010
CE	62	21	0,752	0,008
RN	77	30	0,839	0,009
PE	10	5	0,756	0,009
AL	28	16	0,921	0,010
BA	7	5	0,857	0,010
BA2	37	18	0,850	0,009
ES	58	28	0,886	0,010
RJ	1	1	-	-
SP	4	4	1,000	0,012
Total	343	92	0,840	0,009

A ocorrência de saturação de substituições nucleotídicas nos sítios polimórficos foi testada com um gráfico de saturação (Figura 7). Os dados não apresentaram saturação do número de transições ou transversões, sendo que as primeiras se mostraram mais frequentes que as últimas. As duas categorias de substituições se mostraram correlacionadas positivamente com a distância genética, com 94% das transições e 91% das transversões podendo ser explicadas por uma regressão linear.

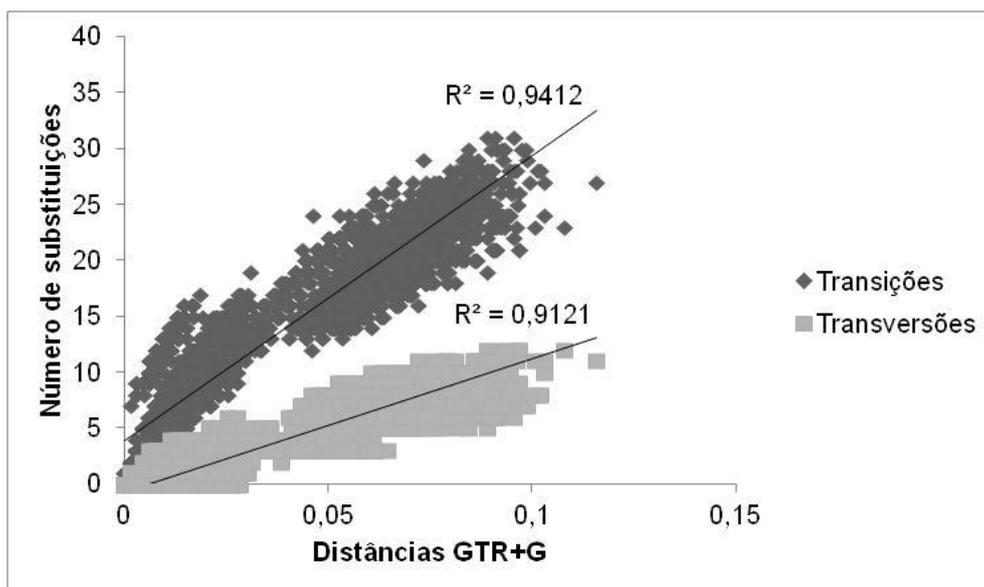


Figura 7 – Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil, de acordo com a distância genética corrigida. Estão apresentados os valores de regressão linear para cada evento de substituição.

Apesar de não haver sinal de saturação nas transições, uma rede de haplótipos foi construída somente com eventos de transversões, para reduzir o número de haplótipos singletons por conta da variabilidade excessiva observada nessa região. Nesta rede, foi possível observar a presença de dois grupos de haplótipos separados por seis eventos mutacionais (Figura 8). Estes dois grupos apresentaram topologias diferenciadas, um com um haplótipo mais frequente e vários outros diferenciados deste por apenas um evento mutacional em uma típica topologia de estrela (A), enquanto o outro grupo apresenta mais de um haplótipo frequente, de onde derivam vários outros haplótipos de menor frequência (B) (Figura 8). Nenhum grupo de haplótipos foi exclusivo de uma região específica, sendo possível encontrar indivíduos representantes dos dois grupos por toda área de estudo em proporções similares (Figura 9). Os dois grupos foram identificados como Linhagem A e Linhagem B, sendo o primeiro mais abundante.

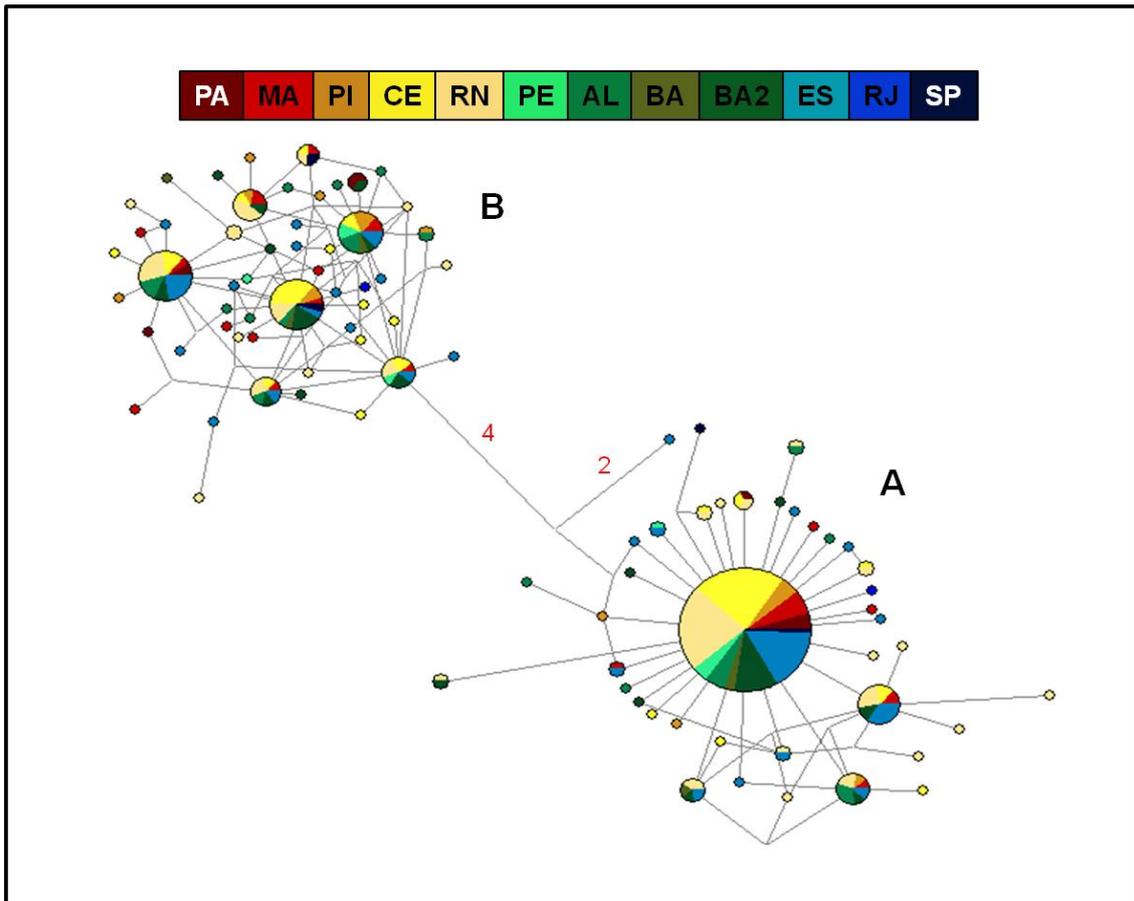


Figura 8 – Rede de haplótipos da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. Os números representam a quantidade de eventos de mutação entre haplótipos (linhas sem números representam uma mutação apenas). O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos mesmos. Os nós sem círculo são haplótipos hipotéticos não amostrados.

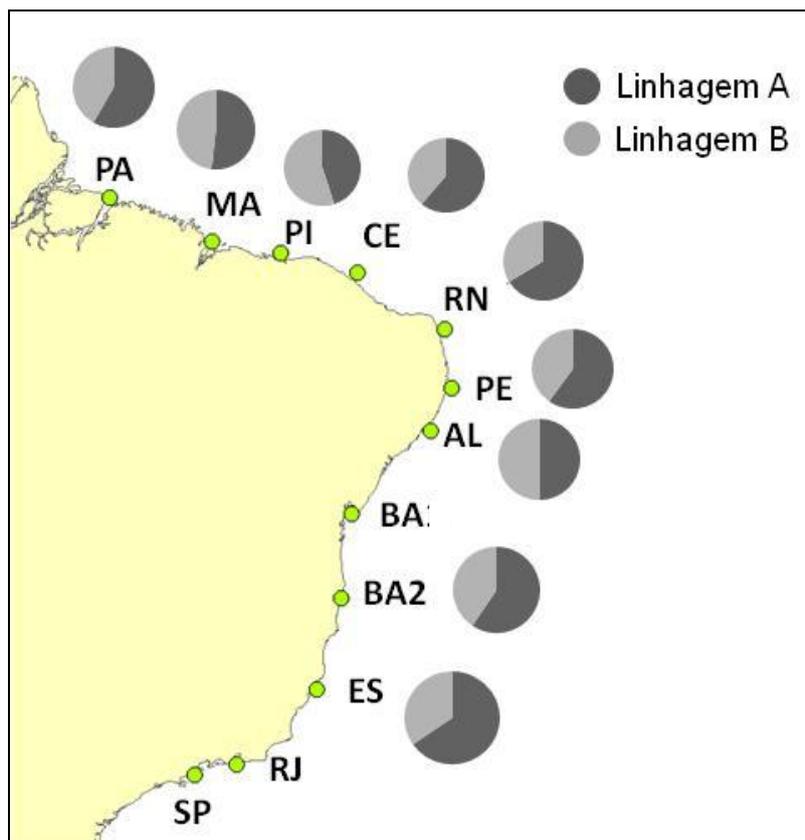


Figura 9 – Proporção de cada linhagem de haplótipos da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil por localidade amostrada. Cada tom de cinza representa uma linhagem diferente.

Para ver o grau de diferenciação entre as localidades de coleta, foram calculados índices de F_{ST} . Esta análise foi feita excluindo as localidades do Rio de Janeiro e São Paulo por apresentarem poucos indivíduos. Nenhum valor foi significativo após correção de Bonferroni (Tabela 8). O F_{ST} é um índice que varia de 0 a 1. Os valores negativos observados na tabela são artefato do tipo de análise feita pelo programa Arlequin e devem ser interpretados como zero.

Não foi observada correlação significativa (teste de Mantel) entre os valores de F_{ST} e distância geográfica, e a hipótese de isolamento por distância não pode ser aceita (Figura 10).

Tabela 8 – Valores de F_{ST} par a par entre as sequências da região controle mitocondrial de populações de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Nenhum valor foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) após correção de Bonferroni.

	PA	MA	PI	CE	RN	PE	AL	BA	BA2
PA									
MA	-0,008								
PI	-0,007	-0,016							
CE	-0,020	-0,003	0,017						
RN	-0,016	0,022	0,045	-0,005					
PE	-0,050	-0,039	-0,024	-0,041	-0,033				
AL	-0,019	-0,019	-0,024	0,000	0,020	-0,041			
BA	0,010	0,002	0,011	0,012	0,024	-0,029	-0,004		
BA2	-0,034	-0,008	0,007	-0,015	-0,006	-0,046	-0,006	0,007	
ES	-0,009	0,014	0,038	-0,002	-0,005	-0,039	0,013	0,018	-0,007

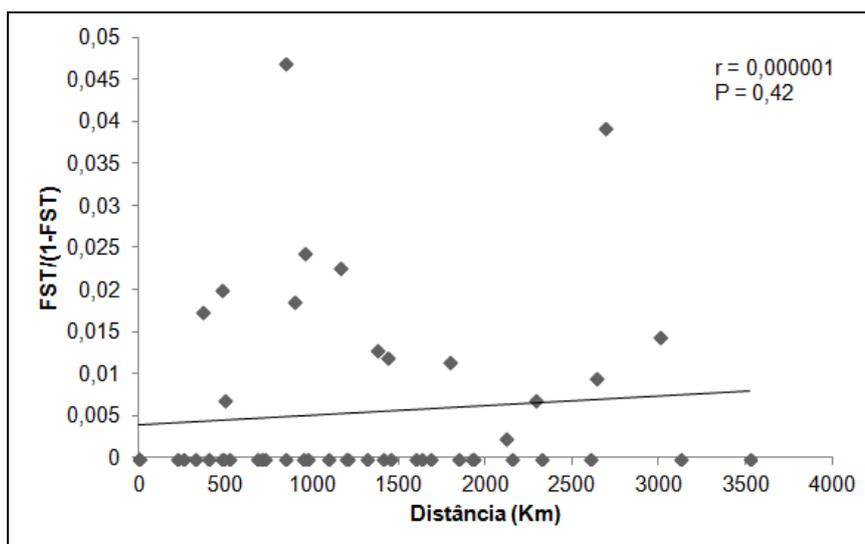


Figura 10 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica a partir de sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Os valores negativos de F_{ST} foram substituídos por zero.

A análise espacial de variância molecular (SAMOVA) foi realizada com a exclusão das localidades do Rio de Janeiro e São Paulo, pelo pequeno número de sequências obtidas naquelas regiões.

Ao considerar todas as sequências, o melhor agrupamento foi o que separou todas as localidades como populações diferentes, unindo apenas Pernambuco com Alcobaça (BA2) ($\Phi_{CT} = 0,039$) (Tabela 9). Porém, além de

possuir um valor baixo de Φ_{CT} , esse agrupamento não apresenta sentido geográfico e o mesmo aconteceu com todos os outros agrupamentos encontrados pela análise, mais uma vez indicando a baixa diferenciação observada ao longo da costa.

A partir dos resultados obtidos com a SAMOVA, foram testados agrupamentos escolhidos *a priori* com a análise molecular de variância (AMOVA) usando todas as sequências (Tabela 10).

Tabela 9 – Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com as sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	PA+PI+AL/MA+CE+RN+PE+BA+BA2+ES	0,021	0,011	-0,010	0,60	0,011	0,58
3	PA+CE+RN+PE+BA2+ES/MA+PI+AL/BA	0,021	0,000	-0,012	0,60	0,010	0,55
4	PA+CE+PE+BA2/MA+PI+AL+BA/RN/ES	0,019	0,001	-0,020	0,55	0,001	0,57
5	PA+PE+BA2/MA+PI+AL+BA/CE/RN/ES	0,021	0,000	-0,022	0,44	-0,001	0,55
6	PA+PE+BA2/MA+BA/PI+AL/CE/RN/ES	0,024	0,000	-0,026	0,78	-0,001	0,57
7	PA+PE+BA2/MA/PI+AL/CE/RN/BA/ES	0,028	0,000	-0,030	0,80	-0,001	0,56
8	PA+PE+BA2/MA/PI/CE/RN/AL/BA/ES	0,033	0,011	-0,036	1,00	-0,002	0,54
9	PA/MA/PI/CE/RN/PE+BA2/AL/BA/ES	0,039	0,020	-0,040	0,44	-0,002	0,55

Tabela 10 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com as sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	PA+MA+PI/CE+RN+PE+AL+BA+BA2+ES	0,013	0,07	-0,005	0,71	0,007	0,50
2	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL+BA+BA2+ES	0,003	0,26	-0,003	0,60	0,000	0,52
2	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES	0,000	0,47	0,000	0,48	-0,001	0,49
3	PA+MA+PI/CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES	0,006	0,21	-0,005	0,65	0,001	0,49
3	PA+MA+PI/CE+RN+PE+AL/BA+BA2+ES	0,005	0,23	-0,005	0,65	0,001	0,50
3	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL+BA/BA2+ES	-0,000	0,54	-0,001	0,48	-0,001	0,50
3	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL/BA+BA2+ES	-0,000	0,55	-0,001	0,46	-0,001	0,51

Os baixos valores de Φ_{CT} obtidos indicaram uma ausência de estruturação populacional. Com isso, os testes de neutralidade foram aplicados considerando todas as localidades como uma única população. Quando consideradas todas as sequências, ambos os testes F_S de Fu e D de Tajima foram significativos (Tabela 11). Os mesmos testes foram aplicados para as linhagens A e B separadamente, também resultando significativos (Tabela 11).

Tabela 11 – Testes de neutralidade Tajima D e F_S de Fu para todas as sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil em conjunto e para as linhagens separadamente. Os valores de significância se encontram entre parênteses.

	D de Tajima	F_S de Fu
Total de sequências	-1,422 (p < 0,05)	-23,588 (p < 0,005)
Linhagem A	-2,257 (p < 0,001)	-24,521 (p < 0,001)
Linhagem B	-1,76 (p < 0,012)	-24,320 (p < 0,002)

Devido aos resultados negativos e significativos dos testes de neutralidade, todos os grupos de sequências foram submetidos à análise de distribuição de diferenças para modelos de expansão demográfica e espacial. Para todas as sequências analisadas juntas, não houve desvio significativo da hipótese nula para o modelo de expansão demográfica, mas houve para expansão espacial, e se observa claramente que os dados reais discordam das distribuições esperadas (Figura 11; Tabelas 12 e 13). Quando analisadas as linhagens A e B separadamente, a hipótese nula de expansão não foi rejeitada para nenhum modelo, e visualmente se observa que a correlação das curvas esperadas e os dados obtidos é bastante clara (Figura 11; Tabelas 12 e 13).

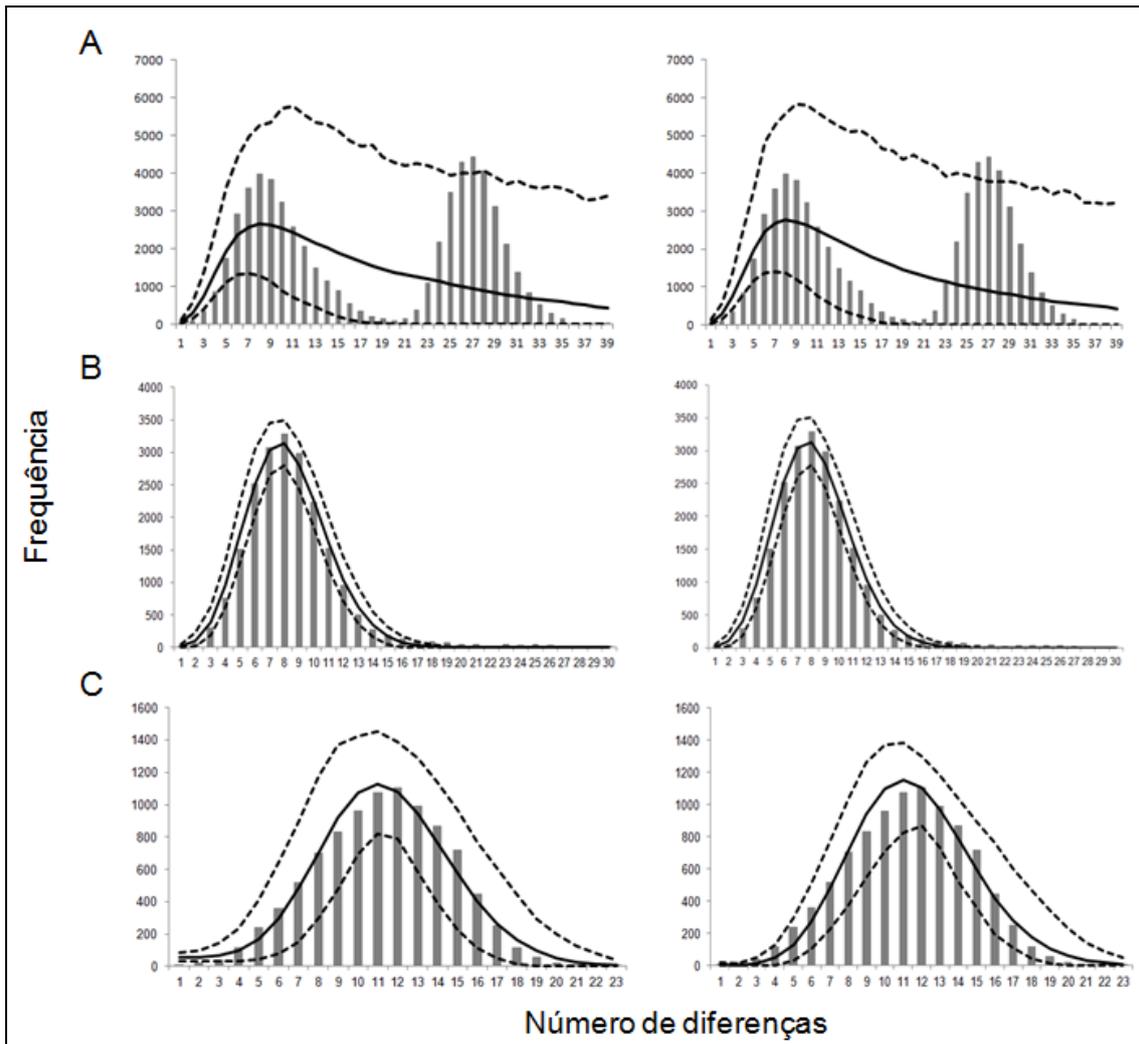


Figura 11 – Análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C). As linhas cheias indicam o comportamento esperado e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança. As barras indicam a distribuição observada.

Tabela 12 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil sob um cenário de expansão demográfica. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	θ (I.C.)	θ_0 (I.C.)	θ_1 (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	4,1 (2,25 - 23,09)	16,35 (0 - 34,16)	99999 (22,55 - 99999)	13,50%	43004 (24190 – 248240)	0,020 (0,148)	0,004 (0,186)
				16,5%	36065 (19792 – 203105)		
Grupo A	7,24 (6,56 - 7,63)	0,01 (0 - 0,41)	99999 (150,09 - 99999)	13,50%	77837 (70526 – 82030)	0,001 (0,174)	0,009 (0,199)
				16,5%	63685 (57703 – 67115)		
Grupo B	10,59 (8,21 - 11,99)	0,20 (0 - 2,00)	168,13 (97,27 - 99999)	13,50%	113853 (88265 – 128904)	0,001 (0,434)	0,004 (0,809)
				16,5%	93152 (72217 – 105467)		

Tabela 13 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil sob um cenário de expansão espacial. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e PSSD = valor de p associado; r = índice "raggedness" e Pr = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	4,10 (2,35 - 28,71)	13,50%	44709 (25265 – 308660)	0,020 (0,037)	0,004 (0,185)
		16,5%	36065 (20671 – 252540)		
Grupo A	7,23 (5,95 - 7,61)	13,50%	77729 (63968 – 81815)	0,001 (0,116)	0,009 (0,198)
		16,5%	63597 (52338 – 66939)		
Grupo B	9,90 (8,59 - 11,40)	13,50%	106434 (92351 – 122561)	0,001 (0,124)	0,004 (0,831)
		16,5%	87083 (75560 – 100277)		

Os gráficos da análise de *extended bayesian skyline plot* mostraram uma expansão populacional gradual para as duas linhagens, ocorrendo em momentos diferentes. Para a linhagem A, a expansão começa há 40 mil anos, e para a linhagem B, há 130 mil anos (Figuras 12A e 12B).

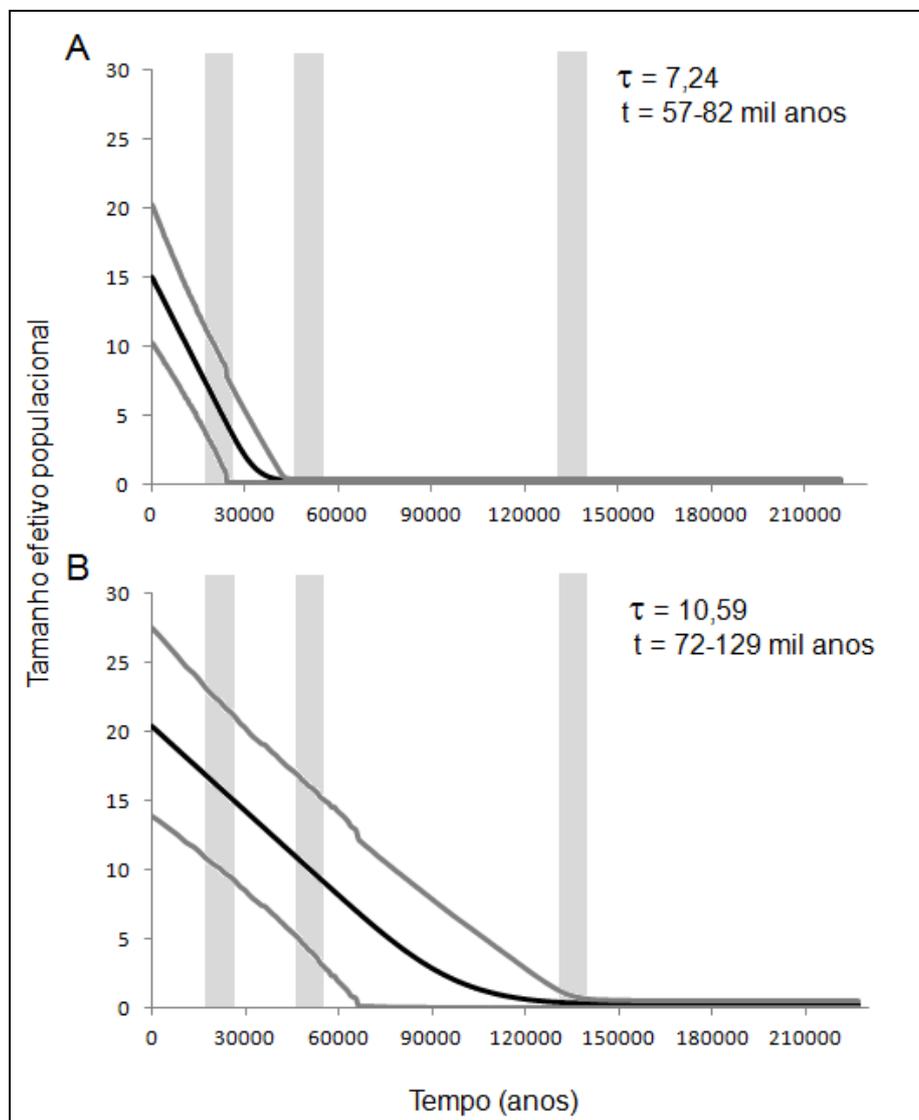


Figura 12 – Gráficos de *Extended Bayesian Skyline Plot* com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Brasil para a linhagem A (A) e linhagem B (B). Estão indicados os valores de τ e o tempo de expansão demográfica obtidos com a análise de distribuição das diferenças.

4.2.2 Citocromo Oxidase I

Foram sequenciados 523 pb do gene da enzima COI de 330 indivíduos (Tabela 5). O alinhamento final não gerou indels e foram encontrados 15 sítios com substituições não sinônimas. Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram $h = 0,893$ e $\pi = 0,005$ respectivamente (Tabela 14). Foram observados 84 sítios polimórficos, sendo 40 informativos para parcimônia e 44 *singletons*. Dos 115 haplótipos encontrados, 20 foram compartilhados. A divergência média total (distância p) entre as sequências foi de 0,005, variando de 0 a 0,019.

Tabela 14 – Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) do gene da enzima Citocromo Oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
PA	12	6	0,818	0,004
MA	26	16	0,945	0,005
PI	20	11	0,895	0,005
CE	61	32	0,932	0,005
RN	72	35	0,876	0,005
PE	6	3	0,600	0,003
AL	29	14	0,865	0,004
BA	7	5	0,857	0,003
BA2	34	16	0,891	0,004
ES	58	29	0,926	0,004
RJ	1	1	-	-
SP	4	4	1,000	0,008
Total	330	115	0,892	0,005

A rede de haplótipos construída evidenciou quatro haplótipos mais frequentes conectados entre si e vários haplótipos de pouca frequência diferenciados destes por poucos eventos mutacionais, em um tipo de topologia em estrela (Figura 13).

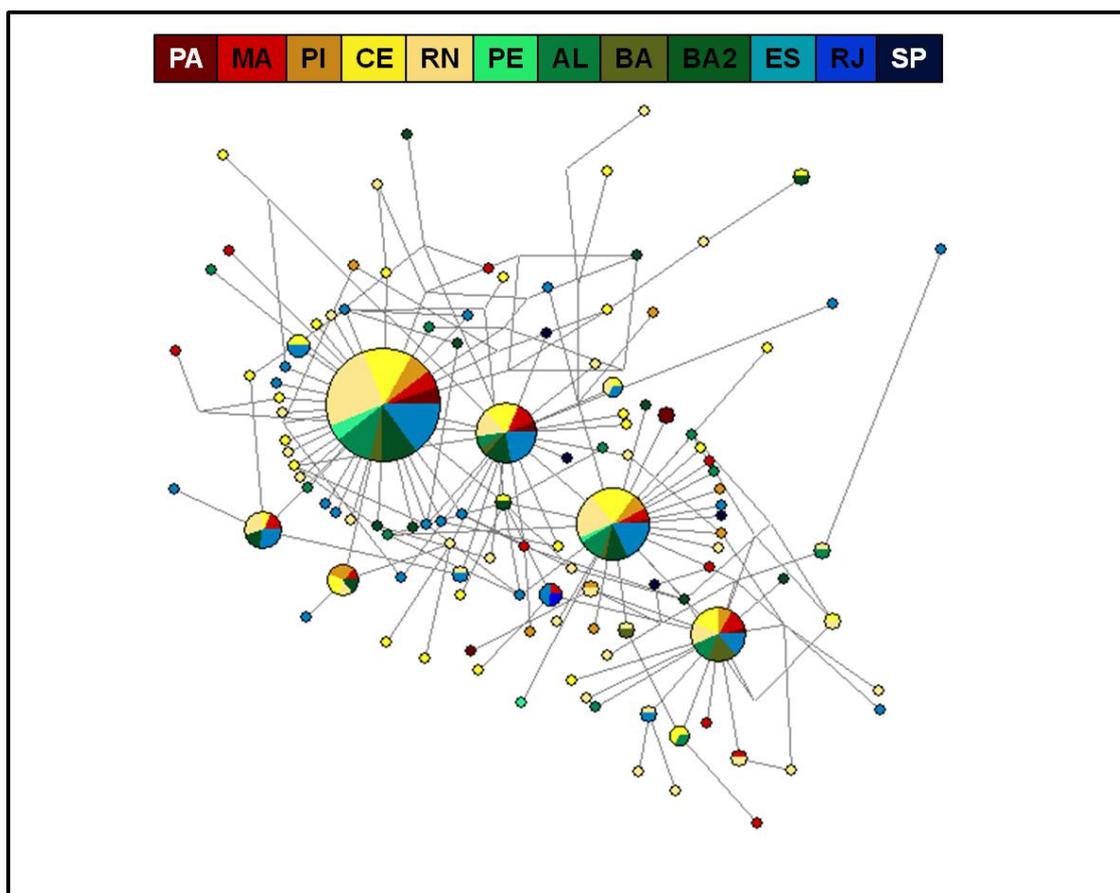


Figura 13 – Rede de haplótipos do gene da enzima Citocromo Oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos mesmos.

Nenhum valor de F_{ST} mostrou-se significativo (Tabela 15). O teste de mantel foi realizado de qualquer forma para efeito de comparação, e não mostrou correlação entre estes valores com a distância geográfica (Figura 14).

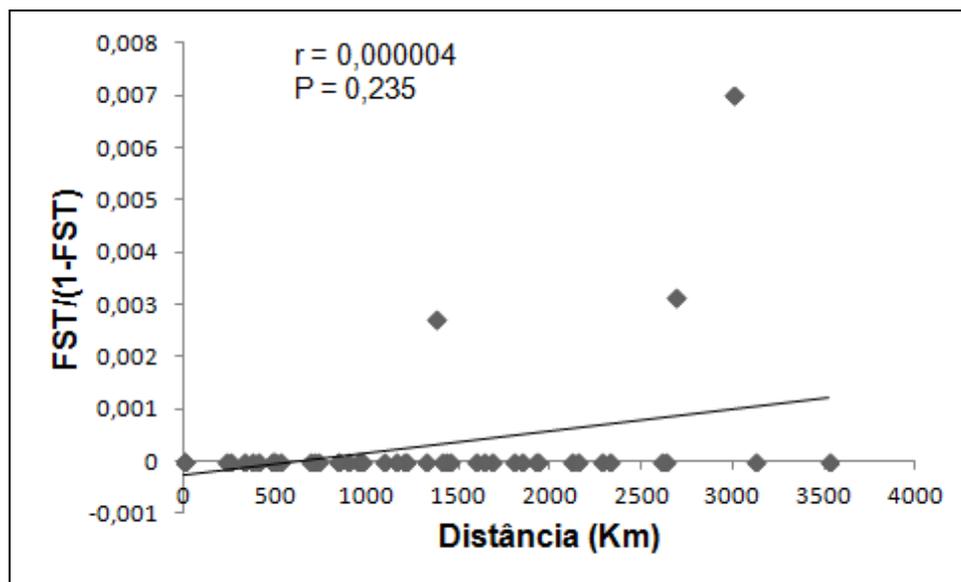


Figura 14 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Os valores negativos foram substituídos por zero.

Para análises de estruturação populacional feitas com o SAMOVA, não foram consideradas as localidades do Rio de Janeiro e São Paulo por apresentarem poucos indivíduos. Os agrupamentos resultantes foram, em sua maioria, não significativos. Apenas os agrupamentos considerando duas e três populações apresentaram valores significativos, porém, em ambos os casos, as localidades amostradas não seguiram uma ordem geográfica lógica (Tabela 16).

Análises de AMOVA foram feitas considerando agrupamentos de duas e três populações para verificar se outros agrupamentos, que tenham sentido geográfico, também apresentam valores significativos de Φ_{CT} . Considerando agrupamentos de duas populações, apenas dois foram significativos, mas com um valor de Φ_{CT} baixo (Tabela 17). O melhor cenário agrupou as localidades de Espírito Santo e Alcobaça (BA2), separando do resto, e a diferença para o outro cenário é que o último também inclui a localidade de Salvador (BA) (Tabela 17). Quando se consideram três populações, seis possibilidades de agrupamentos foram significativas, sendo que o maior valor foi para o cenário que junta Pará e Maranhão em uma população, Espírito Santo em outra, e as outras localidades como a terceira população (Tabela 17).

Como não houve evidência de estruturação por conta dos baixos valores de Φ_{CT} e sua discordância geográfica, todas as localidades foram consideradas como uma única população para a realização dos testes de neutralidade. Os testes D de Tajima e F_S de Fu apresentaram valores negativos e significativos (-2,415 e 26,453 respectivamente; $p < 0,001$). A partir deste resultado foram realizadas as análises de distribuição de diferenças para os modelos de expansão demográfica e espacial. Em ambos os casos não foi rejeitada a hipótese nula de expansão (Figura 15; Tabelas 18 e 19).

Tabela 15 – Valores de F_{ST} par a par entre as populações com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Nenhuma comparação foi estatisticamente significativa após correção de Bonferroni.

	PA	MA	PI	CE	RN	PE	AL	BA	BA2
PA									
MA	-0,02763								
PI	-0,03479	-0,01666							
CE	-0,02581	-0,00722	-0,01531						
RN	-0,02469	-0,00824	-0,01311	-0,00668					
PE	-0,02412	-0,00364	-0,02906	-0,03851	-0,03421				
AL	-0,02729	-0,01186	-0,01949	-0,00814	-0,00914	-0,02384			
BA	-0,08691	-0,0723	-0,07536	-0,071	-0,06557	-0,06458	-0,07655		
BA2	-0,01937	-0,00139	-0,006	-0,01281	-0,01006	-0,0491	-0,00234	-0,06263	
ES	-0,01139	0,00694	0,00311	-0,00354	-0,00354	-0,04655	0,00271	-0,05221	-0,01293

Tabela 16 – Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	P	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	PA+MA+PI+CE+RN+AL+BA+BA2/PE+ES	0,011	0,020	-0,016	1,00	-0,005	0,99
3	PA+MA+PI+CE+AL+BA/RN/+PE+BA2+ES	0,012	0,001	-0,021	1,00	-0,009	0,99

Tabela 17 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	P	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL/BA+BA2+ES	0,006	0,026	-0,015	1,00	-0,009	0,99
	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES	0,008	0,049	-0,016	1,00	-0,008	0,99
3	PA+MA+PI/CE+RN+PE+AL+BA+BA2/ES	0,008	0,023	-0,017	1,00	-0,009	0,99
	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL+BA+BA2/ES	0,007	0,045	-0,017	1,00	-0,010	0,99
	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL+BA/BA2+ES	0,008	0,027	-0,018	1,00	-0,010	1,00
	PA+MA+PI+CE/RN+PE+AL/BA+BA2+ES	0,007	0,039	-0,017	1,00	-0,010	1,00

Tabela 18 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	θ_0 (I.C.)	θ_1 (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	2,58 (1,41 - 3,42)	0,01 (0 - 0,91)	26,02 (8,64 - 99999)	2,7%	182707 (99851 – 242192)	0,0002 (0,93)	0,025 (0,70)
				3,3%	149487 (81697 – 198157)		

Tabela 19 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com o gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	2,49 (1,28 – 3,12)	2,7%	176333 (90645 – 220948)	0,0001 (0,98)	0,025 (0,71)
		3,3%	144273 (74164 – 180775)		

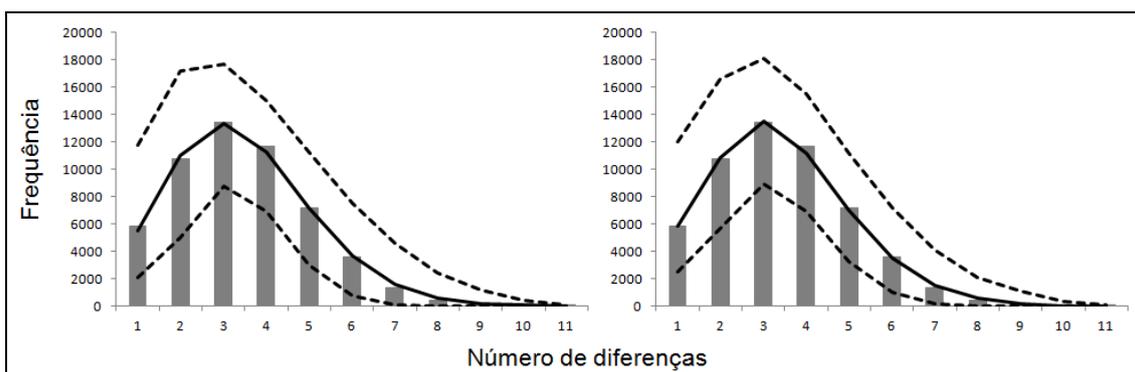


Figura 15 – Análise da distribuição das diferenças feita com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita). As linhas cheias indicam o comportamento esperado e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança. As barras indicam a distribuição observada.

O gráfico da análise de *extended bayesian skyline plot* mostrou uma expansão populacional gradual começando há 50 mil anos, se intensificando há 35 mil anos (Figura 16).

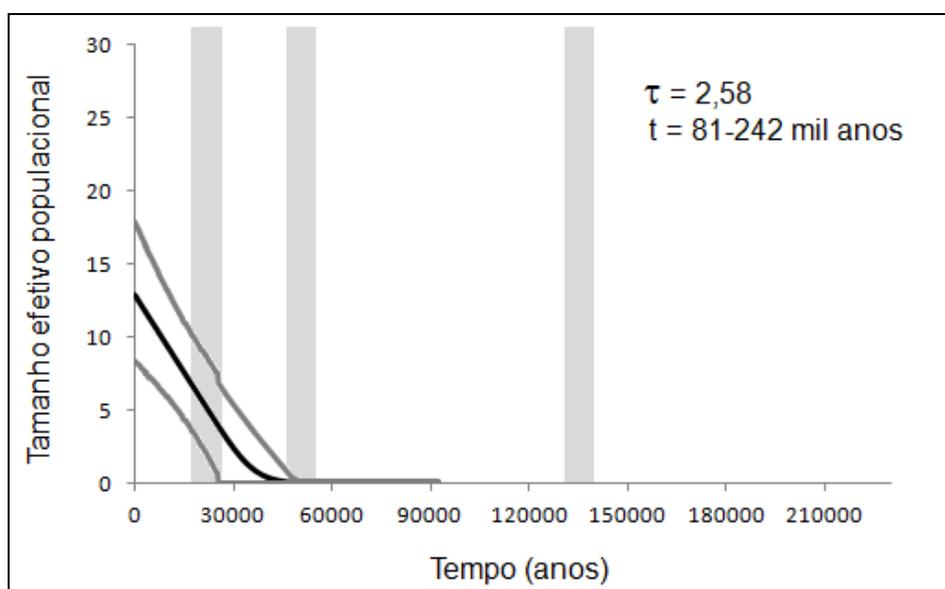


Figura 16 – Gráfico de Extended Bayesian Skyline Plot com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Estão indicados os valores de τ e o tempo de expansão demográfica obtidos com a análise de distribuição das diferenças.

4.2.3 Microsatélites

Foram genotipados 289 indivíduos para 22 *loci* de microsatélites (Tabela 4.1). O número de alelos variou de quatro (*argus1*, *argus6*, *argus9* e *Par-FWC14b*) a 35 (*Par-FWC07*). A análise de possíveis erros de genotipagem indicou excesso de homozigotos em algumas populações (Tabela 20). Em alguns casos, o excesso de homozigotos foi detectado, porém não foi significativo ($p > 0,05$), sendo caracterizados como suspeita. Para seis *loci*, o excesso de homozigotos indicou presença de alelos nulos em duas ou mais localidades amostradas e, por isso, esses *loci* foram excluídos das análises (Tabela 20). As localidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco não foram incluídas nesta análise de erro de genotipagem por apresentarem baixo tamanho amostral ($N = 1$, $N = 4$ e $N = 5$, respectivamente).

O teste par a par de desequilíbrio de ligação não indicou associação significativa após correção de Bonferroni ($p > 0,05$). Houve desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para três *loci* em até três localidades, na maioria dos casos por excesso de heterozigotos (Tabela 21). A heterozigosidade média total observada foi de 0,678.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de F_{ST} e R_{ST} ($p = 0,642$), indicando que o tamanho dos alelos não apresenta informação relevante para a estrutura populacional. Com isso, apenas os valores de F_{ST} foram utilizados, já que apresentam um menor erro agregado (Tabela 22). Os valores do índice Jost D mostraram correlação positiva moderada com aqueles encontrados para o F_{ST} (coeficiente de correlação de Pearson $\rho = 0,510$) (Tabela 22). Em ambos os casos, não houve valores significativos maiores que 0,03, mostrando uma baixa estruturação populacional.

Tabela 21 – Valores de heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) para todos os *loci* de *Panulirus cf. argus* do Brasil. O valor em negrito mostra um desvio significativo em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, após correção de Bonferroni.

	Par3		Par4		argus1		argus4		argus5		argus6		argus7		argus9	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
PA	0,67	0,83	0,75	0,73	0,25	0,24	0,91	0,75	0,91	0,75	0,75	0,65	0,33	0,64	0,17	0,44
MA	0,79	0,88	0,63	0,74	0,17	0,17	0,26	0,60	0,64	0,74	0,87	0,58	0,41	0,54	0,50	0,49
PI	0,79	0,85	0,74	0,71	0,20	0,34	0,76	0,71	1,00	0,74	0,84	0,57	0,35	0,48	0,40	0,41
CE	0,83	0,86	0,71	0,68	0,19	0,17	0,80	0,77	0,62	0,73	0,81	0,57	0,31	0,47	0,47	0,60
RN	0,83	0,87	0,75	0,75	0,17	0,19	0,73	0,71	0,73	0,69	0,83	0,58	0,41	0,51	0,66	0,65
PE	0,80	0,93	0,40	0,60	0,25	0,25	0,25	0,61	0,75	0,79	0,80	0,62	0,00	0,67	0,60	0,71
AL	0,62	0,87	0,75	0,73	0,10	0,09	0,65	0,79	0,43	0,64	0,62	0,49	0,23	0,56	0,67	0,61
BA	0,85	0,79	0,71	0,75	0,29	0,26	0,71	0,71	0,86	0,76	0,86	0,62	0,33	0,53	0,29	0,63
BA2	0,92	0,84	0,78	0,75	0,12	0,12	0,50	0,58	0,64	0,72	0,79	0,54	0,33	0,46	0,80	0,65
ES	0,79	0,86	0,70	0,68	0,08	0,07	0,75	0,75	0,49	0,62	0,81	0,54	0,47	0,54	0,64	0,67
RJ_SP	1,00	0,87	0,80	0,60	-	-	1,00	0,84	0,40	0,38	0,60	0,47	0,00	0,36	0,40	0,71

Tabela 21 – Conclusão

	Par-FWC04		Par-FWC05		Par-FWC07		Par-FWC08		Par-FWC14a		Par-FWC14b		Par-FWC16		Par-FWC18	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
PA	0,64	0,67	0,92	0,94	1,00	0,95	0,91	0,84	0,91	0,87	0,10	0,10	0,67	0,83	0,50	0,56
MA	0,67	0,79	0,95	0,89	0,83	0,97	0,55	0,62	0,83	0,83	0,26	0,31	0,80	0,85	0,64	0,60
PI	0,72	0,71	0,80	0,91	0,95	0,95	0,65	0,75	1,00	0,85	0,06	0,06	0,47	0,76	0,50	0,58
CE	0,78	0,81	0,77	0,88	0,89	0,96	0,59	0,73	0,90	0,85	0,13	0,13	0,73	0,82	0,50	0,67
RN	0,75	0,80	0,80	0,90	0,98	0,96	0,58	0,72	0,92	0,86	0,31	0,27	0,70	0,80	0,61	0,65
PE	0,67	0,60	0,60	0,84	1,00	0,96	0,60	0,71	0,80	0,93	0,20	0,20	0,67	0,80	0,60	0,71
AL	0,82	0,73	0,80	0,90	1,00	0,95	0,71	0,77	0,60	0,87	0,19	0,25	0,60	0,83	0,67	0,56
BA	0,57	0,67	0,83	0,64	1,00	0,96	0,71	0,71	0,71	0,80	0,29	0,26	1,00	0,88	0,57	0,54
BA2	0,86	0,82	0,96	0,89	0,92	0,96	0,64	0,80	0,92	0,93	0,45	0,38	0,71	0,89	0,68	0,68
ES	0,82	0,82	0,92	0,87	0,86	0,96	0,68	0,81	0,91	0,89	0,37	0,31	0,87	0,86	0,60	0,63
RJ_SP	0,80	0,73	1,00	0,98	0,60	0,91	0,60	0,80	0,80	0,84	-	-	1,00	0,96	0,20	0,64

Tabela 22 – Média harmônica dos valores do índice de Jost D (acima da diagonal) e valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) par a par entre as populações para os 16 *loci* de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Os valores com * indicam comparações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) após correção de Bonferroni.

	AL	BA	BA2	CE	ES	MA	PA	PE	PI	RN	RJ
AL		0,000	0,005	0,004	0,000	0,009	0,003	0,001	0,002	0,000	0,000
BA	-0,011		0,001	0,003	0,000	0,003	0,001	0,003	0,008	0,000	0,007
BA2	0,012	0,008		0,004	0,001	0,011	0,006	0,021	0,020	0,001	0,002
CE	-0,007	0,008	0,014*		0,006	0,001	0,006	0,005	0,003	0,002	0,000
ES	-0,020	0,001	0,000	0,005		0,003	0,001	0,005	0,003	0,002	0,000
MA	0,001	-0,003	0,024*	-0,002	-0,005		0,000	0,019	0,001	0,001	0,001
PA	-0,026	0,002	0,001	-0,001	-0,004	-0,012		0,007	0,000	0,006	0,000
PE	0,014	0,010	0,033	-0,008	-0,010	0,005	-0,030		0,003	0,002	0,010
PI	-0,010	0,013	0,019*	-0,002	0,005	-0,003	-0,008	-0,017		0,003	0,006
RN	-0,015	-0,007	0,008	0,000	0,004	-0,008	0,003	-0,015	0,004		0,001
RJ	-0,029	-0,001	0,002	-0,003	-0,006	-0,008	0,005	0,014	0,013	-0,003	

Um teste de Mantel evidenciou uma ausência de correlação entre os valores de F_{ST} e a distância geográfica (Figura 17).

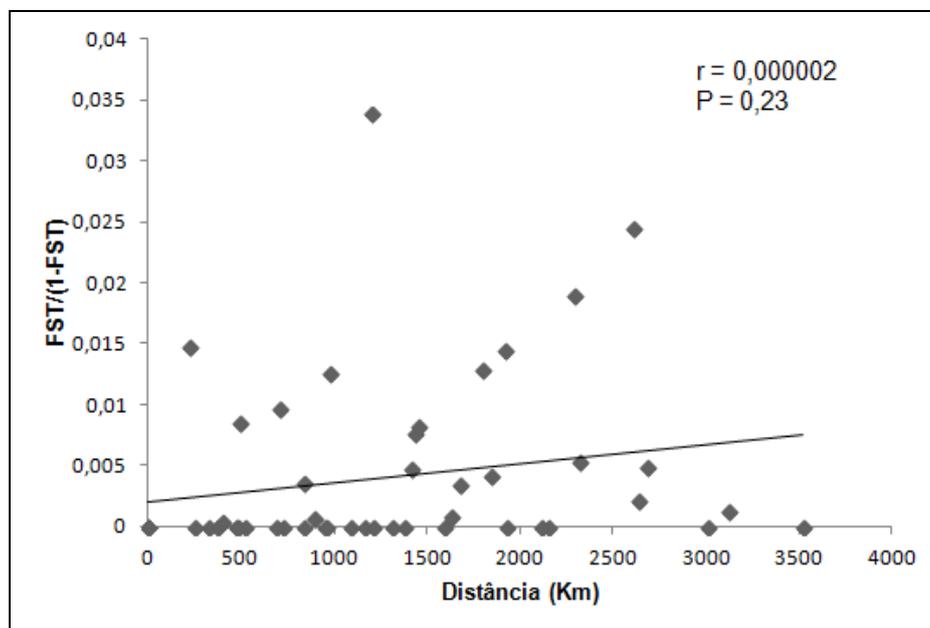


Figura 17 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com *loci* de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil. Os valores negativos foram substituídos por zero.

O programa que realiza a análise espacial de variância molecular (SAMOVA) possui uma limitação que impõe um valor máximo de dados faltantes por marcador de 5% do total. Com isso, apenas 10 dos 16 *loci* puderam ser utilizados (foram excluídos os *loci* *Par-FWC16*, *Par-FWC04*, *argus4*, *argus7*, *argus9* e *Par-FWC14b*). Esta análise indicou alguns agrupamentos com valores significativos de Φ_{CT} , porém não nenhum respeita um sentido geográfico (Tabela 23).

Para testar hipóteses de estruturação com sentido geográfico e utilizando todos os *loci*, foram realizadas análises de AMOVA. Neste caso, vários agrupamentos foram testados, com o número de grupamentos, K , variando de 2 a 3. Vários agrupamentos apresentaram valores significativos, porém nenhum valor de ϕ_{CT} foi superior a 0,01, indicando uma estruturação muito leve (Tabela 24). O agrupamento que maximizou a variação entre os grupos foi separando as localidades em três populações: 1) Pará; 2) Maranhão até Salvador (BA); e 3) Alcobaça (BA2) até São Paulo.

A análise fatorial de correspondência mostrou que as populações de Pernambuco e Alcobaça (BA2) são mais diferenciadas das demais, porém, no caso da população de Pernambuco, pode ser um reflexo da baixa amostragem. Não houve correspondência entre as linhagens mitocondriais A e B e os dados de microssatélites dos indivíduos (Figura 18).

Tabela 23 – Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com a informação de *loci* de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
3	PA/BA2/MA+PI+CE+RN+AL+BA+PE+ES	0,017	0,021	-0,006	0,31	0,012	0,26
4	PA+CE/ES/BA2/MA+PI+AL+BA+RN+PE	0,014	0,000	-0,012	0,81	0,002	0,27
5	PA+CE/RN/BA2/PE+ES/AL+BA+MA+PI	0,017	0,000	-0,017	0,17	0,000	0,27
6	PA+CE/RN/BA2/PE+ES/AL/BA+MA+PI	0,020	0,000	-0,021	0,63	-0,000	0,24
7	PA/CE/RN/BA2/PE+ES/AL/BA+MA+PI	0,025	0,001	-0,026	0,10	-0,000	0,27
8	PA/CE/RN/BA2/PE+ES/AL/BA+MA/PI	0,033	0,005	-0,035	0,72	-0,001	0,25

Tabela 24 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com *loci* de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL/BA+BA2+ES+RJ_SP	0,006	0,035	-0,012	1,00	-0,006	1,00
	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES+RJ_SP	0,007	0,018	-0,012	1,00	-0,005	1,00
3	PA/MA+PI+CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES+RJ_SP	0,008	0,021	-0,013	1,00	-0,005	1,00
	PA/MA+PI+CE+RN+PE+AL/BA+BA2+ES+RJ_SP	0,007	0,042	-0,012	1,00	-0,006	1,00
	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL/BA/BA2+ES+RJ_SP	0,007	0,022	-0,012	1,00	-0,005	1,00
	PA+MA+PI+CE+RN+PE+AL+BA/BA2+ES/RJ_SP	0,007	0,036	-0,012	1,00	-0,005	1,00

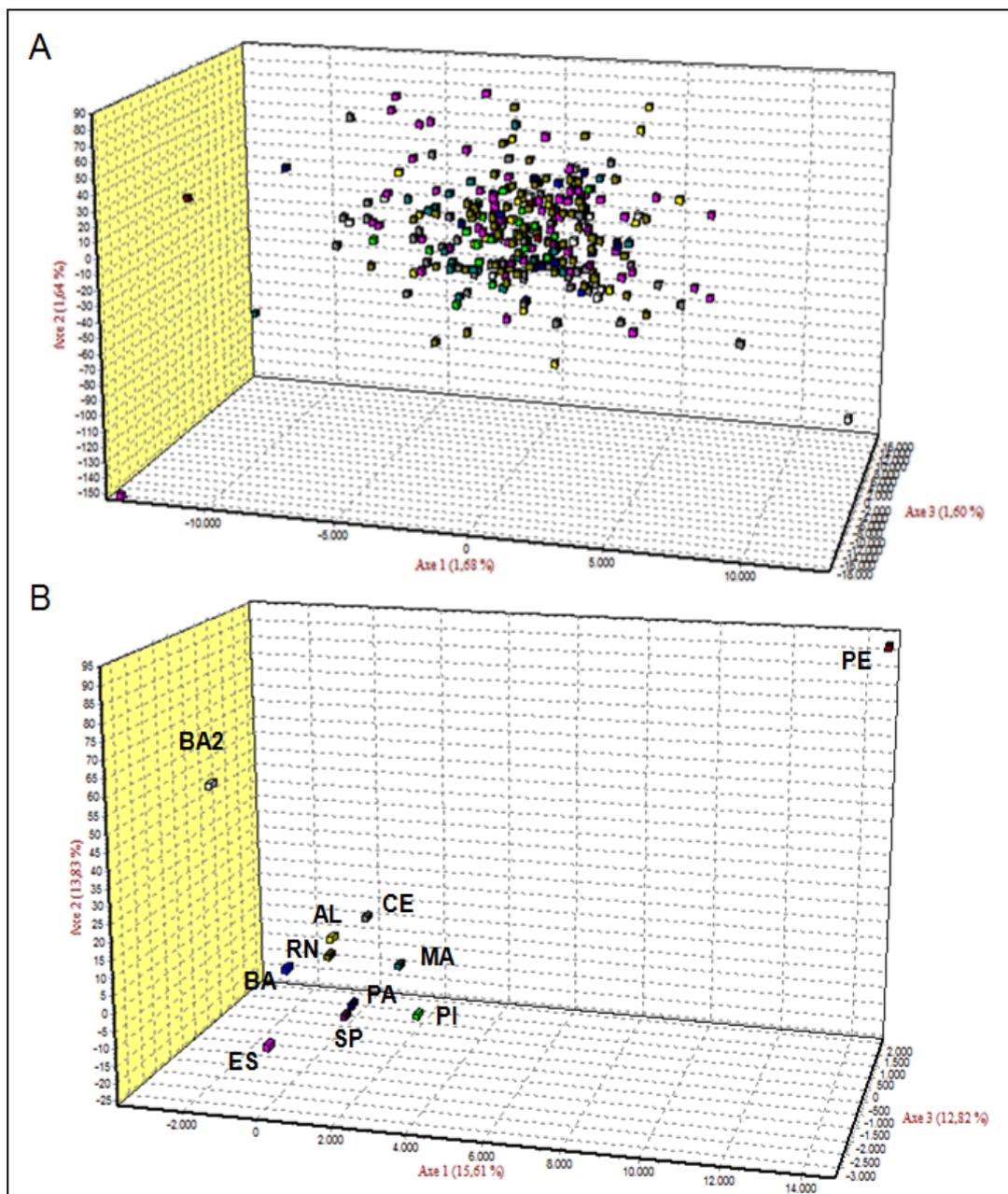


Figura 18 – Análise fatorial de correspondência por indivíduo (A) e por localidade de coleta (B) de acordo com os dados de microsstatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

A estruturação genética também foi avaliada com uma análise Bayesiana de atribuição. Esta análise indicou que o número de partições mais provável a partir dos dados seria de uma única população. Isso pode ser verificado com a média dos valores de verossimilhança entre as 10 corridas ($\ln P(D)$) e com o gráfico de barras do coeficiente Q para o cenário de $K = 2$ (Figuras 19 e 20).

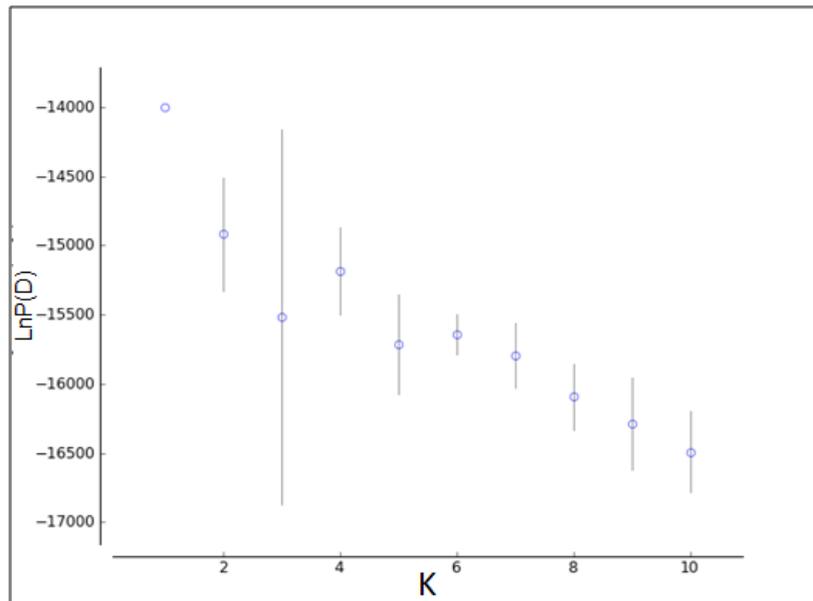


Figura 19 – Valores de $\text{LnP}(D)$ para cada valor de K , obtidos com os dados de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

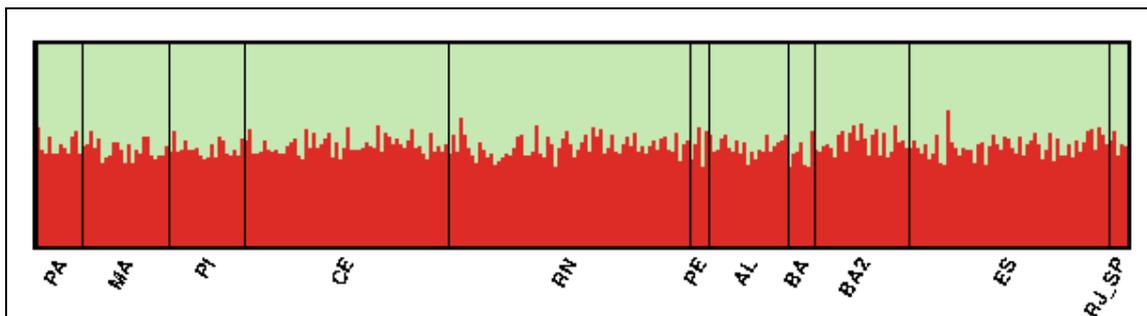


Figura 20 – Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de duas populações ($K=2$) de *Panulirus cf. argus* do Brasil.

4.3 *Panulirus cf. argus* do Caribe

4.3.1 Região controle mitocondrial

Foram sequenciados 743 pb de 61 indivíduos do mar do Caribe, e 419 pb de cinco indivíduos da Venezuela (Tabela 25). Em 25 sítios foram encontrados eventos de inserção/deleção (indels). A variabilidade encontrada foi muito alta, com 63 haplótipos e diversidades haplotípica e nucleotídica de $h = 0,998$ e $\pi = 0,054$ respectivamente. Foram observados 206 sítios polimórficos, com 135 sítios informativos para parcimônia e 71 *singletons*. A divergência média (distância p) foi de 0,054, variando de 0 a 0,12. Ao adicionar as sequências obtidas no GenBank, o alinhamento das 392 sequências foi reduzido a 428 pb, com 56 sítios com indels. Foram encontrados 340 haplótipos e 163 sítios polimórficos, com diversidade haplotípica de 0,999 e diversidade nucleotídica de 0,050 (Tabela 26). A divergência média (distância p) encontrada foi de 0,050 (0 – 0,121). Devido à alta variabilidade encontrada, foi escolhido fazer uma análise com deleção global, ou seja, não considerar os indels nas análises, para não incorporar excesso de informação. Para reduzir ainda mais a informação, algumas análises foram realizadas apenas considerando os sítios com eventos de transversão. O alinhamento sem eventos de transição apresentou 186 haplótipos, com diversidade haplotípica de 0,976 e diversidade nucleotídica de 0,037 (Tabela 27).

Tabela 25 – Total de indivíduos de *Panulirus cf. argus* do Caribe amostrados e utilizados para cada marcador por localidade. N = total indivíduos coletados; RC, COI e Microsatélites: total de indivíduos analisados para todos os marcadores.

Localidade	N	RC	COI	Microsatélites
Norte de Cuba	18	11	18	10
Sul de Cuba	35	21	31	35
San Andrés	2	2	2	2
Cartagena	9	6	8	9
La Guajira	8	8	8	8
Santa Marta	20	11	16	13
Venezuela	10	7	8	-
GenBank				
Florida	29	29	29	-
Bahamas	243	243	243	-
Turks & Caicos	24	24	24	-
Porto Rico	30	30	30	-
Total		392	417	77

Tabela 26 – Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
Norte de Cuba	11	11	1,000	0,049
Sul de Cuba	21	21	1,000	0,056
San Andrés	2	2	-	-
Cartagena	6	6	1,000	0,059
La Guajira	8	8	1,000	0,046
Santa Marta	11	11	1,000	0,052
Venezuela	7	7	1,000	0,061
GenBank				
Florida	29	29	1,000	0,045
Bahamas	243	220	0,999	0,048
Turks & Caicos	24	24	1,000	0,056
Porto Rico	30	30	1,000	0,049
Total	392	340	0,999	0,050

Tabela 27 – Número de haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe considerando apenas sítios onde ocorrem transversões, por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
Norte de Cuba	11	10	0,982	0,034
Sul de Cuba	21	17	0,976	0,042
San Andrés	2	2	-	-
Cartagena	6	5	0,933	0,044
La Guajira	8	8	1,000	0,032
Santa Marta	11	10	0,982	0,042
Venezuela	7	7	1,000	0,045
GenBank				
Florida	29	26	0,990	0,035
Bahamas	243	140	0,983	0,036
Turks & Caicos	24	15	0,924	0,042
Porto Rico	30	28	0,995	0,036
Total	392	186	0,976	0,037

Foi encontrada uma variabilidade maior nos indivíduos de *P. cf. argus* do Caribe em comparação com os indivíduos do Brasil, assim também foi realizado um gráfico de saturação para esta espécie (Figura 21). Diferente do observado com *P. cf. argus* do Brasil, os valores de distância par a par não apresentaram uma distribuição contínua, mas também não se mostraram saturados. Este espaço na distribuição das substituições em relação à distância genética reflete a separação das sequências em dois grupos, mostrando as divergências intra e entre grupos. As duas categorias de substituições se mostraram correlacionadas positivamente com a distância genética, com 97% das transições e 95% das transversões podendo ser explicadas por uma regressão linear.

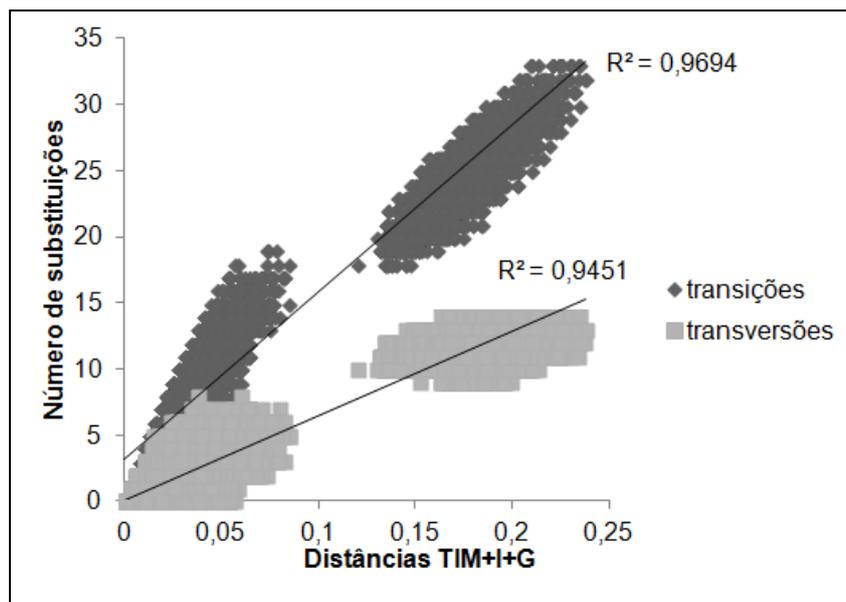


Figura 21 – Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida. Estão apresentados os valores de regressão linear para cada evento de substituição.

Para ter uma análise mais detalhada da possibilidade de saturação, foram feitos gráficos com as sequências de cada grupo separadamente (Figuras 22 e 23).

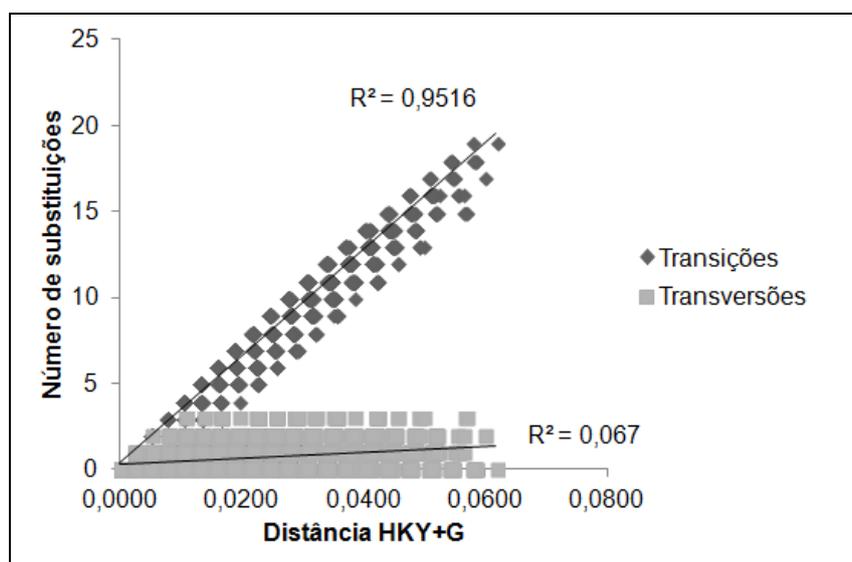


Figura 22 – Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial da linhagem A de *Panulirus cf. argus* do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida. Estão apresentados os valores de regressão linear para cada evento de substituição.

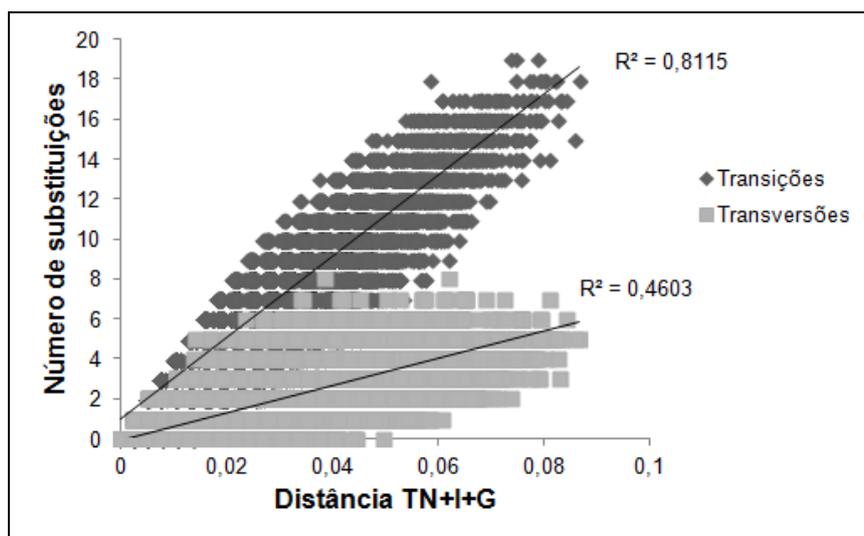


Figura 23 – Número de eventos de transição e transversão na região controle mitocondrial da linhagem B de *Panulirus cf. argus* do Caribe, de acordo com a distância genética corrigida. Estão apresentados os valores de regressão linear para cada evento de substituição.

Uma rede de haplótipos foi construída usando apenas os eventos de transversão e, assim como em *P. cf. argus* do Brasil, a espécie do Caribe também apresentou duas linhagens de haplótipos, neste caso separadas por 15 eventos mutacionais (Figura 24). Ambas apresentaram alguns haplótipos centrais mais abundantes cercados de vários haplótipos únicos, separados entre si por poucos pontos mutacionais. Uma linhagem se mostrou mais abundante que a outra, com 301 sequências e 264 haplótipos ($h = 0,998$; $\pi = 0,023$) em comparação a 91 sequências e 77 haplótipos ($h = 0,994$; $\pi = 0,019$). Apesar da alta diversidade haplotípica, a diversidade nucleotídica foi reduzida pela metade quando as linhagens foram analisadas separadamente. As linhagens foram diferenciadas por A (menos abundante) e B (mais abundante) e ambas foram encontradas em todas as localidades amostradas (Figura 25).

Os cálculos dos valores de F_{ST} foram realizados excluindo a localidade de San Andrés por apresentar apenas dois indivíduos. Nenhum valor foi significativo após correção de Bonferroni (Tabela 28).

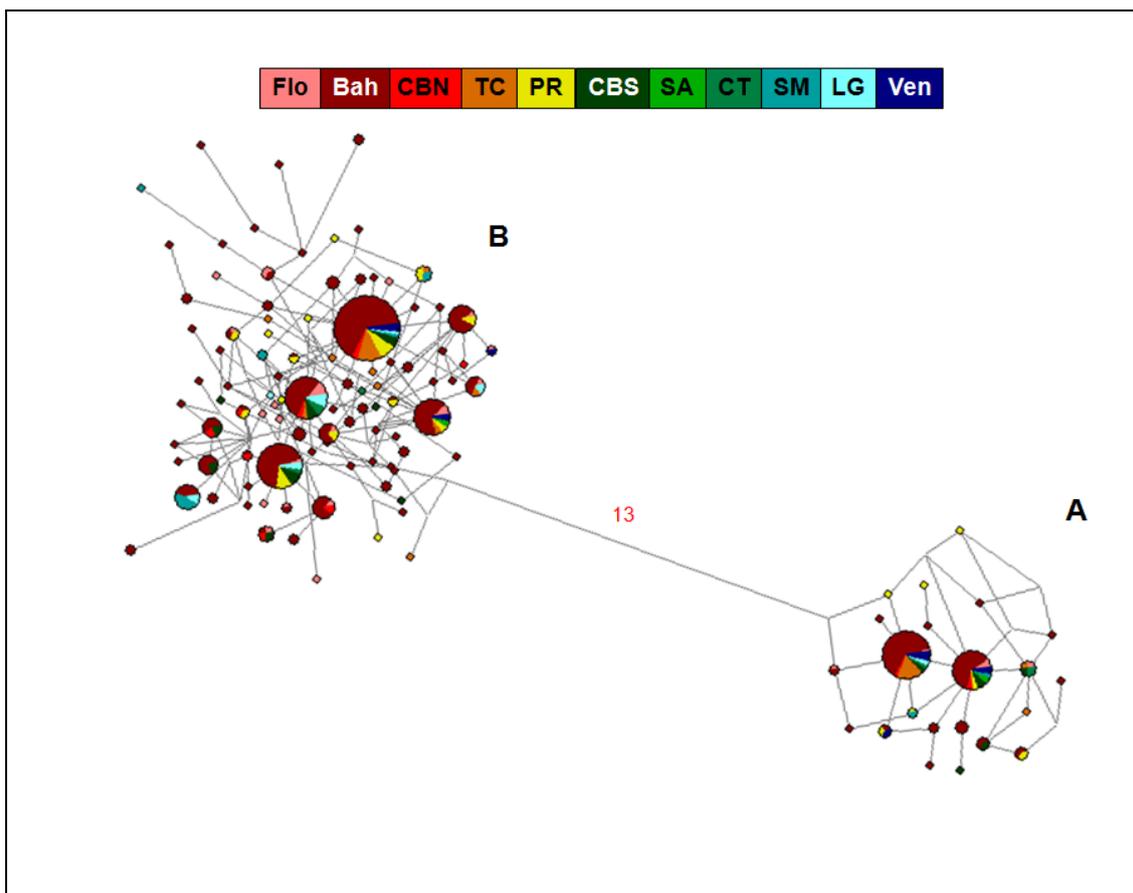


Figura 24 – Rede de haplótipos da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. Os números representam a quantidade de eventos de mutação entre haplótipos (linhas sem números representam uma mutação apenas). O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos mesmos. Os nós sem círculo são haplótipos hipotéticos não amostrados.

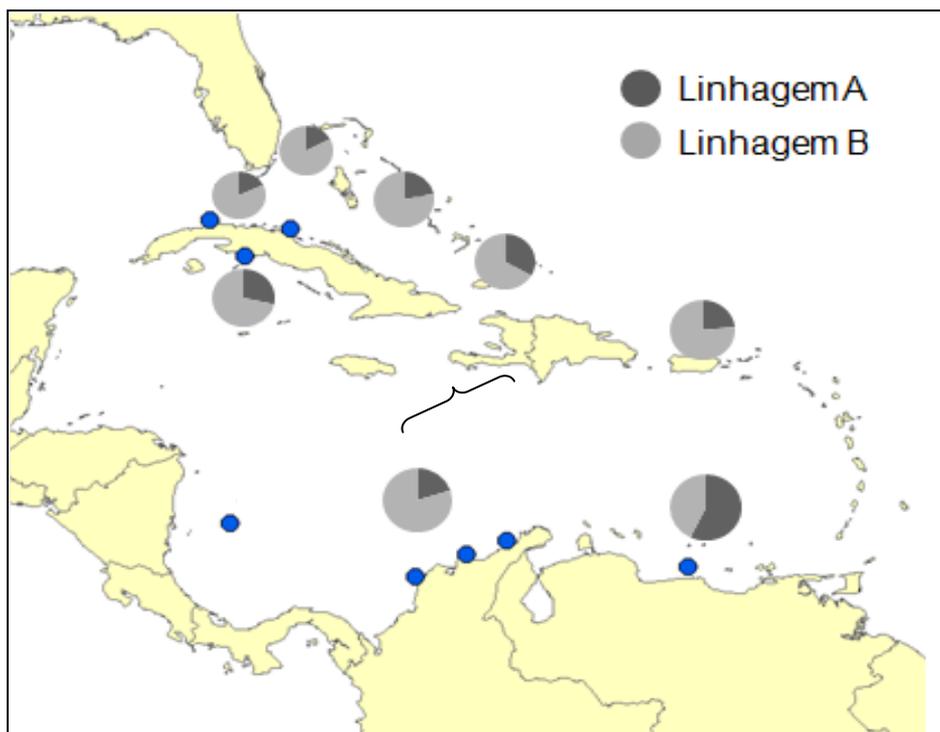


Figura 25 – Proporção de cada linhagem de haplótipos da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe por localidade. Cada tom de cinza representa uma linhagem diferente.

Tabela 28 – Valores de F_{ST} par a par entre as populações com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Nenhum valor foi estatisticamente significativo após correção de Bonferroni.

	Bahamas	Florida	Porto Rico	Turks e Caicos	CBS	CBN	CT	LG	SM
Bahamas									
Florida	-0,01012								
Porto Rico	-0,01367	-0,01802							
Turks e Caicos	0,01951	0,03846	-0,00331						
CBS	0,00071	0,00606	-0,00943	0,01062					
CBN	-0,02455	-0,03136	-0,02772	0,01993	-0,04372				
CT	-0,036	-0,0151	-0,05101	-0,08239	-0,06812	-0,06317			
LG	-0,02665	-0,04343	-0,02598	0,03308	-0,02661	-0,07595	-0,03773		
SM	-0,00079	-0,0051	-0,00332	0,03141	-0,01549	-0,05412	-0,03321	-0,07512	
Ven	0,19436	0,24891	0,16035	0,03504	0,11457	0,17826	-0,01682	0,22977	0,18063

Não foi significativa a correlação do teste de Mantel, não podendo ser rejeitada a hipótese de que não há relação entre distância geográfica e divergência genética (Figura 26).

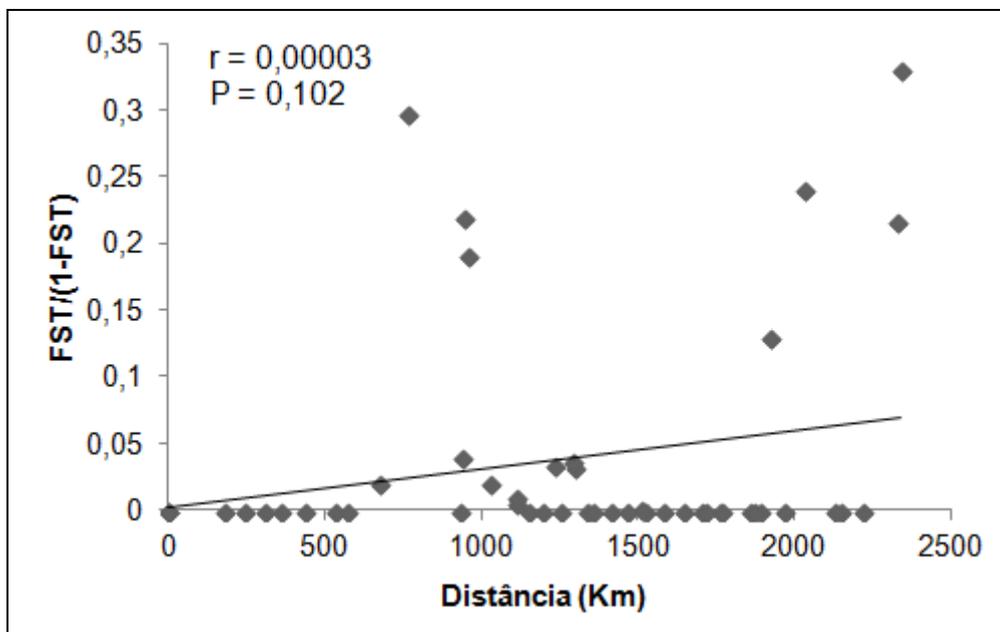


Figura 26 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica de sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Os valores negativos foram substituídos por zero.

As análises populacionais feitas com SAMOVA encontraram agrupamentos significativos, sendo que o maior valor de Φ_{CT} foi encontrado separando todas as localidades em 10 populações diferentes, apenas juntando San Andrés com Cartagena (Tabela 29).

Testes de AMOVA foram realizados para testar hipóteses prévias de estruturação entre as localidades do Caribe e do Atlântico Oeste, porém nenhum resultado se mostrou significativo (Tabela 30).

Tabela 29 – Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
3	Bah+Flo+TC+PR+CBN+CBS+CT+SM+LG/SA/Ven	0,103	0,022	-0,004	0,67	0,099	0,32
4	Bah+Flo+TC+PR+CBN+CBS+SM+LG/SA/CT/Ven	0,052	0,006	-0,003	0,75	0,049	0,28
5	Bah+Flo+PR+CBN+CBS+CT+LG/TC/SM/SA/Ven	0,045	0,001	-0,012	0,66	0,033	0,29
6	Bah+Flo+PR+CBN/CBS/TC+SA+CT/LG/SM/Ven	0,040	0,000	-0,020	0,44	0,020	0,30
7	Bah/Flo/PR/TC/CBN+CBS+SA+CT/SM+LG/Ven	0,053	0,000	-0,051	0,35	0,005	0,30
8	Bah/Flo/PR/CBN/TC/CBS+SA+CT/LG+SM/Ven	0,065	0,002	-0,065	0,24	0,005	0,31
9	Bah/Flo/PR/CBN+LG/TC/CBS/SA+CT/SM/Ven	0,092	0,004	-0,097	0,93	0,004	0,31
10	Bah/Flo/PR/CBN/TC/CBS/SA+CT/LG/SM/Ven	0,176	0,035	-0,208	0,25	0,004	0,31

Tabela 30 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	Bah+Flo+CBN+TC+PR+Ven/CBS+CT+LG+SM	-0,001	0,232	0,007	0,28	0,006	0,25
3	Bah+Flo+CBN+TC+PR/CBS+CT+LG+SM/Ven	0,038	0,003	-0,009	0,75	0,029	0,25
	Bah+Flo+CBN+TC+PR+CBS/CT+LG+SM/Ven	0,051	0,002	-0,007	0,68	0,044	0,25
	Bah+Flo+CBN+TC+PR+Ven/CBS/CT+LG+SM	-0,007	0,394	0,009	0,21	0,003	0,25
4	Bah+Flo+TC+CBN/CBS/CT+SM+LG/Ven+PR	-0,008	0,449	0,012	0,22	0,004	0,25
	Bah+Flo+CBN/CBS/CT+SM+LG/Ven+PR+TC	0,009	0,150	-0,000	0,47	0,009	0,25
	Bah+Flo+CBN+TC+PR/CBS/CT+LG+SM/Ven	0,036	0,012	-0,009	0,71	0,028	0,25
5	Bah+Flo+CBN/TC+PR/CBS/CT+LG+SM/Ven	0,029	0,026	-0,016	0,81	0,014	0,26
	Bah+Flo+CBN/PR/TC+CBS/CT+LG+SM/Ven	0,025	0,056	-0,012	0,73	0,013	0,25
	Bah+Flo+CBN+TC/PR/CBS/CT+LG+SM/Ven	0,020	0,131	-0,006	0,57	0,014	0,25
6	Bah+Flo+CBN/TC+PR/CBS/CT/LG+SM/Ven	0,030	0,057	-0,016	0,84	0,014	0,25

Devido à falta de evidências de estruturação populacional, foram realizados testes de neutralidade considerando todas as localidades como uma única população, assim como para cada linhagem mitocondrial separadamente. Para todas as localidades em conjunto, o teste F_S de Fu foi significativo, porém o teste D de Tajima não, enquanto os testes para as duas linhagens separadamente mostraram valores negativos e significativos (Tabela 31).

Tabela 31 – Testes de neutralidade Tajima D e F_S de Fu para todas as sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe em conjunto e para as linhagens separadamente. Os valores de significância estão apresentados entre parênteses.

	D de Tajima	F_S de Fu
Total de sequências	-0,856 (p = 0,19)	-23,467 (p = 0,017)
Linhagem A	-1,797 (p = 0,013)	-24,718 (p < 0,001)
Linhagem B	-1,867 (p = 0,006)	-24,019 (p = 0,001)

Devido aos resultados negativos e significativos dos testes de neutralidade, todos os grupos de sequências foram submetidos à análise de distribuição de diferenças para modelos de expansão geográfica e demográfica. Em todos os casos não foram rejeitadas as hipóteses nulas de expansão demográfica e espacial (Tabelas 32 e 33). Para o conjunto de todas as sequências se observa claramente um padrão bimodal, que discorda das distribuições esperadas (Figura 27). Quando analisadas as linhagens A e B separadamente, visualmente se observa que a correlação das curvas esperadas e os dados obtidos é bastante próxima (Figura 27).

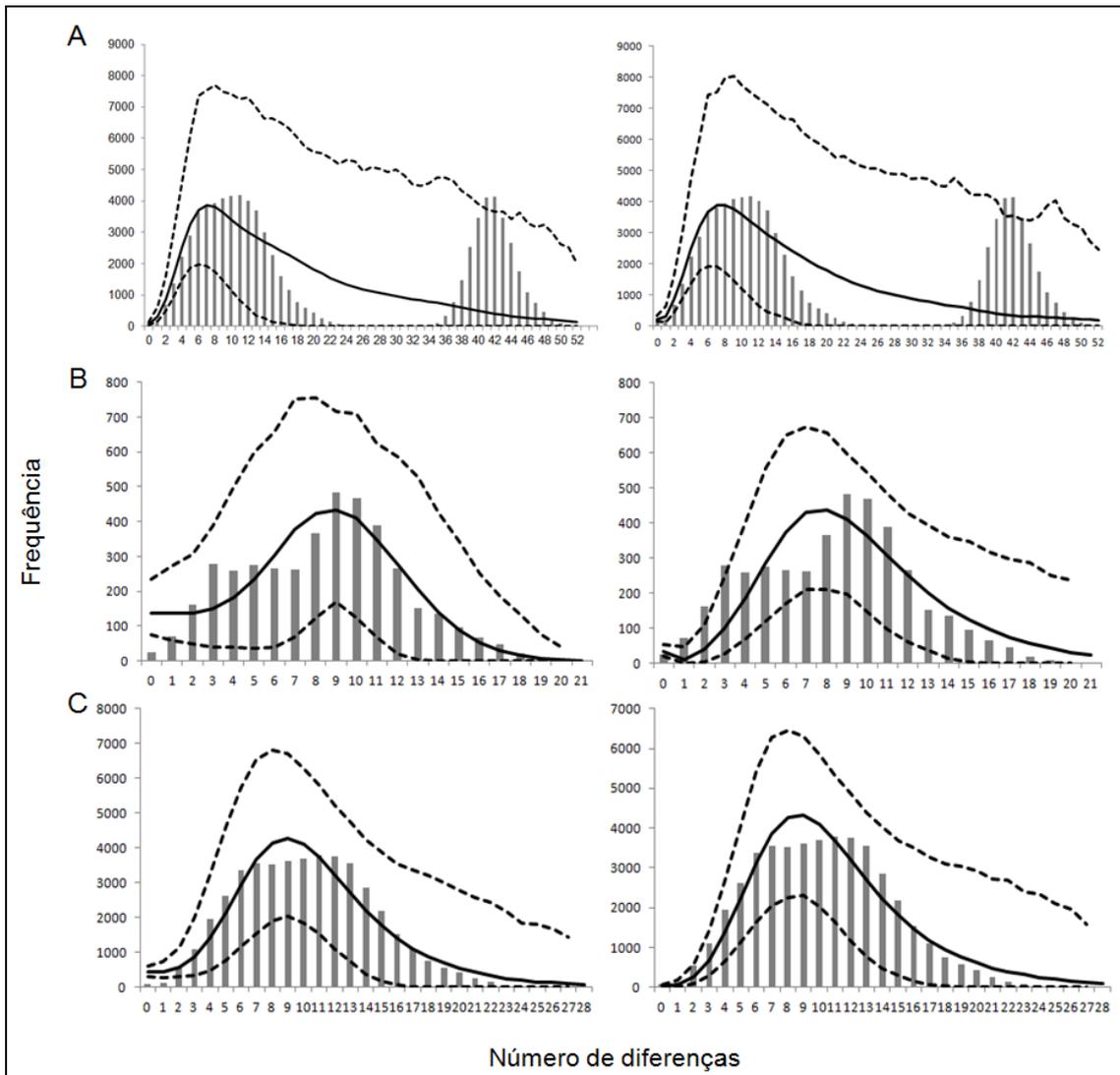


Figura 27 – Análise da distribuição das diferenças com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C). As linhas cheias indicam o comportamento esperado e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança. As barras indicam a distribuição observada.

Tabela 32 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	θ (I.C.)	θ_0 (I.C.)	θ_1 (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	4,51 (2,66 – 19,77)	14,37 (0 – 31,45)	7677,60 (31,88 – 99999)	9,12%	115541 (68146 – 506487)	0,015 (0,332)	0,002 (0,601)
				11,13%	94676 (55840 – 415019)		
Linhagem A	9,68 (5,75 – 12,39)	0,13 (0 – 2,32)	29,27 (20,89 – 409,11)	9,12%	247991 (147309 – 317419)	0,004 (0,496)	0,005 (0,864)
				11,13%	203205 (120706 – 260095)		
Linhagem B	7,60 (5,24 – 14,01)	3,62 (0 – 10,08)	106,09 (39,86 – 99999)	9,12%	194704 (134143 – 358922)	0,002 (0,350)	0,002 (0,867)
				11,13%	159542 (110000 – 294103)		

Tabela 33 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com sequências da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	4,51 (3,03 – 33,24)	9,12%	115541 (77625 – 851574)	0,015 (0,233)	0,002 (0,668)
		11,13%	94676 (63607 – 697786)		
Linhagem A	6,45 (4,80 – 9,66)	9,12%	165242 (122971 – 247479)	0,008 (0,061)	0,005 (0,584)
		11,13%	135401 (100763 – 202786)		
Linhagem B	6,96 (5,02 – 10,34)	9,12%	178308 (128607 – 264900)	0,002 (0,319)	0,002 (0,823)
		11,13%	146107 (105382 – 217061)		

Foram realizadas análises de *extended bayesian skyline plot* para cada linhagem separadamente. Os gráficos mostraram expansão populacional nos dois casos, mas com tempos diferentes. Para a linhagem A, a expansão começa há 50 mil anos e há 190 mil anos para a linhagem B (Figuras 28A e 28B, respectivamente).

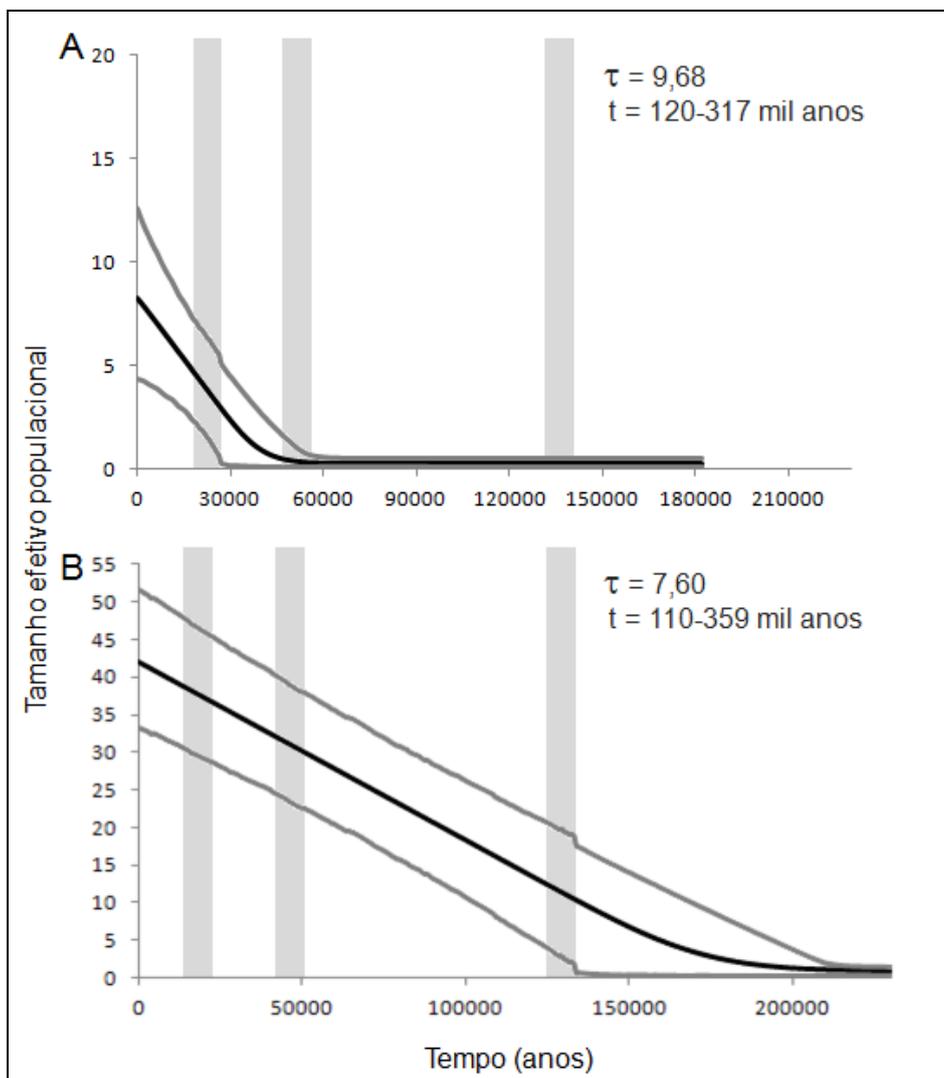


Figura 28 – Gráficos de *Extended Bayesian Skyline Plot* para a linhagem A (A) e linhagem B (B) da região controle mitocondrial de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Estão indicados os valores de τ e o tempo de expansão demográfica obtidos com a análise de distribuição das diferenças.

4.3.2 Citocromo Oxidase I

Foram sequenciados 575 pb de 91 indivíduos (Tabela 25). O alinhamento final não gerou indels e em oito sítios foram encontradas substituições não sinônimas. Apenas 45 sítios foram polimórficos, sendo 21 informativos para parcimônia e 24 *singletons*. Dos 44 haplótipos encontrados, 20 foram compartilhados (Tabela 35). A diversidade haplotípica encontrada foi de 0,945 e a diversidade nucleotídica foi de 0,016. A divergência média (distância p) foi de 0,016 (0 – 0,04). Ao Adicionar as sequências obtidas no GenBank, o alinhamento das 417 sequências foi reduzido a 488 pb. Foram obtidos 78 sítios polimórficos, com 41 informativos para parcimônia e 37 *singletons*. Apenas cinco substituições foram não sinônimas. O número de haplótipos chegou a 111 (29 compartilhados), com diversidade haplotípica de 0,919 e a diversidade nucleotídica se manteve 0,016 (Tabela 34). A divergência média (distância p) se manteve 0,016 (0 – 0,06).

Tabela 34 – Número de indivíduos (N), haplótipos (N_H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) do gene da enzima Citocromo Oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe por localidade.

Localidade	N	N_H	h	π
Norte de Cuba	18	15	0,980	0,019
Sul de Cuba	31	18	0,955	0,020
San Andrés	2	2	-	-
Cartagena	8	7	0,964	0,020
La Guajira	8	7	0,964	0,015
Santa Marta	16	10	0,917	0,018
Venezuela	8	8	1,000	0,026
GenBank				
Florida	29	23	0,970	0,017
Bahamas	243	85	0,955	0,018
Turks & Caicos	24	20	0,975	0,022
Porto Rico	30	23	0,982	0,020
Total	417	111	0,919	0,016

Assim como aconteceu com a região controle mitocondrial, a rede de haplótipos do gene da enzima Citocromo Oxidase I (COI) também evidenciou

dois grupos de haplótipos, separados por 11 eventos mutacionais, porém estes dois estavam conectados por um haplótipo intermediário (Figura 28). Os dois conjuntos de haplótipos mostraram alguns haplótipos centrais mais frequentes e vários haplótipos únicos separados por poucos eventos mutacionais (Figura 29).

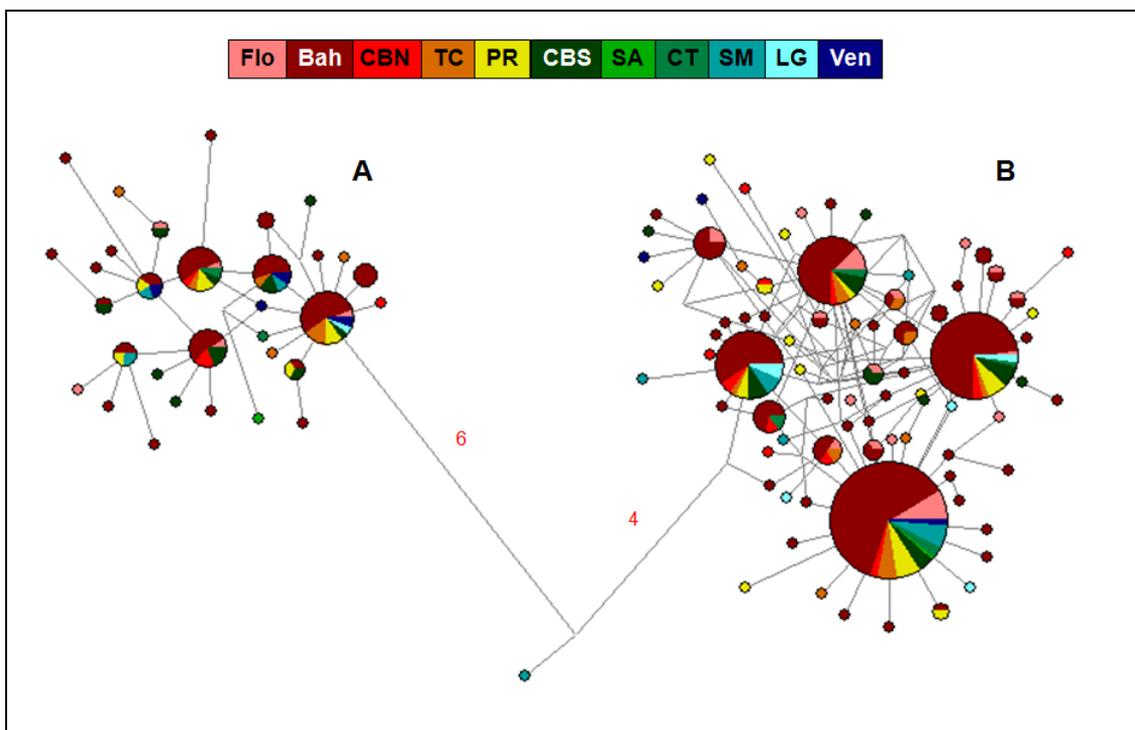


Figura 29 – Rede de haplótipos do gene da enzima Citocromo Oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. Os números representam a quantidade de eventos de mutação entre haplótipos (linhas sem números representam uma mutação apenas). O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos mesmos. Os nós sem círculo são haplótipos hipotéticos não amostrados.

As duas linhagens evidenciadas na rede de haplótipos foram as mesmas encontradas nas análises com a região controle mitocondrial. A linhagem mais abundante (linhagem B) apresentou 317 sequências e 79 haplótipos ($h = 0,868$; $\pi = 0,005$), e a menos abundante (linhagem A) teve 100 sequências e 34 haplótipos ($h = 0,922$; $\pi = 0,006$).

Os cálculos de F_{ST} foram realizados excluindo a localidade de San Andrés por apresentar baixo tamanho amostral. Os únicos valores significativos

foram entre Venezuela e Bahamas, Flórida e Porto Rico, porém estes perderam significância após correção de Bonferroni (Tabela 35).

Não houve relação entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica, como foi evidenciada pela ausência de correlação significativa no teste de Mantel (Figura 30).

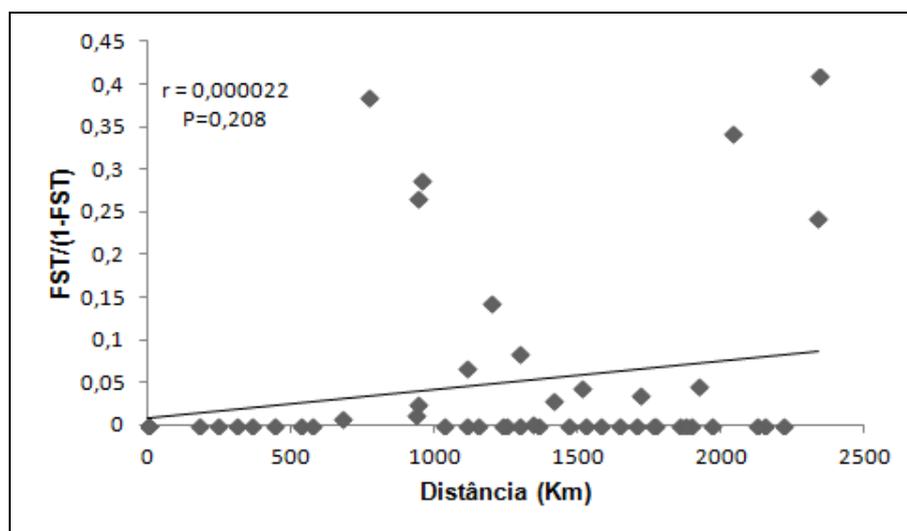


Figura 30 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica de sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

Foram realizadas análises populacionais para todas as sequências. Os agrupamentos obtidos com SAMOVA foram, em sua maioria, significativos (Tabela 36).

Tabela 35 – Valores de F_{ST} par a par entre sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de populações de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Nenhuma das comparações foi estatisticamente significativa após correção de Bonferroni.

	Bahamas	Florida	Porto Rico	Turks e Caicos	CBN	CBS	CT	LG	SM
Bahamas									
Florida	-0,01232								
Porto Rico	-0,01628	-0,0268							
Turks e Caicos	0,00868	0,02514	0,00028						
CBN	-0,02432	-0,02468	-0,02862	-0,01688					
CBS	0,04123	0,06227	0,03465	-0,02656	0,01277				
CT	-0,06238	-0,07091	-0,08112	-0,06739	-0,08424	-0,03859			
LG	-0,04492	-0,08356	-0,06643	-0,0026	-0,09846	0,02811	-0,07682		
SM	-0,03594	-0,04466	-0,04701	-0,02213	-0,06598	0,00119	-0,09004	-0,08129	
Ven	0,25535	0,29046	0,22315	0,07715	0,19557	0,04462	0,13254	0,27822	0,21068

Tabela 36 – Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) realizada de forma hierárquica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
3	Bah+Flo+TC+PR+CBN+CBS+CT+SM/LG/Ven	0,118	0,021	-0,006	0,23	0,113	0,18
4	Bah+Flo+PR+CBN+CT+SM+LG/CBS/TC/Ven	0,072	0,009	-0,023	0,89	0,051	0,17
5	Bah+Flo+PR+CBN+SM+LG/CBS/TC/CT/Ven	0,058	0,006	-0,019	0,98	0,040	0,18
6	Bah+Flo+PR+SM+LG/CBN/CBS/TC/CT/Ven	0,050	0,020	-0,027	0,38	0,025	0,17
7	Bah/Flo/PR/CT+SM+LG+CBN/CBS/TC/Ven	0,070	0,007	-0,063	1,00	0,011	0,19
8	Bah/Flo/PR/CT+SM+LG/CBN/CBS/TC/Ven	0,079	0,010	-0,074	1,00	0,010	0,19

Tabela 37 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	Bah+Flo+CBN+TC+PR+Ven/CBS+CT+SM+LG	-0,008	0,489	0,013	0,17	0,006	0,19
3	Bah+Flo+CBN+TC+PR/CBS+CT+SM+LG/Ven	0,046	0,009	-0,011	0,76	0,035	0,22
	Bah+Flo+CBN+TC+PR+CBS/CT+SM+LG/Ven	0,054	0,005	-0,005	0,59	0,048	0,19
	Bah+Flo+CBN+TC+PR+Ven/CBS/CT+SM+LG	0,001	0,288	0,010	0,18	0,011	0,19
4	Bah+Flo+CBN+TC/CBS/CT+SM+LG/Ven+PR	-0,001	0,335	0,012	0,19	0,010	0,20
	Bah+Flo+CBN/CBS/CT+SM+LG/Ven+PR+TC	0,011	0,181	0,002	0,40	0,013	0,18
	Bah+Flo+CBN+TC+PR/CBS/CT+SM+LG/Ven	0,059	0,004	-0,019	0,88	0,041	0,20
5	Bah+Flo+CBN/TC+PR/CBS/CT+SM+LG/Ven	0,041	0,019	-0,022	0,92	0,020	0,18
	Bah+Flo+CBN+TC/PR/CBS/CT+SM+LG/Ven	0,038	0,048	-0,015	0,79	0,023	0,18
	Bah+Flo+CBN/PR/TC+CBS/CT+SM+LG/Ven	0,050	0,011	-0,029	0,96	0,023	0,20
6	Bah+Flo+CBN/TC+PR/CBS/CT/SM+LG/Ven	0,035	0,074	-0,017	0,85	0,018	0,19

Ao testar hipóteses prévias de estruturação para todas as sequências com AMOVA, o agrupamento que melhor explicou a variação foi o que separou as localidades em quatro populações: sul da ilha de Cuba, Colômbia, Venezuela, e as localidades do Oceano Atlântico (Tabela 37).

Os testes de neutralidade foram realizados para todas as sequências como uma única população assim como para cada linhagem separadamente, para verificar desvios da neutralidade que indiquem um gargalo populacional ou um sinal de expansão. Para todas as localidades em conjunto, o teste F_S de F_u foi significativo, porém o teste D de Tajima não (Tabela 38). Porém, considerando as linhagens A e B separadamente, ambos os testes foram negativos e significativos, indicando um sinal de expansão populacional (Tabela 38).

Tabela 38 – Testes de neutralidade D de Tajima e F_S de F_u para todas as sequências em conjunto e para as linhagens separadamente com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Os valores de significância estão apresentados entre parênteses.

	D de Tajima	F_S de F_u
Total de sequências	-1,083 (p < 0,135)	-24,049 (p < 0,005)
Linhagem A	-1,607 (p < 0,030)	-24,903 (p < 0,001)
Linhagem B	-2,371 (p < 0,001)	-26,961 (p < 0,001)

Para testar o sinal de expansão populacional, foram realizadas análises de distribuição de diferenças. Para o total de sequências, apenas a hipótese de expansão geográfica não pode ser rejeitada, porém, para cada linhagem, ambas as hipóteses de expansão demográfica e geográfica não foram rejeitadas (Tabelas 39 e 40).

Tabela 39 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	θ_0 (I.C.)	θ_1 (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	0,74	0	99999	2,7%	-	0,233	0,019
	(0,61 – 0,97)	(0 – 0,04)	(34,55 – 99999)			(0,00)	(1,00)
				3,3%	-		
Linhagem A	3,40	0,01	30,78	2,7%	258045	0,004	0,027
	(1,89 – 4,40)	(0 – 1,20)	(12,77 – 99999)		(143443 – 333941)	(0,23)	(0,42)
				3,3%	211128		
					(117362 – 273224)		
Linhagem B	2,03	0	595,63	2,7%	154068	0,001	0,040
	(1,63 – 2,22)	(0 – 0,42)	(15,90 – 99999)		(123710 – 168488)	(0,12)	(0,41)
				3,3%	126056		
					(101217 – 137854)		

Tabela 40 – Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão espacial com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. I.C. = Intervalo de 95% de confiança para um dado parâmetro; t = tempo, em anos, desde o evento de expansão; SSD = soma dos quadrados dos desvios e P_{SSD} = valor de p associado; r = índice "raggedness" e P_r = valor de p associado.

Grupo	τ (I.C.)	Taxas de mutação	t anos (I.C.)	SSD (P_{SSD})	r (P_r)
Total	17,79 (1,07 – 30,53)	2,7%	1350182 (81208 – 2317092)	0,029 (0,31)	0,019 (0,89)
		3,3%	1104694 (66443 – 1895802)		
Linhagem A	3,31 (1,73 – 4,07)	2,7%	251214 (131299 – 308895)	0,003 (0,45)	0,027 (0,55)
		3,3%	205539 (107427 – 252732)		
Linhagem B	2,02 (1,30 – 2,34)	2,7%	153309 (98664 – 177596)	0,001 (0,23)	0,040 (0,43)
		3,3%	125435 (80725 – 145306)		

Apesar de não rejeitar a hipótese de expansão geográfica, o gráfico da distribuição das diferenças analisando todas as sequências como uma população mostrou um padrão bimodal (Figura 30). Este padrão bimodal não foi observado quando as linhagens foram analisadas separadamente (Figura 31).

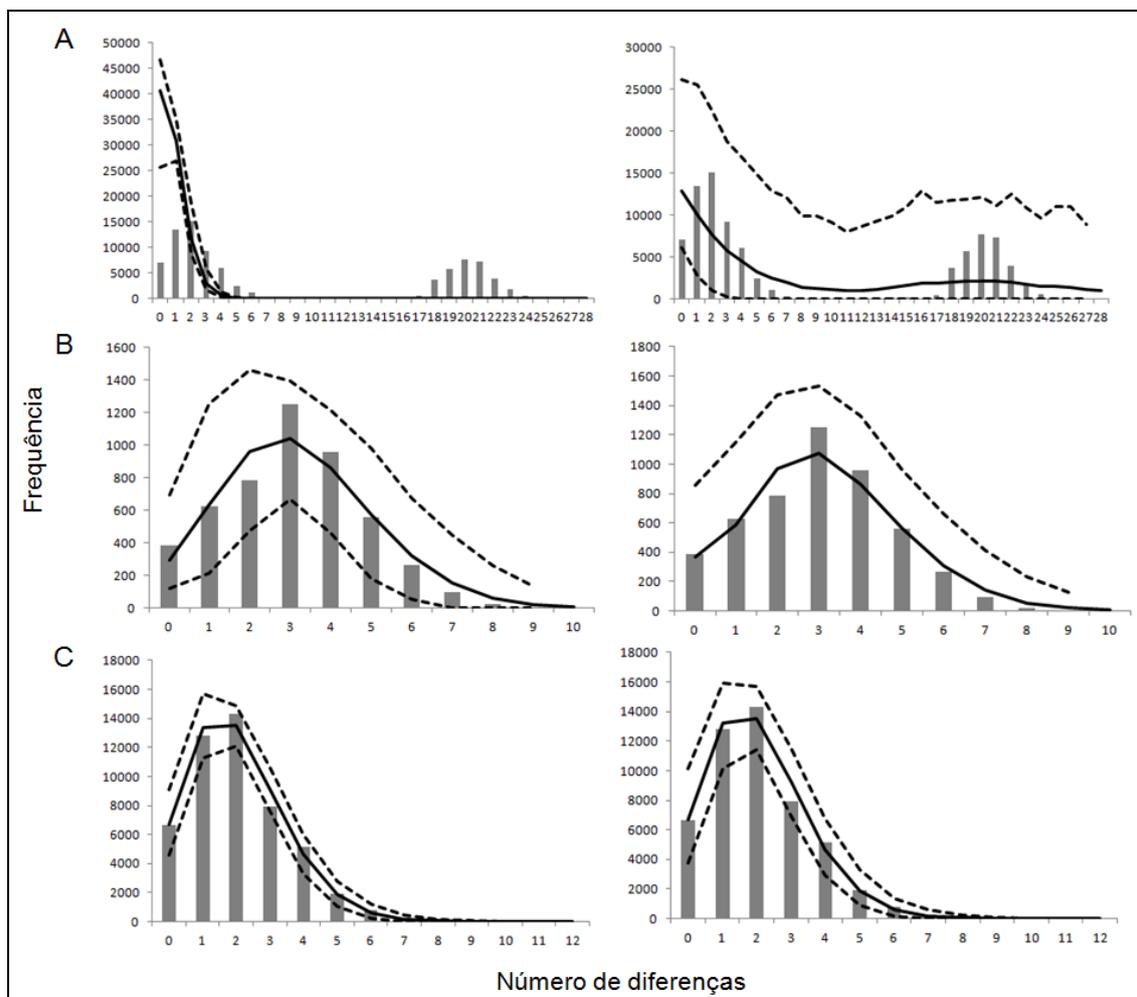


Figura 31 – Análise da distribuição das diferenças sob os cenários de expansão demográfica (esquerda) e espacial (direita) para o total de sequências (A), para a linhagem A (B) e para a linhagem B (C) com sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. As linhas cheias indicam o comportamento esperado e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança. As barras indicam a distribuição observada.

A análise de *extended bayesian skyline plot* foi realizada para as linhagens A e B separadamente. Os gráficos mostraram uma expansão populacional gradual começando há aproximadamente 60 mil anos para as duas linhagens (Figuras 32B e 32C).

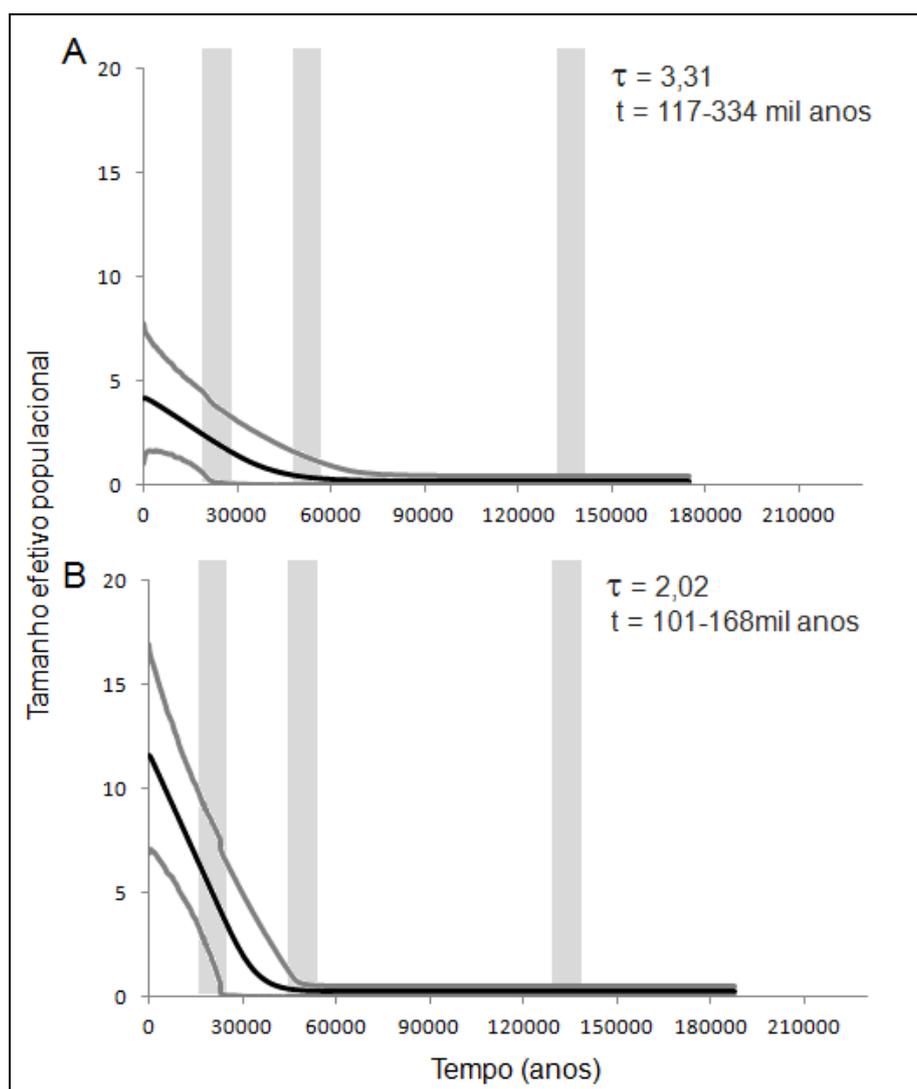


Figura 32 – Gráficos de *Extended Bayesian Skyline Plot* para a linhagem A (A) e linhagem B (B) de sequências do gene da enzima citocromo oxidase I de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Estão indicados os valores de τ e o tempo de expansão demográfica obtidos com a análise de distribuição das diferenças.

4.3.3 Microsatélites

Foram genotipados 77 indivíduos para 10 *loci* (Tabela 25). Desses *loci*, dois, *Par1* e *argus7*, apresentaram um excesso significativo de homozigotos que indicou presença de alelos nulos em mais de duas localidades. Por isso eles não foram considerados para as análises subsequentes (Tabela 41). Em alguns casos, foi indicado um excesso de homozigotos, porém estes não foram significativos ($p > 0,05$). A localidade de San Andrés não foi incluída nesta análise de erro de genotipagem por apresentar apenas dois indivíduos. O número de alelos variou de três (*Par-FWC14b*) a 37 (*Par-FWC07*).

O teste par a par de desequilíbrio de ligação não evidenciou associação significativa entre *loci* após correção de Bonferroni ($p > 0,05$). Houve desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para um *locus* na localidade de Sul de Cuba e para seis dos sete *loci* na localidade de Santa Marta (Tabela 42). A heterozigosidade média total foi de 0,825.

O teste $F_{ST} = R_{ST}$ não mostrou diferença significativa ($p = 0,277$), indicando que o tamanho dos alelos não apresenta informação relevante para a estrutura populacional. Com isso, apenas os valores de F_{ST} foram utilizados (Tabela 43). Os valores do índice Jost D mostraram correlação positiva fraca com aqueles encontrados para o F_{ST} (coeficiente de correlação de Pearson $\rho = 0,146$) (Tabela 43).

Tabela 41 – Excesso de homozigotos detectados na análise com o programa Micro-Checker com genótipos de *Panulirus cf. argus* do Caribe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # suspeita. *Loci* marcados com “+” foram excluídos de análises subsequentes.

	<i>Par-FWC05</i>	<i>Par-FWC07</i>	<i>Par-FWC14a</i>	<i>Par-FWC14b</i>	<i>Par-FWC16</i>	<i>Par-FWC18</i> ⁺	<i>Par1</i> ⁺	<i>Par3</i>	<i>argus7</i> ⁺	<i>argus9</i>
CBN							**			
CBS						***	**		***	***
CT						#	**		**	
LG										
SM						#	**		*	***

Tabela 42 – Valores de heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) para todos os *loci* de *Panulirus cf. argus* do Caribe. O valor em negrito mostra um desvio significativo em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, após correção de Bonferroni.

	<i>Par-FWC05</i>		<i>Par-FWC07</i>		<i>Par-FWC14a</i>		<i>Par-FWC14b</i>		<i>Par-FWC16</i>		<i>Par3</i>		<i>argus9</i>	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
CBN	1,00	0,94	0,88	0,93	0,78	0,91	0,50	0,62	0,83	0,94	0,63	0,78	0,50	0,63
CBS	0,97	0,95	0,85	0,96	0,91	0,95	0,43	0,47	0,88	0,94	0,82	0,83	0,46	0,75
CT	0,89	0,99	1,00	0,96	1,00	0,92	0,22	0,37	1,00	0,94	1,00	0,95	0,44	0,53
LG	0,88	0,93	0,86	0,97	0,88	0,94	0,63	0,57	1,00	0,92	0,86	0,86	0,43	0,54
SM	1,00	0,92	0,92	0,95	0,85	0,93	0,38	0,45	0,90	0,92	0,58	0,81	0,23	0,73

Um teste de Mantel não evidenciou presença de correlação entre os valores de F_{ST} e a distância geográfica (Figura 33).

Tabela 43 – Valores do índice D de Jost (acima) e de F_{ST} (abaixo) par a par entre as populações para os 8 loci de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe. Nenhuma comparação foi estatisticamente significativa após correção de Bonferroni.

	CBN	CBS	CT	SM	LG
CBN		0,008	-0,002	0,000	0,028
CBS	0,004		-0,004	-0,018	0,009
CT	-0,013	0,005		-0,079	-0,010
SM	-0,009	-0,008	-0,004		-0,003
LG	-0,002	-0,003	-0,013	-0,007	

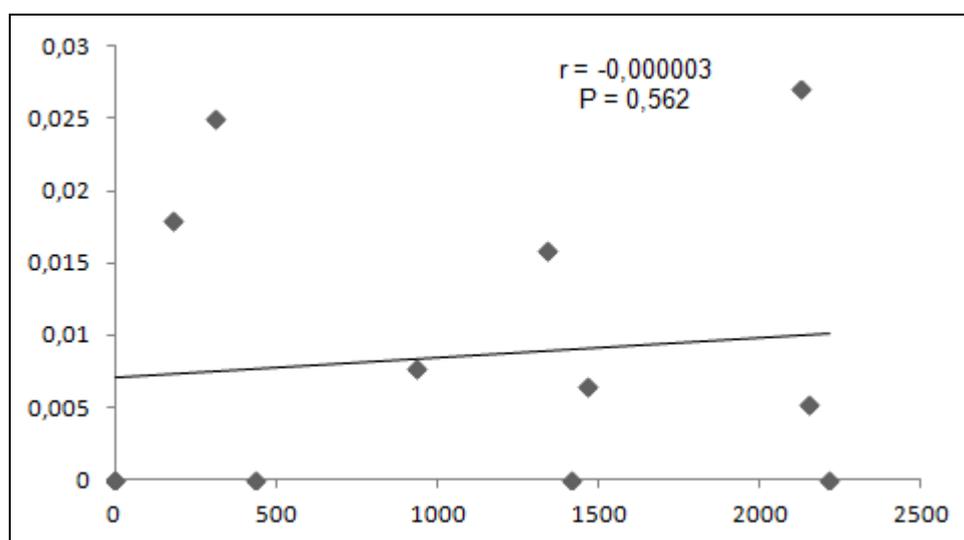


Figura 33 – Falta de correlação entre a diferenciação genética e a distância geográfica com loci de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

Para testar hipóteses de estruturação com sentido geográfico, foram realizadas análises de AMOVA. Neste caso, vários agrupamentos para $K = 2$ e $K = 3$ foram testados, porém nenhum valor foi significativo (Tabela 44).

A análise fatorial de correspondência mostrou que as populações do sul de Cuba e de La Guajira são mais diferenciadas das demais. Não houve evidência de separação dos indivíduos em duas linhagens, como observado com o DNA mitocondrial (Figura 34).

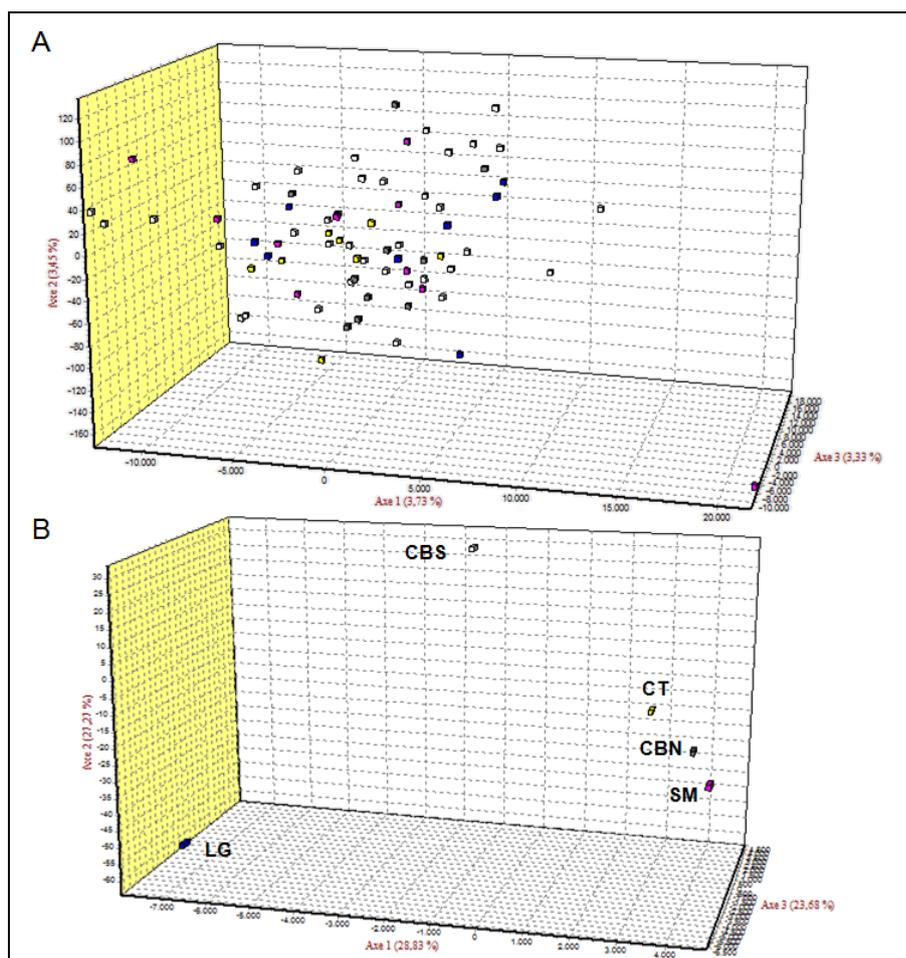


Figura 34 – Análise fatorial de correspondência por indivíduo (A) e população (B) de acordo com os dados de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

A análise Bayesiana de atribuição realizada no programa STRUCTURE indicou que o número de partições mais provável a partir dos dados seria uma única população. A média dos valores de verossimilhança entre as 10 corridas ($\ln P(D)$) indicou valores muito próximos de $K = 1$ e $K = 2$ (Figura 35). A estatística *ad hoc* baseada na taxa de mudança da (log) probabilidade dos dados entre sucessivos valores de K (Delta K) indicou um valor de $K = 2$ (Figura 36). Porém, os gráficos de barras do coeficiente Q para cada indivíduo sob os cenários $K = 2$ ou $K = 3$ não mostraram diferenças entre localidades, indicando que $K = 1$ é o cenário mais provável (Figura 37 e 38).

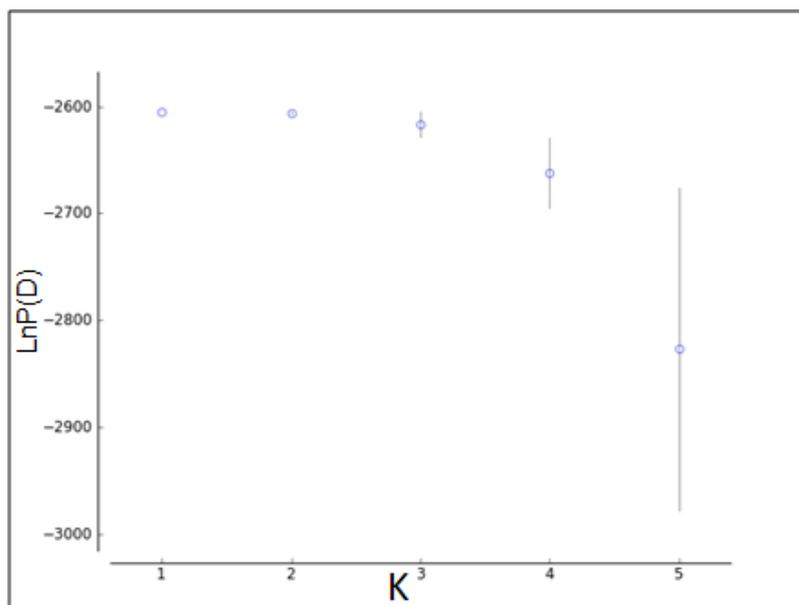


Figura 35 – Gráfico com o número de partições (K) mais provável a partir dos valores de LnP(D) obtidos com os dados de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

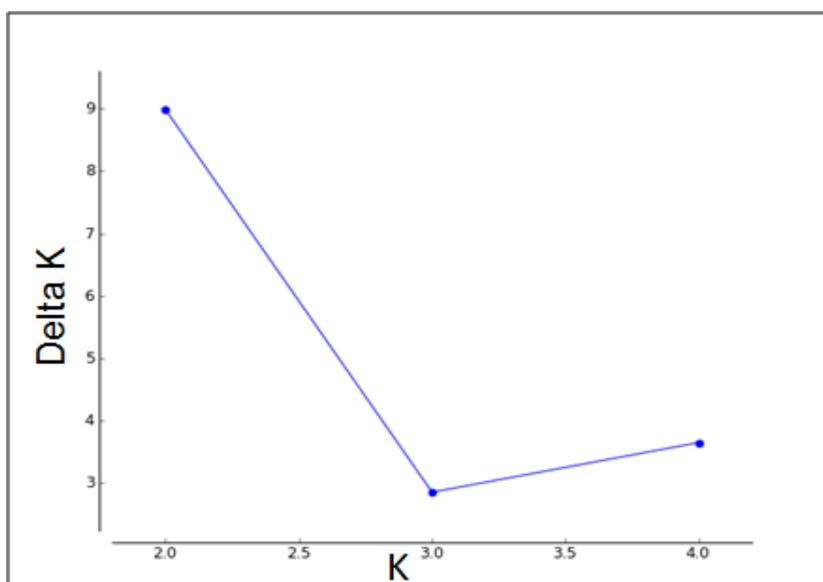


Figura 36 – Gráfico com o número de partições (K) mais provável a partir da estatística de Delta K obtida com os dados de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

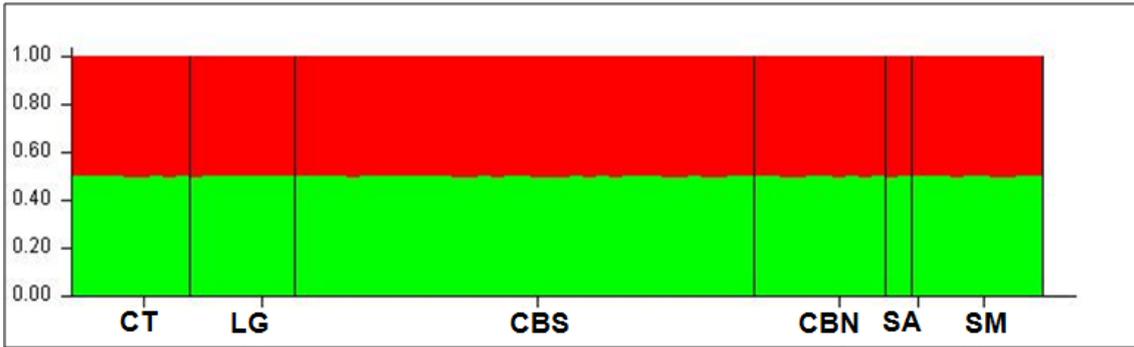


Figura 37 – Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de duas populações ($K=2$) de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

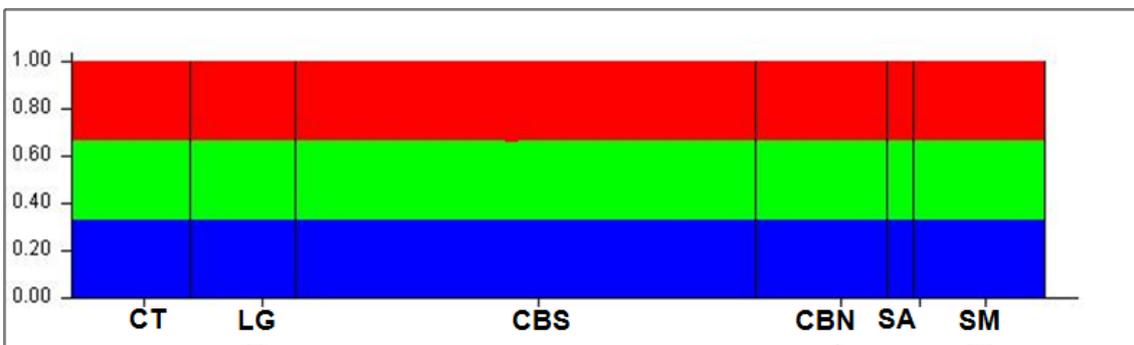


Figura 38 – Gráfico de barras do coeficiente Q para cada indivíduo considerando o cenário de estruturação de três populações ($K=3$) de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

Tabela 44 – Análise molecular de variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori* com dados de microssatélites de *Panulirus cf. argus* do Caribe.

K	Agrupamento	Entre grupos (Φ_{CT})	p	Entre populações, dentre grupos (Φ_{SC})	p	Dentro das populações (Φ_{ST})	p
2	CBN/CBS+CT+SM+LG	0,001	0,414	0,000	0,68	0,002	0,62
	CBN+CBS/CT+SM+LG	-0,002	0,788	0,002	0,51	0,000	0,63
3	CBN/CBS/CT+SM+LG	0,005	0,301	-0,004	0,73	0,001	0,64
	CBN/CBS+CT/SM+LG	-0,005	0,798	0,004	0,41	0,000	0,64
4	CBN/CBS/CT/SM+LG	0,002	0,472	-0,001	0,59	0,001	0,65

5 DISCUSSÃO

5.1 Confirmação taxonômica de *Panulirus cf. argus*

O resultado da análise filogenética não só apoiou a separação de *P. argus* em duas espécies, como mostrou que todos os indivíduos coletados no Brasil (330 indivíduos ao longo de toda a distribuição dessa lagosta no país) formaram um grupo monofilético altamente diferenciado (11,8 a 15,5%; K2P) do outro grupo monofilético formado por indivíduos coletados no Caribe (417 indivíduos coletados em sete países).

Este resultado reforça aqueles de Tourinho e colaboradores (2012), que mostraram que a divergência encontrada entre sequências do gene da enzima Citocromo Oxidase I (14,4 a 17,8%; K2P) e entre sequências da subunidade maior ribossomal (16S) (5 a 5,8%; K2P) de indivíduos da espécie *P. cf. argus* coletados no Caribe e no Brasil é equivalente à diferença encontrada entre espécies do gênero *Panulirus* (COI: 10 a 32%; 16S: 3 a 19%) (CANNAS et al., 2006; NARO-MACIEL et al., 2011; PTACEK et al., 2001) e entre espécies de outros gêneros da família Palinuridae (COI: 4,3 a 24,3%) (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012).

Até o momento, não existe uma definição de qual espécie deve manter o binômio *Panulirus argus* e, conseqüentemente, não foi realizada uma descrição taxonômica para a provável espécie nova. Por isso, nesta discussão será mantida a denominação *P. cf. argus* do Caribe para a espécie que ocorre no Caribe e *P. cf. argus* do Brasil para a espécie que ocorre no Brasil.

Apesar de existir uma notificação da ocorrência isolada da espécie brasileira no Caribe (SARVER; FRESHWATER; WALSH, 2000), a análise filogenética demonstrou que nenhum indivíduo com haplótipo mitocondrial típico de *P. cf. argus* do Brasil foi detectado nas amostras do Caribe utilizadas nesta tese. No caso da costa brasileira, nunca foi registrada a ocorrência da espécie caribenha e também

não foram encontrados indivíduos com o perfil mitocondrial de desta dentre os amostrados no Brasil.

Com isso, neste trabalho, as análises populacionais foram realizadas para os indivíduos coletados no Caribe e os coletados no Brasil separadamente, considerando sempre que se trata de espécies distintas.

5.2 *Panulirus cf. argus* do Brasil

5.2.1 Diversidade genética e filogeografia

Os dois marcadores mitocondriais se mostraram altamente variáveis. A região controle mitocondrial (RC) mostrou valores extremamente elevados de diversidades haplotípica (0,999) e nucleotídica (0,023). Já o gene da enzima Citocromo Oxidase I (COI) também mostrou alta diversidade haplotípica (0,893), porém com valores mais baixos de diversidade nucleotídica (0,005). A diferença entre os dois marcadores é esperada, pois o gene da enzima Citocromo Oxidase I, por ser região codificante de proteína, está sujeito à seleção purificadora e, portanto, é mais conservado. Mesmo com taxas de evolução diferentes, ambos marcadores mostraram um nível de diversidade elevado.

Alta diversidade é frequente em espécies de lagostas. Dentro do gênero *Panulirus*, o mesmo alto nível de diversidade já foi encontrado para a região controle de *P. inflatus* (h: 0,957 – 1,000; π : 0,019 – 0,028) (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2008), e para o gene COI de *P. japonicus* (h: 0,959 – 0,990; π : 0,009 – 0,010) (INOUE et al., 2007). Altos níveis de diversidade também foram encontrados para *P. interruptus* com análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de enzima de restrição da região controle mitocondrial (h: 0,844 – 0,910; π : 0,022 – 0,045) (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2006) e para o gene 12S de *P. cygnus* (h: 0,40 – 0,81; π : 0,002 – 0,004) (KENNINGTON et al., 2013).

Em espécies de outros gêneros da família Palinuridae, alta diversidade haplotípica com baixa diversidade nucleotídica foram encontradas para a região controle de *Palinurus elephas* (h: 0,917 – 1,000 π : 0,003 – 0,015) (BABBUCCI et al., 2010), *Palinurus delagoae* (h: 0,960 – 0,999 π : 0,006 – 0,009) (GOPAL et al., 2006), e *Palinurus gilchristi* (h: 0,843 – 0,896; π : 0,004 – 0,005) (TOLLEY et al., 2005). Menores níveis de diversidade foram encontrados para o gene da enzima COI de *Palinurus elephas* (h: 0,370 – 0,842; π : 0,001 – 0,003) (PALERO et al., 2008).

A análise dos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica podem revelar aspectos da história evolutiva de populações e linhagens, como indicações de que as populações são antigas e estáveis ou se sofreram efeitos de uma expansão ou gargalo populacional recente (GRANT; BOWEN, 1998). Os valores elevados tanto para diversidade haplotípica como nucleotídica ($h > 0,5$ e $\pi > 0,5\%$) encontrados para a região controle mitocondrial de *P. cf. argus* do Brasil podem indicar uma população grande e estável com longa história evolutiva ou contato secundário entre linhagens diferentes, enquanto os valores para o gene COI (alta h e média ou baixa π) indicariam uma expansão após um período de baixo tamanho efetivo populacional (GRANT; BOWEN, 1998). Naturalmente, as duas regiões gênicas se encontram ligadas no DNA mitocondrial, de modo que seguem a mesma história demográfica. A diferença entre os dois, portanto, deve refletir o efeito da seleção e da taxa de substituição entre as duas regiões, de modo que devem ser buscadas evidências independentes da relação $h \times \pi$ para explicar sua história evolutiva.

Os dois marcadores mitocondriais também apresentaram diferentes relações entre haplótipos. Enquanto o gene COI mostrou haplótipos diferenciados por poucos eventos mutacionais, a região controle mitocondrial evidenciou a existência de duas linhagens altamente divergentes e igualmente distribuídas pela costa brasileira. As duas linhagens encontradas apresentam sinais de expansão, porém em uma delas este sinal é mais claro pelo fato da distribuição dos haplótipos na rede ser em formato de estrela, o que também sugere uma expansão mais recente.

O perfil bimodal obtido com a análise de distribuição de diferenças da região controle é concordante com a existência de duas linhagens. Esse padrão de distribuição pode ser obtido a partir de uma separação de linhagens com contato

secundário. Porém, também pode ser explicado por um estrangulamento populacional em uma população estável. A diminuição abrupta do tamanho populacional poderia eliminar a maior parte da variação até deixar poucos haplótipos mais frequentes, e, após um período de expansão, revelariam tanto um perfil bimodal na análise de distribuição das diferenças, como também se apresentariam mais de uma linhagem na rede de haplótipos.

Tanto os testes de neutralidade como a análise de distribuição das diferenças e os gráficos de *extended bayesian skyline plot* mostraram sinais de expansão populacional para as duas linhagens da região controle mitocondrial e para os indivíduos como um todo com o gene COI. As linhagens apresentaram sinais de expansão em tempos diferentes, o que poderia indicar que as linhagens A e B não se originaram de um único evento de contração e expansão populacional. O gene COI mostrou uma expansão compatível com a da linhagem A. Não houve diferença entre os tempos de expansão demográfica e espacial, sugerindo que as linhagens aumentaram de tamanho ao mesmo tempo em que expandiram sua distribuição. Em todos os casos, a análise de *extended bayesian skyline plot* mostrou um aumento no tamanho populacional repentino e acentuado, a partir de uma população muito reduzida.

O registro de mais de uma linhagem mitocondrial ocorrendo em simpatria é comum principalmente em espécies que sofreram redução de habitat devido às mudanças climáticas do Pleistoceno, normalmente sendo encontrados locais de mistura e contato secundário em regiões centrais da distribuição de cada espécie (MORA et al., 2007; NOONAN; GAUCHER, 2006; PFENNINGER; POSADA, 2002; WOOD; FISHER; REEDER, 2008; XU et al., 2009). Porém, também já foi registrada a presença de mais de uma linhagem para a região controle de organismos marinhos, como o atum (*Thunnus thynnus*), peixe-espada (*Xyphias gladius*) e peixe-cirurgião (*Naso brevirostris*), sendo que no último caso há ocorrência de todas as linhagens em toda a distribuição da espécie (BREMER et al., 2005; HORNE et al., 2008). Em todos os casos, a ocorrência de mais de uma linhagem mitocondrial em simpatria foi sempre explicada como reflexo de uma estruturação populacional histórica seguida de encontro secundário.

No caso de outras espécies de lagostas, a ocorrência de mais de uma linhagem mitocondrial já foi registrada, porém apenas em um caso de estruturação populacional, onde as linhagens são restritas a diferentes localidades e não ocorrem em simpatria (GOPAL et al., 2006). No entanto, um estudo preliminar com a espécie de lagosta *Panulirus laevicauda* no Brasil também encontrou duas linhagens da região controle mitocondrial simpátricas e altamente diferenciadas no nordeste brasileiro (OLIVEIRA, 2008). Esse estudo, junto com os dados observados de *P. argus* do Brasil, podem indicar um padrão biogeográfico compartilhado entre diferentes espécies que poderia revelar a ocorrência de algum evento histórico comum que influenciou a história evolutiva da região. Porém, por ser um estudo preliminar, não é possível saber se as diferentes linhagens encontradas foram separadas no mesmo tempo evolutivo e se compartilham os mesmos processos demográficos que as linhagens de *P. cf. argus* do Brasil.

Algumas hipóteses poderiam explicar a formação de duas linhagens de haplótipos na costa brasileira:

- 1) Dispersão a partir de uma população externa: Colonização da costa brasileira a partir de uma população externa em dois momentos, causando provisoriamente a separação das linhagens e explicando os momentos diferentes de expansão das duas linhagens. As duas linhagens seriam subsequentemente misturadas por fluxo gênico ao longo da costa;
- 2) Dispersão sobre barreira semi-permeável e contato secundário: Um primeiro momento de distribuição restrita a uma localidade na costa brasileira provocada pela presença de uma barreira impedindo a expansão espacial. Em um segundo momento, uma parte dos indivíduos consegue colonizar a área depois da barreira, estabelecer uma população e se expandir. Em um terceiro momento, a barreira some, as populações se expandem e restabelecem o fluxo gênico;
- 3) Vicariância seguida de contato secundário: O surgimento de uma barreira temporária impedindo a comunicação entre os indivíduos e

separando duas regiões da costa brasileira. A barreira desaparece permitindo o contato secundário e a expansão de cada população.

- 4) Estrangulamento populacional sobre população variável e crescimento a partir de dois haplótipos ancestrais independentes: Um gargalo populacional sobre uma população estável e muito polimórfica, eliminando a maior parte dos haplótipos raros e deixando apenas dois haplótipos comuns ao longo da costa. Expansão da população, gerando topologias independentes em forma de estrela, resultados do acúmulo de mutações ao longo da expansão independentemente nos dois haplótipos iniciais.

O primeiro cenário sugere a presença de *P. cf. argus* do Brasil primeiramente em outra localidade que não é a costa brasileira. Este cenário vai contra a hipótese original do surgimento da espécie, que usa a presença do deságue do Rio Amazonas como uma barreira vicariante que permitiu a especiação e divergência entre *P. cf. argus* do Caribe e do Brasil, tendo como pressuposto a presença da espécie nas duas áreas, inclusive na costa brasileira (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012).

Se levarmos em consideração os valores de θ iniciais obtidos com a análise de distribuição de diferenças, as duas linhagens se expandiram a partir de um tamanho populacional reduzido, o que também é sugerido pelo tamanho populacional próximo a zero na coalescência nas análises de *extended bayesian skyline plot*. Um tamanho efetivo reduzido pode ser consequência de um efeito fundador ocasionado pela colonização de uma nova área, compatível com o segundo cenário descrito acima (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). Porém, uma redução do tamanho populacional também pode ser consequência da redução de habitat causada pelos ciclos de diminuição do nível do mar durante as frequentes mudanças climáticas no pleistoceno (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002) sendo, portanto, compatível com os cenários três e quatro, descritos anteriormente.

A diferença nos tempos de expansão observada entre as linhagens contraria o quarto cenário descrito, pois não explica porque os haplótipos remanescentes

após o efeito gargalo se expandiriam de maneira diferenciada. Este dado, porém, suporta o segundo cenário. Para o cenário dois, a primeira linhagem se expandiu ao colonizar uma área nova e a segunda linhagem pode ampliar sua distribuição quando a barreira que isolava as duas áreas deixou de existir. O terceiro cenário tampouco discorda desse dado, pois as duas populações nos lados da barreira geográfica podem ter se expandido em momentos diferentes antes de seu contato secundário.

O último ciclo glacial começou há aproximadamente 130 mil anos com um período interglacial de aproximadamente 20 mil anos, no qual o nível do mar chegou a atingir valores superiores ao atual (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002). Ele foi seguido de uma série de oscilações entre estádios frios e interestádios quentes que refletiram no clima e no nível do mar, chegando este a 80 metros abaixo dos níveis atuais (Figura 39) (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002). No período de último máximo glacial, que começou há aproximadamente 30 mil anos e durou cerca de 10 mil anos, o nível do mar chegou a 100 metros a menos que o nível atual durante esse período (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002).

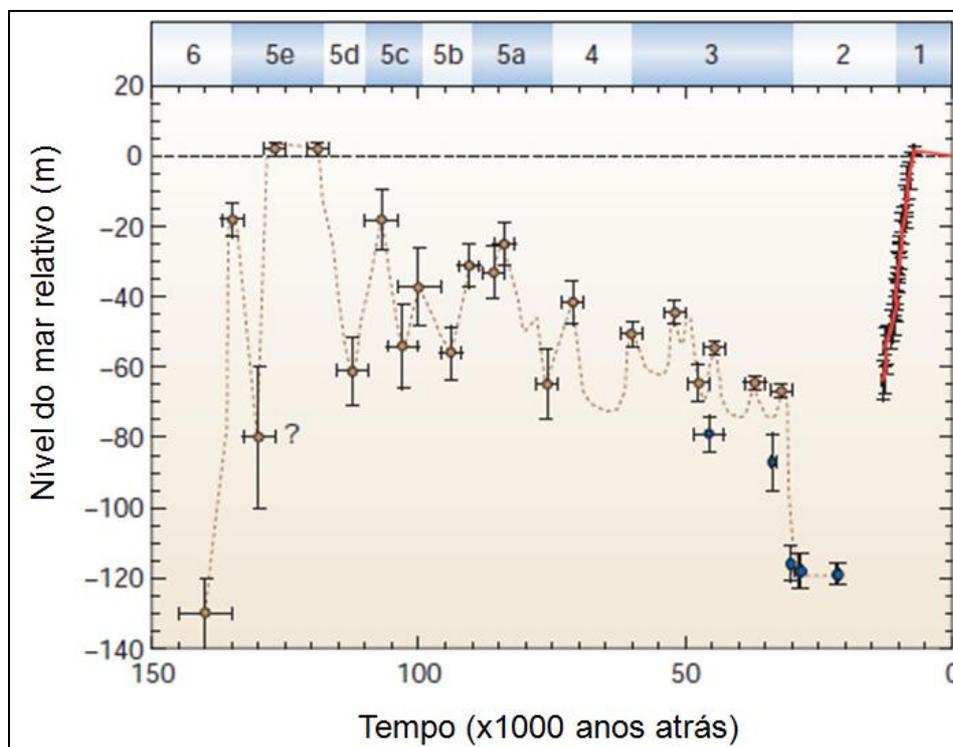


Figura 39 – Oscilação do nível do mar ao longo do último ciclo glacial. O período 5e corresponde ao último período interglacial e o período 2 corresponde ao último máximo glacial.

A plataforma continental não possui uma distribuição homogênea ao longo da costa brasileira (Figura 40). Em alguns pontos, como na região do Amazonas e do banco de Abrolhos, a plataforma é mais larga, chegando a mais de 240 quilômetros de largura, enquanto em algumas regiões da costa leste e nordeste a plataforma continental é mais estreita, chegando a uma largura de apenas oito quilômetros em Salvador (KNOPPERS; EKAU; FIGUEIREDO, 1999). Em geral, a profundidade da plataforma na costa brasileira, da região norte até o litoral do estado do Espírito Santo, não ultrapassa 80 metros de profundidade, sendo que a partir desse ponto existe a quebra da plataforma com a profundidade caindo abruptamente até cerca de 1000 metros (KNOPPERS; EKAU; FIGUEIREDO, 1999).

Atualmente, *P. cf. argus* do Brasil possui uma distribuição restrita à plataforma continental, ocupando profundidades de no máximo 50 metros, sendo mais abundante na costa norte no Brasil. Considerando que o nível do mar variou bastante durante os últimos ciclos glaciais, chegando a 100 metros abaixo do nível

atual, um momento de baixo nível do mar resultou em uma diminuição da área rasa de plataforma continental, atingindo regiões do talude com mais de mil metros de profundidade. Com isso, grande parte da costa brasileira se transformou em uma região de águas profundas, ocasionando uma perda de habitat para as lagostas. Em um momento como esse, de baixo nível do mar, regiões de ilhas, como as cadeias de Fernando de Noronha e de Trindade, podem ter servido como refúgios para o desenvolvimento dessas lagostas, sendo possíveis cenários para a separação de *P. cf. argus* do Brasil em duas linhagens, permitindo tanto o cenário de gargalo populacional como o de uma possível separação geográfica (Figura 41).

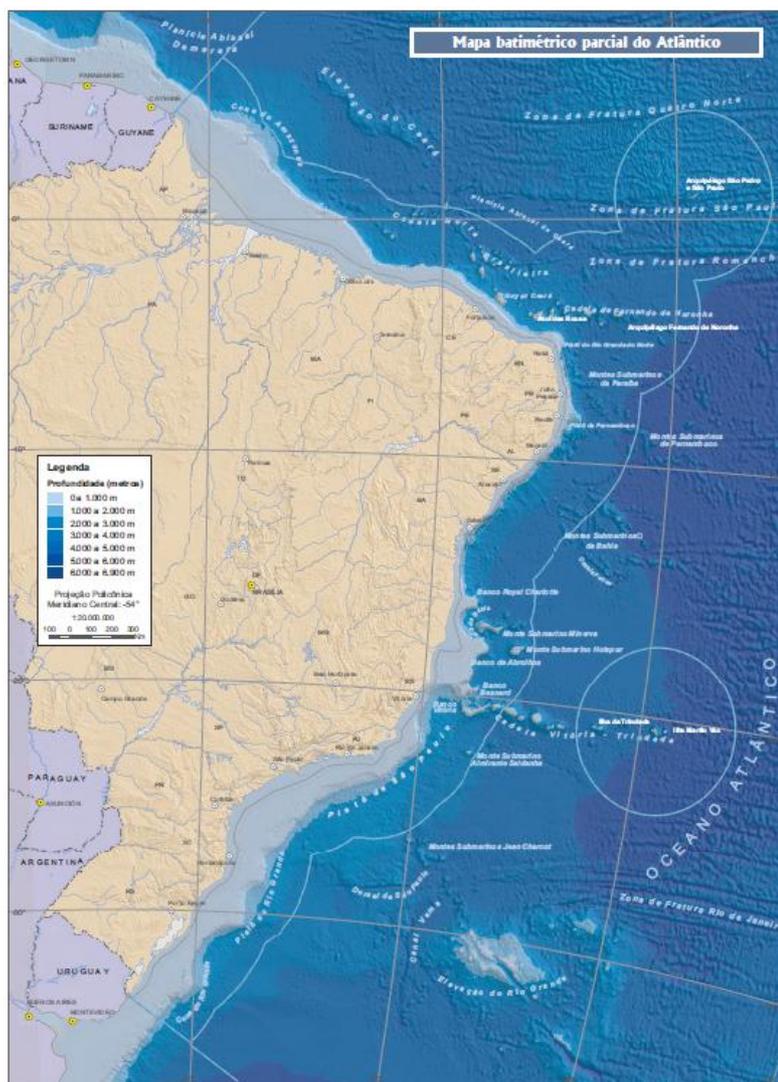


Figura 40 – Mapa batimétrico da costa brasileira mostrando os limites da plataforma continental e a profundidade do nível do mar. Retirado do Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil, IBGE.

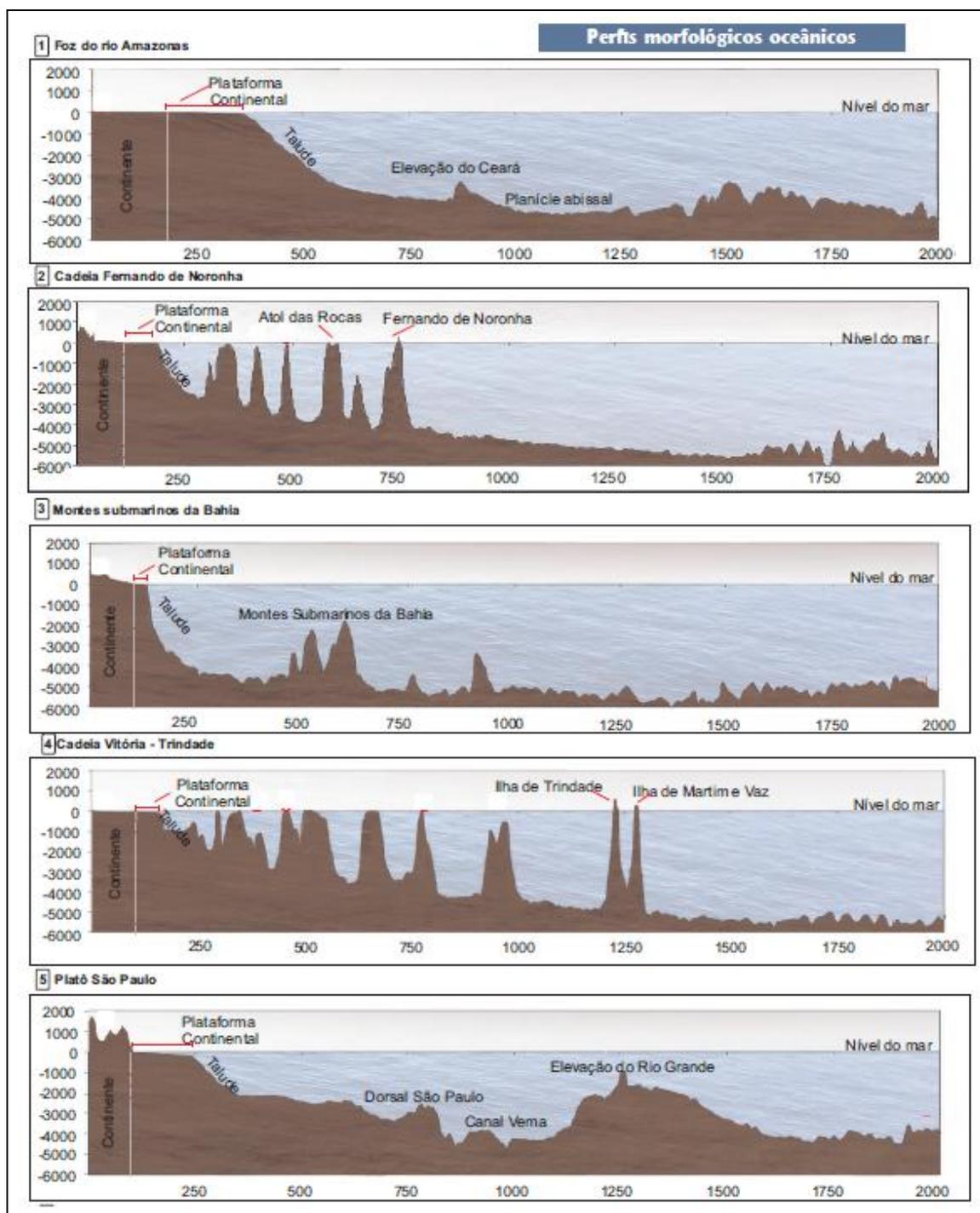


Figura 41 – Perfis morfológicos oceânicos de cinco locais da costa brasileira. Retirado do Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil, IBGE.

Se considerarmos a taxa de mutação utilizada, as linhagens divergiram há aproximadamente 233 - 288 mil anos, época que antecedeu um dos períodos interglaciais antes do último ciclo glacial (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002). O

tempo de expansão obtido para a primeira expansão, da linhagem B, coincide com o início do último período interglacial iniciando a partir de 130 mil anos, enquanto o tempo da expansão da linhagem A coincide com o período de oscilação no nível do mar que precedeu o último máximo glacial há 50 mil anos (Figura 39).

5.2.2 Estruturação populacional

Os microssatélites, por serem marcadores altamente polimórficos e com elevada taxa de mutação, são conhecidos por refletirem a demografia recente de uma população ou espécie (HEWITT, 2001). Os microssatélites de *P. cf. argus* do Brasil não revelaram a mesma separação em duas linhagens obtida com a região controle mitocondrial, sugerindo que este registro é um evento histórico antigo o suficiente para já perder seu rastro nos microssatélites, tanto por sua alta taxa de mutação como, principalmente, pela recombinação entre eles.

De uma maneira geral, os marcadores mitocondriais e os microssatélites não mostraram evidências fortes de estruturação populacional nas duas espécies de lagosta estudadas. Os altos níveis de diversidade encontrados com os marcadores mitocondriais foram mantidos em todas as localidades e a maioria dos haplótipos compartilhados está distribuída em todas as regiões (Tabelas 4.2, 4.10; Figuras 4.3, 4.8).

Nenhum valor de F_{ST} foi significativo para os marcadores mitocondriais, porém três valores foram significativos para os microssatélites, todos entre o litoral sul da Bahia e localidades do litoral norte do país (Piauí, Maranhão e Ceará). Para uma correta utilização do F_{ST} como índice de estruturação populacional, é ideal que as populações estejam em equilíbrio migração-deriva, ou seja, que os efeitos da deriva genética e endocruzamento estejam sendo contrabalançados, de maneira dinâmica de retroalimentação negativa, com os efeitos da migração. O tempo necessário para que este estágio seja atingido é, portanto, proporcional à força da deriva (ou seja, é inversamente proporcional ao tamanho populacional) e

inversamente proporcional ao fluxo gênico (ou seja, níveis maiores de fluxo gênico fazem com que o equilíbrio seja atingido mais lentamente) (NEIGEL, 2002). No caso de populações com tamanho efetivo elevado, o tempo necessário para o valor estimado de F_{ST} chegar ao valor de equilíbrio, que permita uma estimativa razoável do fluxo gênico, pode ser maior que a idade da própria espécie, especialmente em *loci* com altas taxas de mutação, como microssatélites e a região controle mitocondrial (NEIGEL, 2002).

Os valores do índice D de Jost são mais sensíveis como medidas de distância genética e tendem a atingir valores altos para *loci* com alto polimorfismo (WHITLOCK, 2011). Porém, neste trabalho os valores foram, em geral, mais baixos que os valores de F_{ST} , indicando homogeneidade entre as localidades.

Em geral, os agrupamentos obtidos com a análise espacial de variância molecular (SAMOVA) não fizeram sentido geográfico para nenhum dos marcadores utilizados. Um motivo para este fato pode ter sido a limitação do programa em usar uma diagramação espacial definida por coordenadas geográficas, que nem sempre permitem uma análise espacial que respeite a presença de barreiras, como, no caso do ambiente marinho, a curvatura da costa brasileira desde o estado do Ceará até o estado de Alagoas. Para uma espécie marinha, a distância entre os estados do norte e os do sul é maior do que a obtida linearmente através das coordenadas geográficas.

Nenhum valor de Φ_{CT} obtido com a AMOVA para a região controle foi significativo. Para o gene COI, o maior valor de Φ_{CT} foi obtido quando foram testados três agrupamentos diferentes, sempre separando o Espírito Santo das localidades mais ao norte. No primeiro, Espírito Santo e sul da Bahia foram agrupados e separados do resto das localidades. No segundo caso, as populações do norte, do Pará ao Piauí, foram separadas do resto, isolando Espírito Santo como uma população a parte. O terceiro cenário juntou as localidades do norte/nordeste, do Pará ao Ceará, e o sul da Bahia ao Espírito Santo. Nos três casos, o valor de Φ_{CT} obtido foi significativo, mas baixo, menor que 0,01. Com os dados de microssatélites, o agrupamento significativo com maior valor de Φ_{CT} separou Pará do resto das

localidades, e também separou as localidades mais ao sul, do sul da Bahia a São Paulo (localidade unida ao Rio de Janeiro para a análise).

Apesar dos baixos valores de variação entre grupos, os resultados dos testes de AMOVA indicam alguma restrição do fluxo gênico entre os indivíduos do leste/sudeste do Brasil (sul da Bahia a São Paulo) e os do norte/nordeste (Pará ao norte da Bahia), o que pode ser explicado pela circulação de correntes marítimas superficiais na costa brasileira. A costa brasileira é afetada principalmente por duas correntes de superfície principais, provenientes da separação da Corrente Sul Equatorial na altura do nordeste brasileiro em Corrente do Brasil, com sentido sul, e Corrente do Norte do Brasil (ou Corrente das Guianas), com sentido norte, que poderiam influenciar a dispersão das larvas planctônicas de *P. cf. argus* (Figura 42).

Diferente dos resultados da AMOVA, a análise bayesiana de atribuição não mostrou evidências de estruturação ou diferenciação genética entre as localidades. Essa análise utiliza outra abordagem para detectar diferentes grupos populacionais, utilizando os genótipos de cada indivíduo sem a informação de sua localidade de origem, atribuindo indivíduos a grupos de modo a maximizar o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada grupo.

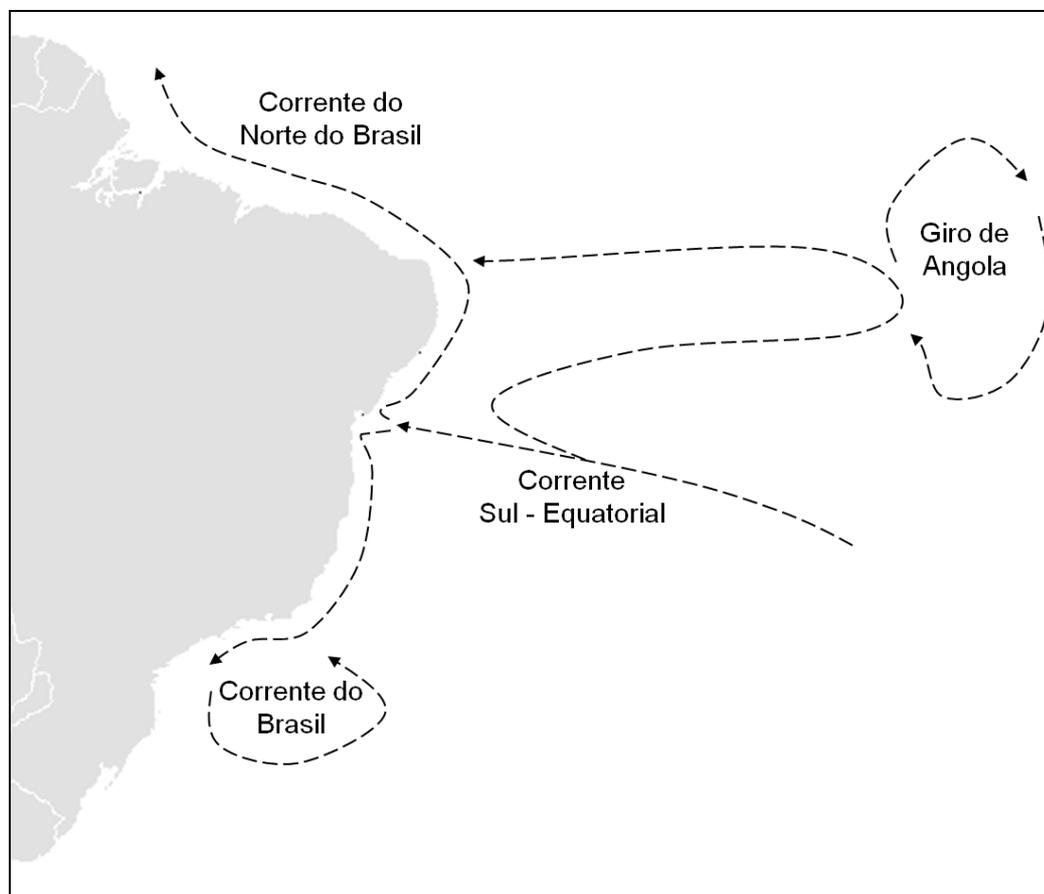


Figura 42 – Mapa com as principais correntes superficiais que chegam ao Brasil, adaptado de STRAMMA & ENGLAND (1999)

Também não foram encontradas evidências de isolamento por distância. Considerando que a dispersão desta espécie ocorre principalmente através de sua larva planctônica, é esperado que a dispersão siga o padrão das correntes marítimas superficiais (WHITE et al., 2010). A presença de correntes com sentidos opostos cria barreiras entre áreas aparentemente conectadas, fazendo com que indivíduos de localidades geograficamente próximas, mas em lados opostos das barreiras, possam apresentar níveis de diferenciação genética elevados (WHITE et al., 2010).

Em geral, as lagostas apresentam alta diversidade e baixa diferenciação populacional. Nos trabalhos mais recentes de genética de populações de espécies do gênero *Panulirus*, apenas um trabalho de alocimas com *P. interruptus* na península da Baja Califórnia, no México, encontrou uma diferenciação em três

populações (PEREZ-ENRIQUEZ et al., 2001). Porém, outro trabalho com a mesma espécie na mesma localidade, mas utilizando RFLP do DNA mitocondrial, não encontrou estruturação apesar da alta variabilidade encontrada (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2006). Os autores justificam a diferença encontrada na natureza dos marcadores, sugerindo que alguns *loci* de alozimas poderiam estar sob o efeito de seleção natural. Outros trabalhos que utilizaram DNA mitocondrial também não encontraram evidências de estruturação populacional em *P. japonicus*, no Japão (INOUE et al., 2007), e *P. inflatus*, na costa do pacífico do México (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2008).

Um trabalho mais recente com *P. cygnus*, na costa oeste da Austrália, usou a região 12S do DNA mitocondrial e microssatélites para analisar o efeito da pesca na diversidade de larvas destas lagostas, encontrando que, apesar da pressão pesqueira, não houve perda de diversidade em um período de 14 anos (KENNINGTON et al., 2013). Como nos outros trabalhos, não foi encontrada estruturação populacional em *P. cygnus*, porém, assim como com *P. inflatus*, foram obtidos sinais de expansão populacional recente (GARCÍA-RODRÍGUEZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2008; KENNINGTON et al., 2013).

Estudos com lagostas do gênero *Palinurus* mostraram resultados contrastantes: enquanto que a região controle mitocondrial de *Palinurus gilchristi* apresentou alta variabilidade, porém sem evidências de estruturação populacional na África do Sul (TOLLEY et al., 2005), as análises da região controle mitocondrial de *P. delagoae*, também altamente variável, mostraram uma profunda separação entre os indivíduos da formação rochosa de Walters Shoals e aqueles da costa sul-africana e uma leve diferenciação entre os indivíduos de Moçambique e os da África do Sul (GOPAL et al., 2006).

Estudos utilizando DNA mitocondrial e microssatélites da lagosta *Palinurus elephas*, que também apresenta período larval longo, detectaram estruturação genética separando indivíduos do Atlântico de indivíduos do Mediterrâneo (BABBUCCI et al., 2010; PALERO et al., 2008, 2011).

A alta variabilidade encontrada e os sinais de expansão populacional recente nas lagostas do gênero *Panulirus* pode dificultar a detecção de restrições

contemporâneas ao fluxo gênico. Isto ocorre principalmente porque populações que sofreram expansão recente não estão em equilíbrio e ainda apresentam muito polimorfismo ancestral (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; NEIGEL, 2002). Outro problema é a dificuldade em encontrar padrões de distribuição da variabilidade devido à presença excessiva de variação exclusiva (representada nas análises desta tese pelos *singletons* – haplótipos que apareceram apenas uma vez e, conseqüentemente, estão presentes em apenas uma localidade) e raridade de variação compartilhada. A presença de altos níveis de polimorfismo, mesmo na ausência de fluxo gênico, pode levar a uma diminuição artificial dos valores de F_{ST} (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). O índice de diversidade D de Jost, diferentemente do F_{ST} , mede a diversidade alélica e, assim, não é afetado pela alta taxa de mutação, funcionando bem como uma medida de diferenciação populacional, porém depende diretamente da variabilidade do *locus* analisado (WHITLOCK, 2011).

Apesar de não ter sido detectada uma subdivisão populacional de *P. cf. argus* em sua distribuição na costa brasileira, é possível que a espécie apresente um nível de fluxo gênico levemente reduzido entre o norte/nordeste e o sudeste, determinado principalmente pelas correntes marítimas superficiais que atuam na costa brasileira (Figura 42), conforme indicado nas análises de AMOVA com o gene da enzima Citocromo Oxidase I e com os microssatélites. A importância das correntes marítimas do Atlântico Sul na dispersão de larvas de longa duração já foi registrada a partir de modelos para *P. cf. argus* e para *P. echinatus*, demonstrando a força da Corrente do Norte do Brasil no transporte de larvas da costa nordeste/norte do Brasil (RUDORFF et al., 2009a, 2009b).

5.3 *Panulirus cf. argus* do Caribe

5.3.1 Diversidade genética e filogeografia

Assim como para *P. cf. argus* do Brasil, os dados da região controle mitocondrial e do gene da enzima Citocromo Oxidase I mostraram altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica para a espécie *P. cf. argus* do Caribe (RC: $h = 0,998$ e $\pi = 0,054$; COI: $h = 0,919$ e $\pi = 0,016$). Para ambos os marcadores, a diversidade nucleotídica foi muito maior do que a observada para a espécie brasileira ou para outras espécies do mesmo gênero (ver sessão 5.2.1). Uma alta diversidade também já foi encontrada em outros trabalhos com a mesma espécie (DINIZ; MACLEAN; OGAWA; CINTRA; et al., 2005; NARO-MACIEL et al., 2011; SARVER; SILBERMAN; WALSH, 1998; SILBERMAN; SARVER; WALSH, 1994).

Os altos valores do índice de diversidade para ambos os marcadores sugere uma mesma história evolutiva, uma população grande e estável com longa história evolutiva ou contato secundário entre linhagens diferentes (GRANT; BOWEN, 1998). Diferente de *P. cf. argus* do Brasil, para a espécie do Caribe ambos os marcadores RC e COI mostraram os indivíduos divididos em duas linhagens em suas redes de haplótipos, presentes em todas as localidades amostradas (Figuras 4.19 e 4.24). Ao avaliar a diversidade de cada linhagem separadamente, se manteve alta a diversidade haplotípica, porém a diversidade nucleotídica ficou mais baixa, no mesmo nível dos valores encontrados para a espécie do Brasil.

As duas linhagens continham os mesmos indivíduos para os dois marcadores, o que era esperado, já que ambos se encontram ligados, na mesma molécula de DNA mitocondrial. Nos dois casos a divergência foi maior do que a encontrada entre as linhagens da região controle de *P. cf. argus* do Brasil indicando neste caso uma divergência mais profunda, porém que não chega a ter valores compatíveis com aqueles observados entre espécies diferentes (distância máxima de 0,04).

A análise de distribuição das diferenças dos dois marcadores mostrou um padrão bimodal, compatível com a presença de duas linhagens e indicativo de separação com encontro secundário ou efeito gargalo seguido de expansão populacional, como já descrito na sessão 5.2.1 para *P. cf. argus* do Brasil. Ao analisar as linhagens separadamente, as duas apresentaram sinais de expansão demográfica e espacial para os dois marcadores. Diferentemente da espécie do Brasil, as duas linhagens de *P. cf. argus* do Caribe apresentam os mesmos tempos desde as expansões demográfica e espacial e entre expansões, para os dois marcadores, indicando que as duas linhagens aumentaram seu tamanho populacional e sua distribuição aproximadamente ao mesmo tempo. Ou seja, para esta espécie os quatro cenários indicados anteriormente para a formação das linhagens de *P. cf. argus* do Brasil seriam possíveis.

As análises de *extended bayesian skyline plot* mostraram um padrão semelhante entre marcadores para a linhagem A, com seu tempo de coalescência concordando com o tempo desde a expansão mais recente indicado pela análise de distribuição de diferenças. Segundo os resultados da análise de distribuição das diferenças e da análise de *extended bayesian skyline plot* (com exceção do gráfico da região controle da linhagem B), as duas linhagens passaram por processos de expansão demográfica e espacial simultâneos. Para a linhagem B, os tempos de expansão obtidos com o gene COI foram muito parecidos aos tempos da linhagem A, com uma expansão há aproximadamente 50 mil anos, o mesmo tempo obtido para a expansão da linhagem A da região controle mitocondrial de *P. cf. argus* do Brasil. Porém, com a região controle mitocondrial, a expansão da linhagem B começou muito antes da expansão da linhagem A, há aproximadamente 190 mil anos. Este é um resultado diferente do obtido com o gene COI, mas está dentro do intervalo de confiança do tempo de expansão obtido com a análise de distribuição das diferenças.

Os resultados obtidos não permitem definir se as linhagens se formaram a partir de um evento de vicariância ou se foram resultado de um efeito gargalo. Caso a primeira hipótese seja verdadeira, a separação em duas linhagens foi por um tempo suficiente para o acúmulo de diferenças na região controle e no gene COI. As

mesmas hipóteses sugeridas para a separação das linhagens da espécie do Brasil são válidas para *P. cf. argus* do Caribe, com exceção da primeira hipótese que sugere uma localidade de origem das linhagens externa ao Caribe, o que seria incompatível com a atual distribuição e hipótese de origem da espécie. Assim como na costra brasileira, na região do Caribe a plataforma continental é muito heterogênea, com variação de largura e profundidade, e com diversas cadeias de montanhas submarinas que poderiam emergir em caso de baixo nível do mar. A drástica alteração de ambiente provocaria mudanças na circulação de correntes, que são o principal meio de dispersão dessas lagostas, podendo provocar o isolamento de regiões e também a diminuição de habitat.

As taxas de mutação utilizadas para os cálculos de tempo desde a expansão seguiram o mesmo padrão das utilizadas para *Panulirus cf. argus* do Brasil, portanto estão no limite mínimo esperado para a taxa de mutação intraespecífica. Se seguirmos os tempos obtidos com as taxas utilizadas, a expansão das linhagens ocorreu a partir de 50 mil anos atrás, no período de oscilação do nível do mar do período interglacial que precedeu a último máximo glacial (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002). Considerando a distância média entre linhagens (RC = 10,6%, COI = 3,6%; K2P), elas divergiram há aproximadamente 0,95 – 1,3 milhão de anos, período que antecedeu a mudança na periodicidade dos ciclos climáticos de 800 mil anos atrás (LAMBECK; ESAT; POTTER, 2002).

NARO-MACIEL e colaboradores (2011), em seu trabalho com populações do norte do Caribe, Flórida, Bahamas, Turks e Caicos e Porto Rico, também encontraram as duas linhagens obtidas nesta tese com o gene COI e sugeriram que uma separação das linhagens ocorreu através de refúgios glaciais e que o contato secundário ocorreu junto à expansão durante o último máximo glacial. Apenas uma das linhagens (a linhagem equivalente à linhagem A desta tese) não apresentou valores significativos para o índice “*raggedness*” da análise de distribuição de diferenças. Porém, por um erro de interpretação de suas análises, os autores calcularam tempo de expansão apenas para a linhagem que rejeitou a hipótese nula de expansão (com valores significativos do índice “*raggedness*”), que seria a linhagem B desta tese, e utilizaram a taxa máxima de mutação para seu cálculo,

obtendo um tempo desde a expansão de 12 a 50 mil anos, compatível com o último máximo glacial.

5.3.2 Estrutura populacional

Assim como na espécie *Panulirus cf. argus* do Brasil, os resultados com as análises de microssatélites de *P. cf. argus* do Caribe não mostraram sinal da presença de duas linhagens. Assim como ocorreu com a espécie do Brasil, o registro de duas linhagens pode ser o resultado de um processo histórico que perdeu sinal em marcadores tão variáveis como os microssatélites. A característica clonal das linhagens mitocondriais faz com que polimorfismos ancestrais possam ser retidos por tempos mais longos, especialmente em populações de grande tamanho como é o caso das lagostas. No caso dos microssatélites o que existe é um processo de alta mutação que gera novos alelos que oscilam por deriva e que podem se recombinar. Isso faz com que sinais evolutivos mais antigos sejam facilmente apagados, de modo que o observado está mais relacionado com processos populacionais contemporâneos.

Os marcadores mitocondriais e os microssatélites não mostraram evidências fortes de estruturação populacional na espécie do Caribe. Os altos níveis de diversidade encontrados com os marcadores mitocondriais foram mantidos em todas as localidades e a maioria dos haplótipos compartilhados está distribuída em todas as regiões. Com a região controle mitocondrial e com o gene COI foram obtidos valores altos de F_{ST} entre a localidade da Venezuela e as localidades do norte do Caribe, porém nenhum valor foi significativo após correção de Bonferroni. Os altos valores de F_{ST} obtidos podem estar refletindo a diferença na proporção das linhagens entre a Venezuela e as outras localidades do Caribe. Esta diferença na proporção das linhagens pode ser um artefato da baixa amostragem da Venezuela (menos de 10 indivíduos).

As análises de SAMOVA mostraram diferentes agrupamentos significativos maximizando a variação entre grupos para cada marcador. Com a região controle, o melhor agrupamento foi o que separou praticamente todas as localidades amostradas, unindo apenas San Andrés com Cartagena, já com o gene COI o melhor agrupamento separou apenas as localidades da Venezuela e de La Guajira do resto das localidades. As hipóteses testadas com a AMOVA consideraram os estoques definidos pela FAO para o manejo da pesca de *P. argus* (COCHRANE; CHAKALALL, 2001; MEDLEY; VENEMA, 2001) e a possível restrição na dispersão de larvas pelas correntes marítimas da região (Figura 44). As hipóteses com maiores valores significativos para a separação do Caribe foram três estoques para a região controle: Norte (Bahamas, Florida, Cuba, Turks e Caicos e Porto Rico), Sul (Venezuela) e Centro sul(Colômbia); para o gene COI foram obtidas praticamente as mesmas áreas, com a adição da população do Centro Norte: Norte (Bahamas, Florida, Norte de Cuba, Turks e Caicos e Porto Rico), Sul (Venezuela), Centro Norte (Sul de Cuba) e Centro Sul (Colômbia) (Figura 43).

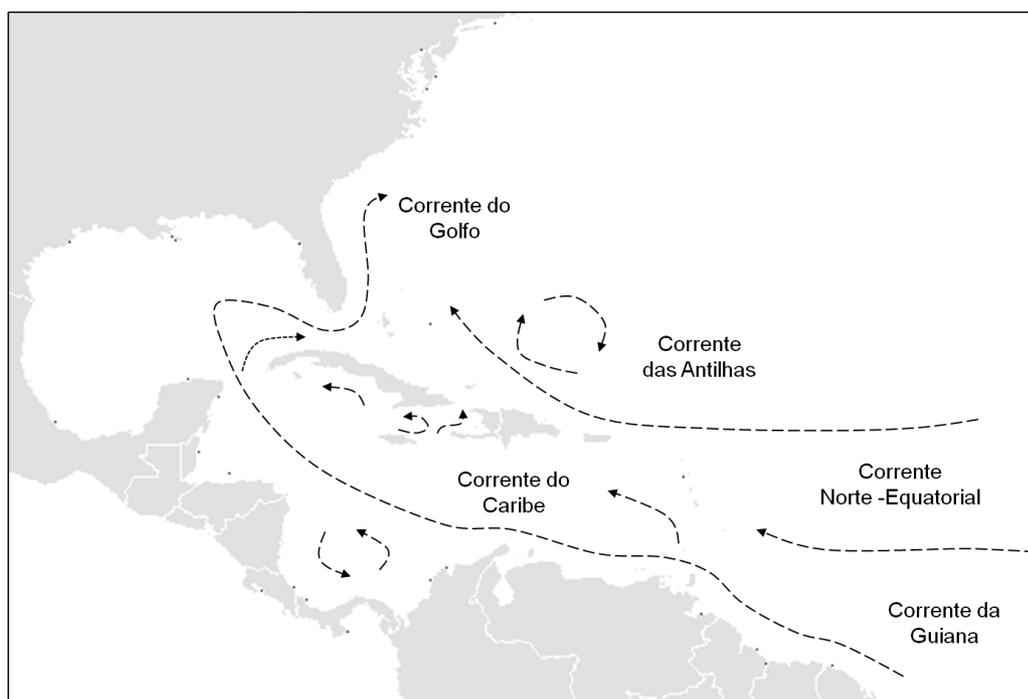


Figura 43 – Mapa com as principais correntes do Caribe adaptado a partir de MURPHY, HURLBURT & O'BRIEN (1999).

Tanto a análise molecular de variância, como a análise bayesiana de atribuição com os dados de microsatélites, ao contrário do observado com os resultados com os marcadores mitocondriais, não permitiram detectar estruturação populacional entre as duas localidades amostradas do Caribe (Colômbia e Cuba).

Também não houve indicativos de isolamento por distância. Considerando a geografia da América Central e o fluxo de correntes, não seria esperado que a divergência genética aumentasse com o aumento da distância geográfica (WHITE et al., 2010).

A espécie *P. cf. argus* do Caribe, assim como *P. cf. argus* do Brasil, não mostrou sofrer estruturação populacional nas análises com os microsatélites, porém o DNA mitocondrial indicou que pode existir alguma limitação ao fluxo gênico entre o lado interno e externo do Caribe. Os dois melhores cenários de estruturação obtidos com a AMOVA foram compatíveis com os estoques definidos pela FAO (Figura 44) e também com o estudo preliminar de TOURINHO (2009) que encontrou seis estoques (Dry Tortugas x Long Key x (Nicarágua, Belize) x Colômbia x Venezuela x (St. Eustatius, Porto Rico)). Porém, por se tratar de resultados obtidos apenas com o DNA mitocondrial, o sinal de estruturação encontrado pode ser fruto de uma separação histórica e não contemporânea.

SILBERMAN, SARVER & WALSH (1994), analisaram indivíduos de *P. cf. argus* de nove localidades do Caribe usando RFLP do DNA mitocondrial e, apesar de encontrarem duas linhagens, elas estavam presentes em todas as localidades amostradas, e não encontraram evidências de estruturação populacional. As mesmas linhagens foram encontradas com a região controle mitocondrial por DINIZ e colaboradores (2005), que sugeriram um perfil de estruturação populacional separando localidades ao norte (Florida, Belize, Nicarágua) de localidades ao sul (Porto Rico, St. Eustatius). Porém, aquele trabalho utilizou uma amostragem limitada e a estruturação encontrada pode ter sido um reflexo do uso de poucos indivíduos por localidade.

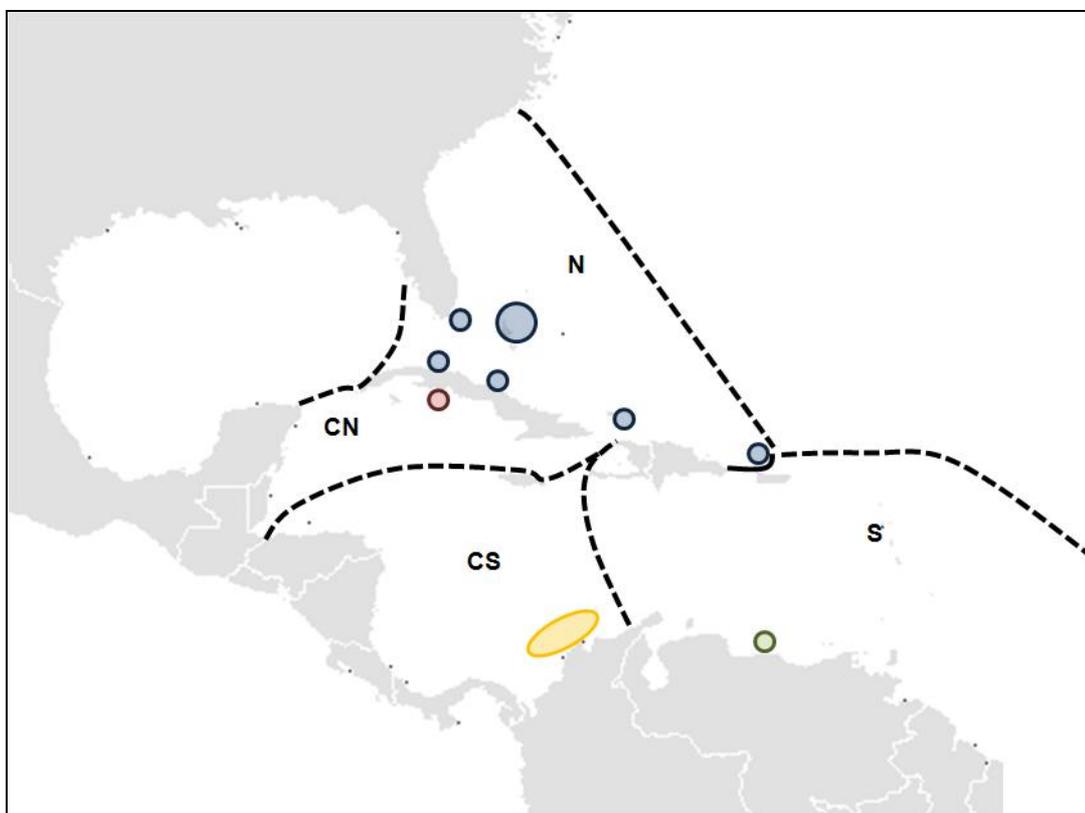


Figura 44 – Mapa com os estoques sugeridos pela FAO, delimitados com a linha tracejada, e com os estoques encontrados nesta tese, identificados pelos círculos de diferentes cores. N = Norte; S = Sul; CN = Centro Norte; CS = Centro Sul.

Um estudo mais recente utilizando a região controle e o gene da enzima Citocromo Oxidase I com amostras de *Panulirus cf. argus* da região do Atlântico ao norte do Caribe (Florida, Bahamas, Turks e Caicos e Porto Rico) mostrou a presença de duas linhagens, porém sem evidências de estruturação populacional (NARO-MACIEL et al., 2011).

Apesar de *P. cf. argus* possuir uma larva de longa duração, considerada responsável pela alta dispersão da espécie, estudos recentes mostraram que esta larva possui variações ontogenéticas de migração vertical (OVM) associadas à presença de luz e à profundidade que alteram com sua idade (BUTLER MJ et al., 2011). Estudos de laboratório mostraram que, a partir de 100 dias de idade, as larvas de *P. cf. argus* do Caribe tendem a aumentar de profundidade e, com isso, diminuem em muito sua mobilidade (BUTLER MJ et al., 2011). Modelamentos de

dispersão larval considerando o comportamento de OVM indicaram que aproximadamente 60% das larvas de *P. cf. argus* no Caribe se mantêm a 450 km de seu local de origem, mas 22,4% se estabelecem a uma distancia maior que 1000 km (BUTLER MJ et al., 2011). Este valor já seria o suficiente para garantir a homogeneidade genética na região. Porém, o comportamento de OVM das larvas de *P. cf. argus* do Caribe poderia explicar a diferenciação histórica, ainda que leve, dos indivíduos das localidades da Colômbia e do Sul de Cuba em relação às localidades mais externas, como Florida, Bahamas e Porto Rico, por serem locais sujeitos a turbilhonamentos, contra-correntes e correntes de Giro, que funcionam como uma força para auto recrutamento das larvas (BUTLER MJ et al., 2011; YEUNG; LEE, 2002; YEUNG et al., 2001). Uma fonte de deslocamentos que permitiria conexão de localidades próximas so efeito de diferentes correntes seriam as migrações realizadas por adultos da espécie (HERRNKIND; CUMMINGS, 1964), mas essas migrações são limitadas, duram de duas a três semanas, e envolvem principalmente deslocamentos sazonais, desencadeados por queda na temperatura da água e aumento da turbidez relacionados à primeira frente fria do outono na região do Caribe (HERRNKIND; MCLEAN, 1971; HERRNKIND, 1969; PHILLIPS, 2006).

5.4 Considerações finais e conservação dos recursos pesqueiros

As duas espécies estudadas apresentaram uma separação em duas linhagens amplamente distribuídas nas suas áreas de distribuição. As formações de duas linhagens nas duas espécies não ocorreram ao mesmo tempo, porém ocorreram durante o Pleistoceno. Os resultados desta tese sugerem que a formação de duas linhagens ocorreu através de um evento de vicariância seguido de contato secundário, sem descartar a hipótese de formação das duas linhagens por consequência de um gargalo populacional, principalmente para a espécie do Caribe.

De acordo com a estimativa de tempo de expansão, as linhagens da espécie do Brasil se expandiram em tempos diferentes: a linhagem B há 100 mil anos e a

linhagem A há 50 mil anos. Já as linhagens da espécie do Caribe se expandiram há aproximadamente 50 mil anos. Estas são as únicas espécies de lagostas espinhosas com registro de um padrão de diferentes linhagens simpátricas e homoganeamente distribuídas. Os resultados com os microssatélites não mostraram a mesma separação em linhagens, sugerindo que se trata de um evento histórico e não uma separação contemporânea.

Assim como outras espécies da família Palinuridae, *P. cf. argus* do Brasil e do Caribe não apresentaram subdivisão populacional definida com os marcadores utilizados. Uma pequena quantidade da variação observada pode ser explicada como variação entre grupos e, nos caso das duas espécies, estes grupos estão de acordo com os fluxos das correntes marítimas que atuam simultaneamente como barreira e estimulante da dispersão de larvas planctônicas de longa duração.

Para as duas espécies estudadas, os marcadores mais polimórficos e indicados para análise de estoques populacionais, os microssatélites, não mostraram evidências claras de subdivisão populacional. Estes resultados são indicativos de panmixia, porém, quando se trata de organismos intensamente explorados comercialmente, é importante levar em consideração outros fatores para demarcar estoques pesqueiros (WAPLES, 1998). Alguns migrantes por geração são o suficiente para garantir uma homogeneização genética, porém nem sempre seriam o suficiente para restabelecer uma população extinta por sobrepesca (WAPLES, 1998).

No caso de *P. cf. argus* do Brasil, esta informação é de extrema importância, pois a maior concentração de seus indivíduos se encontra na costa nordeste do Brasil, onde também se concentra o esforço de pesca (FONTELES FILHO, 2007). Apesar dos resultados desta tese não demonstrarem que há uma fragmentação da espécie em populações diferentes, foram obtidos sinais de restrição no fluxo gênico entre as regiões norte/nordeste e sudeste (sul da Bahia a São Paulo) através das análises de AMOVA com o gene da enzima Citocromo Oxidase I e com os microssatélites. Assim, uma estratégia importante para o manejo da pesca desta espécie seria monitorar de forma separada a pesca do norte/nordeste da pesca do sul da Bahia e Espírito Santo através do cálculo da quantidade de captura e

produtividade de maneira independente entre as regiões de forma a avaliar empiricamente a necessidade de um manejo diferenciado.

O manejo da pesca de *P. cf. argus* do Caribe é mais complicado por envolver muitos países diferentes, porém os resultados obtidos nesta tese com as análises de AMOVA dos marcadores mitocondriais estão de acordo e reforçam, geneticamente, os estoques de manejo definidos pela FAO (COCHRANE; CHAKALALL, 2001). Porém, a ausência de sinal de estruturação com os dados de microssatélites sugere que esta separação é histórica e que atualmente há panmixia na região do Caribe.

Devido ao alto nível de polimorfismo encontrado com os marcadores mitocondriais e a história demográfica que eles contaram, seria interessante fazer novas análises utilizando sequências de marcadores nucleares não codificantes para ver se o DNA nuclear compartilha a mesma história filogeográfica que o DNA mitocondrial e assim elucidar a história evolutiva das espécies. Uma análise com microssatélites de *P. cf. argus* do Caribe incluindo uma amostragem mais ampla, da parte continental e também dos dois lados das ilhas, permitiria uma avaliação mais detalhada do fluxo gênico na região.

Existe um registro de ocorrência de *P. argus* em Cabo Verde, podendo se tratar de ocupação ocasional ou mesmo uma população estabelecida (FREITAS; CASTRO, 2005) e seria interessante identificar a qual espécie esta população pertence, a do Caribe ou a do Brasil, e se existe ainda fluxo gênico entre a população de Cabo Verde e as outras localidades de distribuição da espécie.

6 CONCLUSÃO

Os indivíduos amostrados no Brasil pertencem a uma espécie diferente dos indivíduos amostrados no Caribe. Uma análise taxonômica detalhada deve ser realizada para definir qual espécie deve manter o binômio *Panulirus argus* e a descrição da nova espécie deve ser realizada.

Cada uma das duas espécies estudadas apresentou uma separação em duas linhagens evolutivas simpátricas e homogeneamente distribuídas. Estas linhagens representam um acontecimento histórico, e podem ser consequência de uma separação em refúgios durante os períodos de baixo nível do mar das eras glaciais do Pleistoceno com encontro secundário, ou de uma redução populacional drástica seguida de expansão.

A espécie *P. cf. argus* do Brasil não possui populações estruturadas em sua distribuição, contudo foi detectada uma restrição de fluxo gênico entre as regiões norte/nordeste e sudeste. Por se tratar de um recurso pesqueiro altamente explorado, para conservar *P. cf. argus* do Brasil em toda a área de distribuição da espécie, recomenda-se fazer um manejo considerando dois estoques: Pará à Bahia; Sul da Bahia a São Paulo.

A espécie *P. cf. argus* do Caribe não possui populações diferenciadas em sua distribuição. Porém, existem indícios de estruturação populacional histórica de *P. cf. argus* do Caribe entre a área interna do Caribe e a área externa às Ilhas, no Atlântico Central. Para conservar esta espécie como recurso pesqueiro, não é necessário, porém pode-se manter a separação dos estoques como sugerida pela FAO: Um estoque Norte, incluindo Florida, norte de Cuba, Bahamas e o lado do Atlântico das Ilhas até Porto Rico; Um estoque Sul incluindo o lado Atlântico das Ilhas ao sul de Porto Rico até a Venezuela; Um estoque Centro-Norte, incluindo sul de Cuba; E um estoque Centro-Sul, da Colômbia à Nicarágua incluindo sul da Jamaica.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C. N. K. et al. Why fishing magnifies fluctuations in fish abundance. **Nature**, v. 452, p. 835-839, 2008.

ARCE, A. M. et al. Artificial shelters (casitas) as habitats for juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* in the Mexican Caribbean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 158, p. 217-224, 1997.

ARCE, A. M.; LEON, M. Biology. **FAO Fisheries Report**, v. 619, p. 17-25, 2001.
ARIS-BROSOU, S.; EXCOFFIER, L. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on dna sequence polymorphism. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, p. 494-504, 1996.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2a. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, p. 3-15, 2009.

BABBUCCI, M. et al. Population structure, demographic history, and selective processes: contrasting evidences from mitochondrial and nuclear markers in the European spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, p. 1040-50, 2010.

BAISRE, J. A. Sobre los estadios larvales de la langosta común, *Panulirus argus*. In: **Contribución**. 19. ed. Centro de Investigaciones Pesqueras, 1964.

BALDWIN, J. D. et al. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, p. 399-407, 1998.

BALLOUX, F.; GOUDET, J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. **Molecular ecology**, v. 11, p. 771-783, 2002.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular ecology**, v. 11, p. 155-65, 2002.

BANDELT, H.-J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**1, v. 16, p. 37-48, 1999.

BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3754–3774, 2008.

BELKHIR, K. et al. **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Montpellier Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, 2004.

BERRILL, M. Gregarious behavior of juveniles of the spiny lobster, *Panulirus argus* (CRUSTACEA: DECAPODA). **Bulletin of Marine Science**, v. 25, p. 515-522, 1975.

BOOKE, H. E. The conundrum of the stock concept - are nature and nurture definable in fishery science? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, p. 1479-1480, 1981.

BOOKE, H. E. The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries. **Fisheries Research**, v. 43, p. 9-11, 1999.

BREMER, J. R. B. et al. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 36, p. 169-87, 2005.

BURTON, R. S. Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. **BioScience**, v. 59, p. 831-840, 2009.

BUTLER, M. J.; HERRNKIND, W. F.; HUNT, J. H. Factors affecting the recruitment of juvenile caribbean spiny lobsters dwelling in macroalgae. **Bulletin of Marine Science**, v. 61, p. 3-19, 1997.

BUTLER, M. J. et al. Behavior constrains the dispersal of long-lived spiny lobster larvae. **Marine Ecology Progress Series**, v. 422, p. 223-237, 2011.

CANNAS, R. et al. Discrimination between the Mediterranean spiny lobsters *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus* (Crustacea: Decapoda) by mitochondrial sequence analysis. **Hydrobiologia**, v. 557, p. 1-4, 2006.

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 326-350, 1994.

CARVALHO, G. R.; PITCHER, T. J. Editorial. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 269-271, 1994.

CASTRO, J. et al. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. **Aquaculture**, v. 242, p. 119-135, 2004.

CHAN, T.-Y. Annotated checklist of the world's marine lobsters (CRUSTACEA: DECAPODA: ASTACIDEA, GLYPHEIDEA, ACHELATA, POLYCHELIDA). **The Raffles Bulletin of Zoology**, v. 23, p. 153–181, 2010.

COCHRANE, K.; CHAKALALL, B. The spiny lobster fishery in the WECAFC region- an approach to responsible fisheries management. **Marine and Freshwater Research**, v. 52, p. 1623–1632, 2001.

COOMBS, J. A; LETCHER, B. H.; NISLOW, K. H. Create: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 578-580, 2008.

COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. **Annual Review of Marine Science**, v. 1, p. 443-466, 2009.

CRAWFORD, N. G. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 556-557, 2010.

CRUZ, R.; LUCKHURST, B.; MULLER, R. Review of larval recruitment patterns and variability in spiny lobster (*Panulirus argus*). **FAO Fisheries Report**, v. 619, p. 26-32, 2001.

DINIZ, F. M. et al. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 327-329, 2004.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; CINTRA, I. H. A. et al. The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 462-473, 2005.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; PATERSON, I. G. et al. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 637-641, 2005.

DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, v. 35, p. 753-763, 2008.

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2571-2581, 2002.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359-361, 2011.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EVANS, D.; GRAINGER, R. Gathering data for resource monitoring and fisheries management. In: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. (Eds.). **Handbook of fish biology and fisheries**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002. p. 84-102.

EXCOFFIER, L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 853-864, 2004.

EXCOFFIER, L.; HECKEL, G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 745-758, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, p. 564-7, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dna haplotypes: application to human mitochondrial dna restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FINDMODEL. Disponível em:
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>. 2012.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, p. 294-9, out. 1994.

FONTELES FILHO, A. A. Síntese sobre a lagosta-vermelha (*Panulirus argus*) e a lagosta-verde (*Panulirus laevicauda*) do Nordeste do Brasil. In: HAIMOVICI, M. (Ed.). **A prospecção pesqueira e abundância de estoques marinhos no Brasil nas décadas de 1960 a 1990: levantamento de dados e avaliação crítica**. Brasília: MMA/SMCQ, 2007. p. 23.

FORSTER, P. et al. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 18, p. 1864-1881, 2001.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da conservação**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 280

FREITAS, R.; CASTRO, M. Occurrence of *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (DECAPODA, PALINURIDAE) in the northwest islands of the Cape Verde archipelago (Central-East Atlantic). **Crustaceana**, v. 78, p. 1191-1201, 2005.

FU, Y. X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.

GALLO, J.; ROJAS, M.; CORREA, F. Aspectos sobre la biología y pesquerías de la langosta espinosa (*Panulirus argus*) en la República de Colombia. In: **Workshop on the Spiny Lobster Panulirus argus in the WECAFC area**. Reporte Nacional de Colombia, 1998.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4541–4550, 2009.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. J.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. **Marine Biology**, v. 148, p. 621-629, 2006.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. J.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Lack of genetic differentiation of blue spiny lobster *Panulirus inflatus* along the Pacific coast of Mexico inferred from mtDNA sequences. **Marine Ecology Progress Series**, v. 361, p. 203-212, 2008.

GEORGE, R. W.; MAIN, A. R. The evolution of spiny lobsters (PALINURIDAE): a study of evolution in the marine environment. **Evolution**, v. 21, p. 803-820, 1967.

GLAHOLT, R. D.; SEEB, J. Preliminary investigation into the origin of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804), population of Belize, Central America (DECAPODA, PALINURIDEA). **Crustaceana**, v. 62, p. 159-165, 1992.

GOPAL, K. et al. Mitochondrial DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the southwestern Indian Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 319, p. 191-198, 2006.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes : insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **The Journal of heredity**, v. 89, p. 415-426, 1998.

GROENEVELD, J. C. et al. Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (DECAPODA:PALINURIDAE) with hypotheses on speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 102-110, 2007.

GUSMÃO, J. et al. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**, v. 149, p. 491-502, 2006.

HANSEN, M. M.; KENCHINGTON, E.; NIELSEN, E. E. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. **Fish and Fisheries**, v. 2, p. 93-112, 2001.

HARDY, O. J. et al. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**, v. 163, p. 1467-82, 2003.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.

HATELEY, J. G.; SLEETER, T. D. A biochemical genetic investigation of spiny lobster (*Panulirus argus*) stock replenishment in bermuda. **Bulletin of Marine Science**, v. 52, p. 993-1006, 1993.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC evolutionary biology**, v. 8, p. 289, 2008.

HERRNKIND, W. F. Queuing behavior of spiny lobsters. **Science**, v. 164, p. 1425-1427, 1969.

HERRNKIND, W. F.; CUMMINGS, W. C. Single file migrations of the spiny lobster, *Panulirus argus* (Latreille). **Bulletin of Marine Science**, v. 14, p. 123-125, 1964.

HERRNKIND, W. F.; JERNAKOFF, P.; BUTLER, M. J. Puerulus and post-puerulus ecology. In: PHILLIPS, B. F.; COBB, J. S.; KITAKA, J. (Eds.). **Spiny lobster management**. Oxford, England: Fishing News Books, 1994. p. 213-229.

HERRNKIND, W. F.; MCLEAN, R. Field studies of homing, mass emigration, and orientation in the spiny lobster, *Panulirus argus*. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 188, p. 359-377, 1971.

HEWITT, G. M. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. **Molecular ecology**, v. 10, p. 537-49, 2001.

HOLTHUIS, L. B. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date. In: **FAO Species catalogue**, 1991.

HORNE, J. B. et al. High population connectivity across the Indo-Pacific: Congruent lack of phylogeographic structure in three reef fish congeners. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, p. 629-38, 2008.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007**. Brasília-DF, 2007.

ICZN. International Code of Zoological Nomenclature. **International Trust for Zoological Nomenclature**, Londres. 1999.

IGNACIO, B. L. et al. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (BIVALVIA:OSTREIDAE) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v. 136, p. 987-991, 2000.

IHSSEN, P. E. et al. Stock identification: Materials and methods. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, p. 1838-1855, 1981.

INOUE, N. et al. Population structure of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* inferred by nucleotide sequence analysis of mitochondrial COI gene. **Fisheries Science**, v. 73, p. 550-556, 2007.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, p. 1801-1906, 2007.

JOST, L. G(ST) and its relatives do not measure differentiation. **Molecular ecology**, v. 17, p. 4015-4026, 2008.

KENNINGTON, W. J. et al. Maintenance of genetic variation and panmixia in the commercially exploited western rock lobster (*Panulirus cygnus*). **Conservation Genetics**, v. 14, p. 115-124, 2013.

KIMURA, M.; OHTA, T. On some principles governing molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 2848-52, 1974.

KNOPPERS, B.; EKAU, W.; FIGUEIREDO, A. G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. **Geo-Marine Letters**, v. 19, p. 171-178, 1999.

KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2623-2635, 2002.

LAMBECK, K.; ESAT, T. M.; POTTER, E.-K. Links between climate and sea levels for the past three million years. **Nature**, v. 419, p. 199-206, 2002.

LAZOSKI, B. C.; KLAUTAU, S. M. Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. **Marine Biology**, p. 421-429, 2001.

LAZOSKI, C. et al. Genetic confirmation of the specific status of two sponges of the genus *Cinachyrella* (PORIFERA:DEMOSPONGIAE:SPIROPHORIDA) in the Southwest Atlantic. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 44, p. 299-305, 1999.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species : evolutionary history , limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197-212, 2011.

LEWIS, J. B. The phyllosoma larvae of the spiny lobster *Panulirus argus*. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v. 1, p. 89-103, 1951.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARX, J.; HERRNKIND, W. Factors regulating microhabitat use by young juvenile spiny lobsters, *Panulirus argus*: Food and shelter. **Journal of Crustacean Biology**, v. 5, p. 650-657, 1985.

MATSUMOTO, T. et al. Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. **Nucleic Acid Research**, v. 32, p. 6069-6077, 2004.

MATTHEE, C. A. et al. Mitochondrial DNA variation of the west-coast rock lobster, *Jasus lalandii*: marked genetic diversity differences among sampling sites. **Marine And Freshwater Research**, v. 58, p. 1130-1135, 2007.

MCMILLEN-JACKSON, A. L.; BERT, T. M. Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2895-2905, 2003.

MEDLEY, P.; VENEMA, S. Report on the FAO/DANIDA/CFRAMP/WECAFC Regional Workshops on the Assessment of the Caribbean Spiny Lobster (*Panulirus argus*). In: **FAO Fisheries report 619**. Roma, 2001.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda do litoral brasileiro: Anomura, Thalassinidea, Palinuridea e Astacidea**. São Paulo: Plêiade, 1999.

MENZIES, R. A.; KERRIGAN, J. M. Implications of spiny lobster recruitment patterns of the Caribbean - a biochemical genetic approach. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 31, p. 164-178, 1979.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, p. 1215, 1988.

MORA, M. S. et al. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (RODENTIA:CTENOMYIDAE): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. **Molecular ecology**, v. 16, p. 3453-3465, 2007.

MURPHY, S. J.; HURLBURT, H. E.; O'BRIEN, J. J. The connectivity of eddy variability in the Caribbean Sea, the Gulf of Mexico, and the Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 104, p. 1431, 1999.

NARO-MACIEL, E. et al. Mitochondrial DNA sequence variation in spiny lobsters: population expansion, panmixia, and divergence. **Marine Biology**, v. 158, p. 2027-2041, 2011.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Londres: Oxford Univ Press, 2000.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1-10, 1975.

NEIGEL, J. E. Is F_{ST} obsolete? **Conservation Genetics**, v. 3, p. 167-173, 2002.

NETO, J. D.; DORNELLES, L. D. C. **Diagnóstico da pesca marítima do Brasil**. Coleção Meio Ambiente, 1996.

NOONAN, B. P.; GAUCHER, P. Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog *Dendrobates tinctorius*. **Molecular ecology**, v. 15, p. 4425-35, 2006.

OGAWA, M. et al. Genetic variations in three species of spiny lobsters, *Panulirus argus*, *Panulirus laeviscauda* and *Panulirus japonicus*. **Revista de Investigaciones Marinas, Habana**, v. 12, p. 39-44, 1991.

OLIVEIRA, L. L. **Variabilidade gênica da região controle mitocondrial em lagostas (*Panulirus laevicauda*) do Nordeste Brasileiro**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas (Genética)) - UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

OLIVEIRA, M. E. G. C. et al. Genetic variation and population structure of two species of neo-tropical mud-mussels (*Mytella* spp). **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 197-202, 2005.

OVENDEN, J. Mitochondrial-DNA and marine stock assessment - a review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 41, p. 835-853, 1990.

PALERO, F. et al. Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 708-717, 2008.

PALERO, F.; CRANDALL, K. A. et al. Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, p. 152-162, 2009.

PALERO, F.; LOPES, J. et al. Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus* spp) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 263, 2009.

PALERO, F. et al. Genetic Diversity Levels in Fishery-Exploited Spiny Lobsters of the Genus *Palinurus* (DECAPODA:ACHELATA). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, p. 658-663, 2010.

PALERO, F. et al. Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 104, p. 407-418, 2011.

PALSBØLL, P. J.; BÉRUBÉ, M.; ALLENDORF, F. W. Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 11-16, 2007.

PATEK, S. N.; OAKLEY, T. H. Comparative tests of evolutionary trade-offs in a palinurid lobster acoustic system. **Evolution**, v. 57, p. 2082-2100, 2003.

PEREZ-ENRIQUEZ, R. et al. Population genetics of red spiny lobster (*Panulirus interruptus*) along the Baja California Peninsula, Mexico. **Marine And Freshwater Research**, v. 52, p. 1541-49, 2001.

PFENNINGER, M.; POSADA, D. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae , Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. **Evolution**, v. 56, p. 1776-1788, 2002.

PHILLIPS, B. F. **Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

PIGANEAU, G.; GARDNER, M.; EYRE-WALKER, A. A broad survey of recombination in animal mitochondria. **Molecular biology and evolution**, v. 21, p. 2319-25, 2004.

POLZIN, T.; DANESCHMAND, S. V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**, v. 31, p. 12-20, 2003.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST : testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. **Systematic Biology**, v. 50, p. 580-601, 2001.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PTACEK, M. B. et al. Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Panulirus* (DECAPODA:PALINURIDAE). **Marine and Freshwater Research**, v. 52, p. 1037-1048, 2001.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. Tracer v1.4, Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular biology and evolution**, v. 19, p. 2092-2100, 2002.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, p. 248-249, 1995.

ROGERS, A R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular biology and evolution**, v. 9, p. 552-69, 1992.

ROSENBERG, N. A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 137-138, 2003.

ROSENBERG, N. A.; NORDBORG, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Genetics**, v. 3, p. 380-390, 2002.

RUDORFF, C. A. G. et al. Modeling spiny lobster larval dispersion in the Tropical Atlantic. **Fisheries Research**, v. 96, p. 206–215, 2009a.

RUDORFF, C. A. G. et al. Application of remote sensing to the study of the pelagic spiny lobster larval transport in the Tropical Atlantic. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 57, p. 7-16, 2009b.

RYMAN, N. Conservation genetics considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology**, v. 39, p. 211-224, 1991.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARVER, S. K.; FRESHWATER, D. W.; WALSH, P. J. The occurrence of the provisional Brazilian subspecies of spiny lobster (*Panulirus argus westonii*) in Florida waters. **Fisheries Bulletin**, v. 98, p. 870-873, 2000.

SARVER, S. K.; SILBERMAN, J. D.; WALSH, P. J. Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida Spiny Lobster *Panulirus argus*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 18, p. 177-186, 1998.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SELKOE, K. A.; HENZLER, C. M.; GAINES, S. D. Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 363-377, 2008.

SIBENI, F.; CALDERINI, F. **FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis**. FAO - Fishery and Aquaculture Department, 2012.

SILBERMAN, J. D.; SARVER, S. K.; WALSH, P. J. Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**, v. 120, p. 601-608, 1994.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

STRAMMA, L.; ENGLAND, M. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 104, p. 20863-20833, 1999.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates, 2003.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-95, 1989.

TAJIMA, F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. **Genetics**, v. 143, p. 1457-1465, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THORPE, J. P.; SOLÉ-CAVA, A. M.; WATTS, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 165-184, 2000.

TOLLEY, K. et al. Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. **Marine Ecology Progress Series**, v. 297, p. 225-231, 2005.

TOURINHO, J. L. **Sistemática molecular da lagosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804)**. 80 p. Dissertação de Mestrado - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

TOURINHO, J. L.; SOLÉ-CAVA, A. M.; LAZOSKI, C. Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**, v. 159, p. 1897-1906, 2012.

TRINGALI, M. D.; SEYOUM, S.; SCHMITT, S. L. Ten di- and trinucleotide microsatellite loci in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, for studies of regional population connectivity. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 650-652, 2008.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VASCONCELLOS, A. V. **Diferenciação molecular de estoques de corvinas (*Micropogonias furnieri*) na costa Atlântica da América do Sul**. 203 p. Tese de Doutorado - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

VASCONCELLOS, A. V et al. Genetic and morphometric differences between yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*, Lutjanidae) populations of the tropical West Atlantic. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 308-316, 2008.

VOLOCH, C. M.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 254-257, 2005.

WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 438-450, 1998.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 191-201, 2000.

WARD, R. D. Genetics of Fish Populations In: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. (Eds.). **Handbook of fish biology and fisheries**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002. p. 200-224.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WHITE, C. et al. Ocean currents help explain population genetic structure. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 277, p. 1685-1694, 2010.

WHITLOCK, M. C. G'_{ST} and D do not replace F_{ST} . **Molecular ecology**, v. 20, p. 1083-1091, 2011.

WOOD, D. A; FISHER, R. N.; REEDER, T. W. Novel patterns of historical isolation, dispersal, and secondary contact across Baja California in the Rosy Boa (*Lichanura trivirgata*). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 46, p. 484-502, 2008.

XU, J. et al. Phylogeography of the mitten crab *Eriocheir sensu stricto* in East Asia: Pleistocene isolation, population expansion and secondary contact. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, p. 45-56, 2009.

YEUNG, C. et al. Influence of coastal eddies and counter-currents on the influx of spiny lobster, *Panulirus argus*, postlarvae into Florida Bay. **Marine and Freshwater Research**, v. 52, p. 1217–1232, 2001.

YEUNG, C.; LEE, T. N. Larval transport and retention of the spiny lobster, *Panulirus argus*, in the coastal zone of the Florida Keys, USA. **Fisheries Oceanography**, v. 11, p. 286-309, 2002.

APÊNDICE – Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*

Mar Biol (2012) 159:1897–1906
DOI 10.1007/s00227-012-1977-7

ORIGINAL PAPER

Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*

Julia L. Tourinho · Antonio M. Solé-Cava · Cristiano Lazoski

Received: 23 January 2012 / Accepted: 30 May 2012 / Published online: 13 June 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract *Panulirus argus* (Latreille in Ann Mus Hist Nat Paris 3:388–395, 1804) is the lobster of greatest economic importance throughout its distribution. In this study, mitochondrial (Cytochrome Oxidase I and 16S ribosomal genes) and nuclear (Adenine Nucleotide Transporter gene) sequences were used to evaluate the taxonomic status of *P. argus* sampled from five sites in the Caribbean Sea and nine sites in the Southwest Atlantic. Phylogenetic analyses indicate that lobsters from the two regions form two monophyletic groups with a molecular divergence similar to that observed between distinct congeneric lobster species and much larger than that found between conspecific lobster populations. Therefore, the Caribbean and the Southwest Atlantic lobster populations originally attributed to *P. argus* belong to different species, with an estimated time of isolation of around 16 Million years. An important consequence of these findings is that the fisheries of spiny lobsters from the Caribbean and the Southwest Atlantic species must be managed separately.

Introduction

The spiny lobster *P. argus* (Latreille 1804) occurs from North Carolina (USA) to Rio de Janeiro (Brazil) and supports valuable fisheries throughout its distribution, where it is the lobster of greatest economic importance (Holthuis

1991). Many studies have focused on the ecology, behaviour, physiology and fisheries of *P. argus* (McWilliam and Phillips 2007; Phillips and Melville-Smith 2006), with few papers regarding the genetic structure at specific sites throughout its distribution (Glaholt and Seeb 1992; Hateley and Sleeter 1993; Silberman et al. 1994; Sarver et al. 1998; Diniz et al. 2005; Naro-Maciel et al. 2011).

Large levels of genetic differentiation, based on few partial sequences of the mitochondrial 16S and cytochrome oxidase I (COI) genes, have been reported between individuals *P. argus* from five locations in the Caribbean and one location in Brazil (Sarver et al. 1998). This led the authors to suggest the provisional recognition of two subspecies: *P. argus argus*, representing populations from Venezuela to Bermuda and *P. argus westonii*, representing populations from Brazil. A similarly high divergence between the Caribbean and the Southwest Atlantic lobster populations was observed by Diniz et al. (2005), who used sequences from the control region of the mitochondrial DNA of *P. argus*, but no taxonomic conclusions were ventured by the authors. Those phylogenetic works were based only on parts of the mitochondrial genome so that, to date, no study has used nuclear markers to analyse the taxonomic status of *Panulirus* species from the Atlantic.

The absence of a definitive conclusion about the taxonomic status of the Caribbean and the Atlantic lobsters is harmful to the development of new research and to the understanding of lobster population dynamics, ecology and physiology. Until now, populations of *P. aff. argus* from the

two areas have been treated as a single species by all governments and international fisheries organisations. This could result, among other problems, in an overestimation of fishing stock size. The correct identification of fisheries species is fundamental for their management and conservation. This is particularly important for fisheries of spiny

Communicated by M. I. Taylor.

J. L. Tourinho · A. M. Solé-Cava · C. Lazoski (✉)
Laboratório de Biodiversidade Molecular,
Departamento de Genética, Instituto de Biologia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
RJ 21941-590, Brazil
e-mail: lazoski@acd.ufrj.br

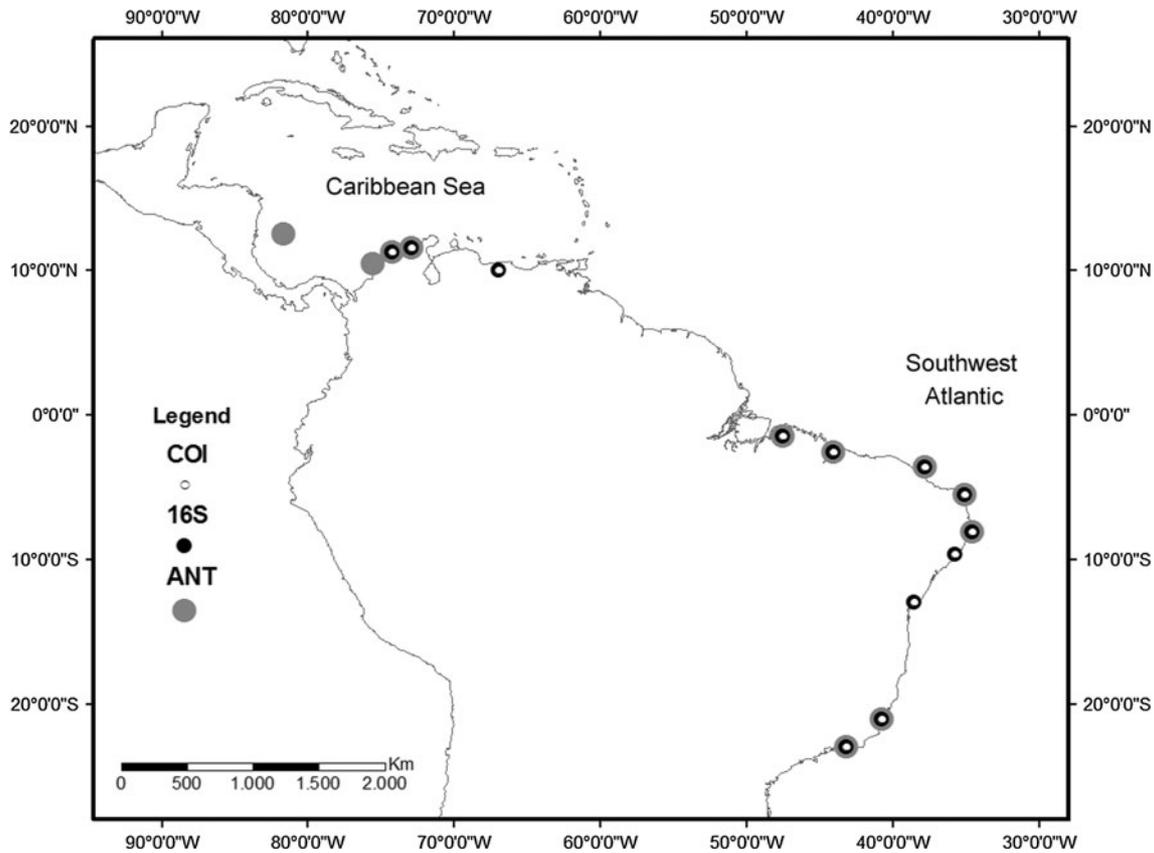


Fig. 1 *Panulirus aff. argus* sampling sites

lobsters where a high market value and limited management practices have resulted in its overexploitation in many producer countries, including Brazil, Colombia and Nicaragua (FAO 2011).

In this study, we use sequences of a nuclear gene (Adenine Nucleotide Transporter—ANT) and of two mitochondrial regions (cytochrome oxidase I—COI and large ribosomal subunit—16S) to demonstrate that *P. aff. argus* from the Caribbean and from the Southwest Atlantic belong to two different species, which diverged around 16 Million years (My) ago.

Materials and methods

Sampling

Individuals of *P. aff. argus* were obtained from local artisanal fisheries or bought fresh from local markets, where the collection site could be attested. Pereopod samples were collected from lobsters from five sites in the Caribbean: Caracas (Venezuela), San Andres, Cartagena, La Guajira and Santa Marta (Colombia); and from nine sites along 4,000 km of the Southwest Atlantic coast (Fig. 1; Table 1).

Table 1 Number of samples (*N*) and localities of *P. aff. argus* sequenced

Sample site	Abbrev.	<i>N</i>		
		COI	16S	ANT
Caribbean				
San Andres (Colombia)	SA	–	–	2
Cartagena (Colombia)	CT	–	–	3
La Guajira (Colombia)	LG	1	1	3
Santa Marta (Colombia)	SM	11	11	5
Caracas (Venezuela)	Ven	5	5	–
Brazil				
Belém (Pará)	PA	3	3	3
São José do Ribamar (Maranhão)	MA	1	1	1
Fortaleza (Ceará)	CE	5	5	2
Natal (Rio Grande do Norte)	RN	7	7	1
Recife (Pernambuco)	PE	2	2	1
Maceió (Alagoas)	AL	2	2	–
Salvador (Bahia)	BA	3	3	–
Marataízes (Espírito Santo)	ES	5	5	3
Rio de Janeiro (Rio de Janeiro)	RJ	1	1	1
Total		46	46	25

One individual of *P. echinatus* and two individuals of *P. laevicauda* were collected to be used as outgroups in the phylogenetic analyses.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was purified using a genomic DNA extraction kit (GE Life Sciences) according to the specifications of the manufacturer. Portions of two mitochondrial regions were amplified using primers: L-CO1490 (GCA ACG ATG ATT TTT CTC) and H-CO2198 (GCC TTT TGG GGC CTT GGG) for cytochrome oxidase I (COI) (Folmer et al. 1994); and 16Sar-L (GAT AAA ATA ACT TAA AAT TA) and 16Sbr-H (GCT TAA TCG AAC ACA CAG) for 16S (Palumbi et al. 1991). There are few nuclear markers available for decapods in the literature. The markers used so far are usually evolutionarily much conserved and, hence, only useful for phylogenetic studies of higher taxa. We tried to amplify different nuclear regions (like the ITS-1 and ITS-2 ribosomal spacers, introns of the extension factors EF1 and EF2 and of the ANT and GAPDH genes). The primers for the adenine nucleotide transporter (ANT; also known as ATP/ADP translocase) produced the best results in terms of amplification reliability and inter/intraspecific genetic differentiation ratios. The ANT gene is conserved enough to have regions for which primers that amplify across several families of decapods can be developed and presents an intron with variation levels compatible with intra-familial molecular systematic studies (Teske and Beheregaray 2009). A portion of the ANT nuclear gene was amplified using primers DecapANT-F (CCT CTT GAY TTC GCK CGA AC) and DecapANT-R (TCA TCA TGC GCC TAC GCA C) (Teske and Beheregaray 2009). PCR reactions were set up using 1 unit of Taq polymerase (GE Life Sciences), 0.2 mM of each dNTP, 0.3 M of each primer, 2.5 mM of MgCl₂, 2.5 L of PCR buffer (10X) and 1 L of DNA (10–100 ng) as a template in a final volume of 25 L. The thermocycling conditions for the mitochondrial regions were one initial cycle of 4 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 50 s each at 94, 50 and 72 °C, and one final extension step of 5 min at 72 °C. For the nuclear gene, the annealing temperature was 57 °C. Negative controls (without DNA template) were used in all PCR reactions. Both strands of PCR products were purified with an ExoSAP-IT purification kit (USB) and were sequenced in an ABI 3500 automatic sequencer with the same sets of primers used for the PCR.

Phylogenetic analyses

The DNA sequences obtained were edited with SEQMAN 7.0 (DNASTAR Inc.) and aligned with the CLUSTALW (Thompson et al. 1994) algorithm present on MEGA 5.0

(Tamura et al. 2011). The Kimura 2-parameter (K2P; Kimura 1980) distance model was used on MEGA 5.0 to estimate nucleotide divergences. All sequences obtained were deposited in GenBank (Accession Numbers ANT: sequences 1–6, JQ412160 to JQ412165; 16S: Haplotypes 1–14, GU475989 to GU475995, JQ412152 to JQ412158; COI: Haplotypes 1–26, GU476034 to GU476055, JQ412167 to JQ412170; *P. echinatus*, 16S: JQ412159; COI: JQ412171; *P. laevicauda*, ANT: JQ412166). The program PHASE 2.1 (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005) was used to identify alleles of heterozygote sequences found in the ANT gene.

Estimates of sequence polymorphism were obtained through DNASP 5 (Librado and Rozas 2009). For Maximum Likelihood and Bayesian analyses, the COI and 16S sequences were combined as one dataset with two different matrices using the program MESQUITE 2.6 (Maddison and Maddison 2009). The Maximum Likelihood algorithm of MEGA 5.0 was used to obtain the best nucleotide substitution model through the estimation of the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) score. All analyses were done using the nucleotide evolution model available that closely resembled the one indicated by MEGA 5.0. For the COI-16S combined dataset, the HKY model (Hasegawa et al. 1985) with estimates of invariable sites (I) and gamma distribution (G) was used, and for the ANT gene dataset, the F81 model was used (Felsenstein 1981).

The Maximum Likelihood analysis was performed with the program PHYML (Guindon and Gascuel 2003) using default parameters and 1,000 Bootstrap branch support replicates. The Bayesian analysis was carried out using MR. BAYES (Huelsenbeck and Ronquist 2001), allowing the program to estimate parameters for each gene partition. Bayesian posterior probabilities (BPP) were obtained by performing two separate runs with four Markov chains. Each run was conducted for 10 million generations, sampled every 1,000 generations. A consensus tree was calculated after excluding the first 25 % of the iterations as burn-in.

Divergence time estimation

To infer the divergence time between the individuals of *P. aff. argus* from the Caribbean and from the Southwest Atlantic, we used sequences of the COI gene obtained in this work together with sequences from other species of the Palinuridae and Synaxidae family retrieved from GenBank (Table 2). This analysis was performed using BEAST 1.6.1 (Drummond and Rambaut 2007), with a Bayesian relaxed-clock uncorrelated lognormal approach with estimated rate, the HKY model of sequence evolution and a Yule process for the tree prior. Each genus was determined as a monophyletic group, and a calibration was set on the *Palinurus*,

Table 2 List of species of Palinuridae used, with GenBank accession number and bibliographic reference (Ref)

Species	COI	Ref
<i>Panulirus cygnus</i>	AF339453	1
<i>Panulirus gracilis</i>	AF339455	1
<i>Panulirus guttatus</i>	AF339456	1
<i>Panulirus homarus</i>	FJ174963	2
<i>Panulirus h. homarus</i>	AF339457	1
<i>Panulirus h. megasculpta</i>	AF339458	1
<i>Panulirus inXatus</i>	AF339459	1
<i>Panulirus interruptus</i>	AF339460	1
<i>Panulirus japonicus</i>	AF339461	1
<i>Panulirus laevicauda</i>	AF339462	1
<i>Panulirus marginatus</i>	AF339465	1
<i>Panulirus ornatus</i>	AF339467	1
<i>Panulirus pascuensis</i>	AF339466	1
<i>Panulirus penicillatus</i>	AF339468	1
<i>Panulirus polyphagus</i>	AF339469	1
<i>Panulirus regius</i>	AF339470	1
<i>Panulirus stimpsoni</i>	AF339471	1
<i>Panulirus versicolor</i>	AF339472	1
<i>Jasus caveorum</i>	AF192878	3
<i>Jasus edwardsii</i>	AF339473; FJ174951	1, 2
<i>Jasus paulensis</i>	AF192879	3
<i>Jasus frontalis</i>	AF192880	3
<i>Jasus tristani</i>	AF192881	3
<i>Jasus lalandii</i>	AF192882	3
<i>Jasus verreauxi</i>	FJ174952	2
<i>Palinurus delagoae</i>	FJ174958	2
<i>Palinurus gilchristi</i>	FJ174961	2
<i>Palinurus charlestoni</i>	FJ174959	2
<i>Palinurus elephas</i>	FJ174956	2
<i>Palinurus mauritanicus</i>	FJ174957	2
<i>Palinurus barbarae</i>	FJ174960	2
<i>Palibythus magniWcus</i>	FJ174955	2
<i>Puerulus angulatus</i>	HQ241554	4

1. Ptacek et al. (2001), 2. Palero et al. (2009), 3. Ovenden et al. (1997), 4. Boisselier-Dubayle et al. (2010)

Panulirus, *Puerulus* and *Palibythus* group using a lognormal distribution based on fossil evidence of *Palinurus palaciosi* (110–125 My; Vega et al. 2006) and *Panulirus destombesi* (99–112 My; Garassino and Breton 2010). The genus *Palibythus* was included in the Palinuridae family as indicated by a recent phylogenetic study (Tsang et al. 2009). A mean substitution rate was set using a normal distribution with 0.024 mean and standard deviation of 0.002. Markov-Chain Monte Carlo (MCMC) simulations were run for 80 million generations, with the first 10 % discarded as burn-in and the lower and upper bounds of the 95 % highest posterior density (HPD) interval obtained for every node.

Results

DNA polymorphism

Aligned lengths of sequences of 46 individuals were 658 bp of cytochrome oxidase I and 524 bp of 16S. For the ANT gene, 490 bp were sequenced in 25 individuals (Table 1). The average transition/transversion ratio was 2.4 for COI and 1.7 for 16S sequences. The COI gene was the most variable, and the ANT gene was the least variable in the individuals analysed (Table 3).

Phylogenetic analyses

Indels were found only on 16S sequence alignment and were removed before analyses. Sequences from two individuals of *P. laevicauda* were used as outgroups, together with sequences from two species of the family Scyllaridae, *Thenus orientalis* and *Ibacus orientalis*, retrieved from GenBank.

With the COI-16S dataset, trees with similar topologies were retrieved for both phylogenetic approaches, and hence, only the Maximum Likelihood tree is shown with both bootstrap and BPP values included (Fig. 2). *P. aV. argus* from the Southwest Atlantic and from the Caribbean formed reciprocally monophyletic groups that diverged (distance corrected with Kimura 2-parameter model) between 10.2 and 11.4 % for the combined mitochondrial set (14.4–17.8 % for COI and 5.0–5.8 % for 16S). The COI genetic divergence values were similar to those observed between other species of *Panulirus* (13.7–36.1 %) and congeneric species of other genera of the Palinuridae (4.3–24.3 %).

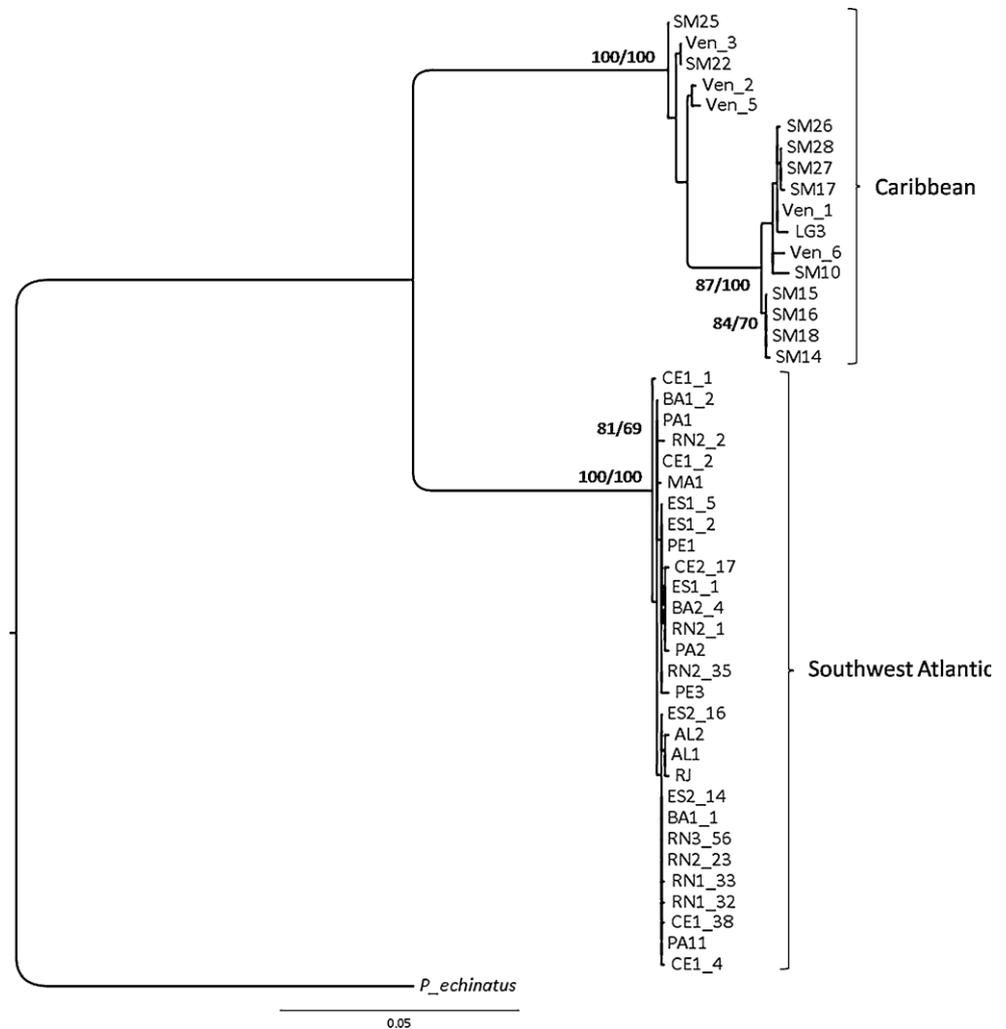
The ANT gene presented only seven polymorphic sites, of which three were diagnostic between the Caribbean and the Southwest Atlantic regions, two were polymorphic within the Caribbean population and two were mutations of the same allele present only in the Southwest Atlantic in seven homozygote and four heterozygote individuals. The resulting phylogenetic trees retrieved from Maximum Like-

Table 3 *Panulirus aV. argus* sequences analysed

Gene	<i>N</i>	Hap	<i>n</i>	A:T:C:G	<i>S</i>	<i>P</i>	<i>h</i>	
ANT	25	6	490	26:33:18:23	7	5	0.006	0.760
16S	46	14	524	30:34:15:21	33	29	0.025	0.651
COI	46	26	658	24:31:24:21	112	101	0.068	0.957

N number of sequences produced, *Hap* number of haplotypes, *n* mean number of nucleotides in the global alignment (indels not considered), A:T:C:G average nucleotide proportions, *S* number of polymorphic sites, *P* number of parsimony-informative sites, nucleotide diversity, *h* haplotype diversity

Fig. 2 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on the COI-16S concatenated sequences of *P. aV. argus*. The bootstrap and posterior probability values are indicated only for the nodes with over 70 % support for the analysis of Maximum Likelihood (1,000 replicates) and the Bayesian inference (100 replicates), respectively. Tree was rooted using *P. echinatus* as an outgroup



likelihood and Bayesian inference had very few topological differences in the Caribbean group, and the individuals from Southwest Atlantic formed a monophyletic group in both analyses (Fig. 3). The few differences disappeared when only *P. laevicauda* was used as an outgroup, probably because the two other outgroup species were too divergent, which led to a very large number of indels in the alignments. The phylogeny retrieved from analyses with the nuclear gene agreed with the mitochondrial results (Figs. 2 and 3). The divergence estimated between individuals of *P. aff. argus* from the Caribbean and from the Southwest Atlantic was similar to that observed between other species of *Panulirus* (Fig. 4) and much higher than the variation found within each region.

Divergence time

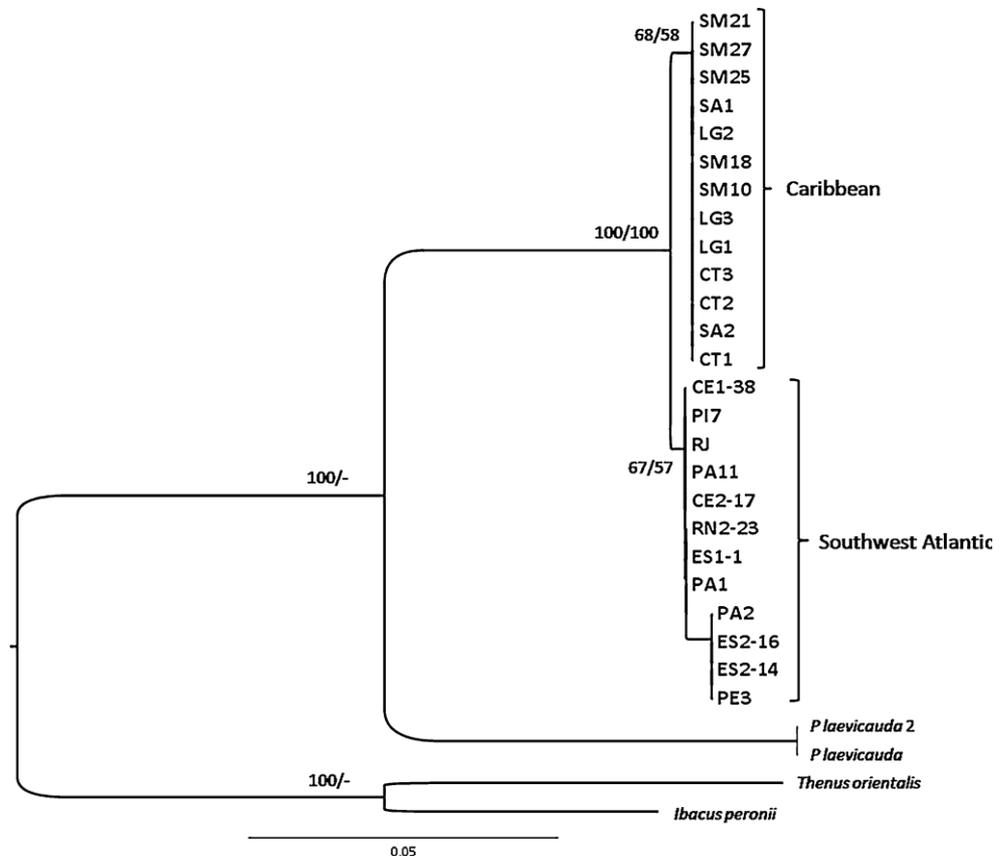
The phylogeny analyses show *P. aff. argus* as a monophyletic group with a clear separation between the Caribbean

and the Southwest Atlantic clades (Fig. 4), which diverged around 16 Million Years ago (My) (95 % HPD 8.4–26.1 My). The divergence time between species of the genus *Panulirus* varied from 4.7 My (95 % HPD 0.6–11.1 My), between *P. echinatus* and *P. penicillatus* to 32.3 My, which is the age of the most recent common ancestor of the *Panulirus* genus (95 % HPD 16.8–54.4 My).

Discussion

The analyses of both nuclear and mitochondrial sequences clearly show that the Caribbean and the Southwest Atlantic populations originally attributed to *Panulirus argus* belong to different species. The two groups formed reciprocally monophyletic clades irrespective of geographical distance. Furthermore, the high divergence found with mitochondrial genes between the Caribbean and the Southwest Atlantic clades (K2P around 16 % for COI and 5.5 % for 16S) was

Fig. 3 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on ANT sequences of *P. aff. argus*. The Maximum Likelihood analysis (1,000 replicates) and the Bayesian inference (100 replicates) bootstrap and posterior probability values, respectively, are indicated only for the nodes with over 50 % support. *P. laevicauda*, *Ibacus peronii* and *Thenus orientalis* were used as outgroups for the ML analysis. Bayesian inference used only *P. laevicauda* as an outgroup (see text)

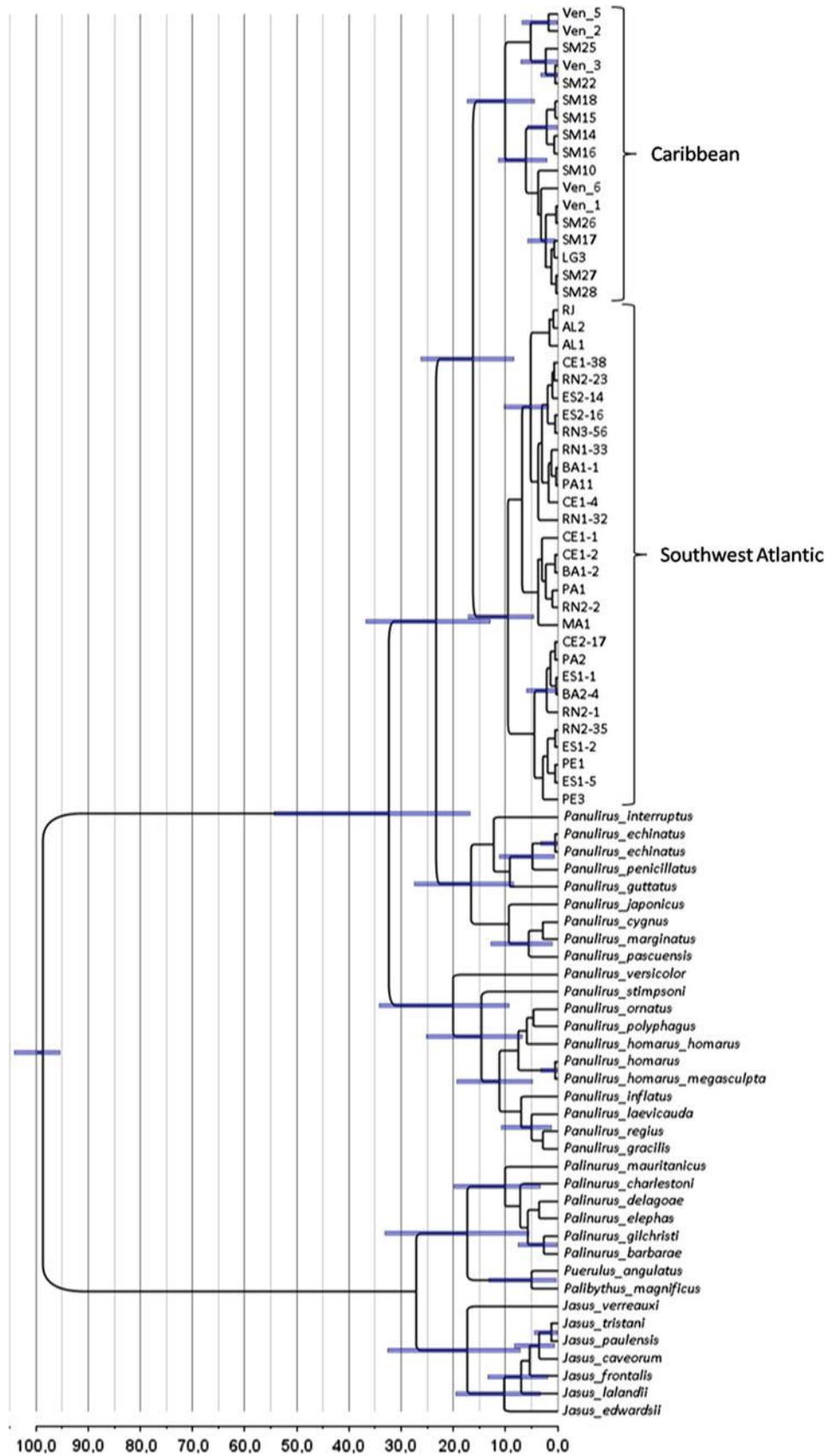


similar to that observed between distinct congeneric species and much larger than that found between conspecific lobster populations. Within the genus *Panulirus*, the interspecific divergence levels vary between 10 and 32 % for COI (Ptacek et al. 2001; Cannas et al. 2006; Naro-Maciél et al. 2011) and between 3 and 19 % for the 16S sequences (Sarver et al. 1998; Ptacek et al. 2001). Mean interspecific levels of gene divergence within the genus in combined analysis of the 16S and COI genes were of about 8 % (Groeneveld et al. 2007), which is similar to the 10 % observed between concatenated sequences of the Caribbean and the Southwest Atlantic *P. aff. argus*.

The levels of genetic divergence observed for the ANT gene were smaller between the Caribbean and the Southwest Atlantic *Panulirus* (>> 1 % K2P) than those observed between congeneric species of *Halicarcinus* and *Hymenosoma* crabs (Teske and Beheregaray 2009). Using similar areas of the sequence, which included introns and exons, the divergence between *Halicarcinus cookie* and *H. varius* varied between 1.2 and 5 %, and between *Hymenosoma geometricum* and *Hymenosoma* sp., it varied between 2.1 and 7 %. However, even though the calculated divergence between the Caribbean and the Southwest Atlantic was not very high, the polymorphisms found were specific to each region, once again indicating absence of gene flow between the two areas.

In addition to the fixed genetic differences, the Caribbean and the Southwest Atlantic *P. aff. argus* also present consistent morphological differences, recognised by workers of the fishing industry (Sarver et al. 1998) but discarded as intraspecific variation by most taxonomists to date. The Caribbean species presents a darker red colour with deeper grooves in the cephalothorax region and a pattern of dorso-abdominal spots more characteristic of the species description, whereas the Southwest Atlantic species has a lighter colour and shallow grooves in the carapace, with a higher concentration of smaller abdominal spots. The Southwest Atlantic species also has a distinct colouration pattern of the pereopods and the pleopods. The former have segments striped longitudinally in the Caribbean species, whereas, in the Southwest Atlantic, the segments have purple stains. The pleopods of the Caribbean species are yellow and black, with the black colour of the three Wrst segments forming a falcate discontinued shape, while in the Southwest species the black colour of all pleopods follows their ovate shape. Although colouration is usually considered of limited use in taxonomic studies, among other things because it is easily lost by traditional methods of preservation, it is a character used for the identification of other *Panulirus* species (Holthuis 1991) and has been successfully used to distinguish cryptic decapod species (Berry 1974; Bruce 1975; Knowlton 1986).

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the COI sequences of Palinuridae species dating divergence among taxa with a relaxed-clock model



A high level of genetic divergence has already been reported by Sarver et al. (1998) between individuals of *P. argus* from the Caribbean and from the Southwest Atlantic (20 % for COI and 8 % for 16S), but their analyses were based on a reduced sample of the Southwest Atlantic coast (in the case of COI, only one sequence from each region was used). The authors suggested that lobsters from the two regions be given subspecific status (*P. argus argus* for the Caribbean individuals and *P. argus westonii* for the Southwest Atlantic ones), but no formal description was made. The same happened in the analysis of Diniz et al. (2005), who found a large divergence (control region; K2P up to 38 %) between the Caribbean and the Southwest Atlantic spiny lobsters, but who did not make any taxonomic inference from their results, again because few individuals ($N = 5$, from two locations only) from Southwest Atlantic had been sampled.

All factors discussed here contribute to a re-evaluation of the taxonomic status of *P. argus* and the acknowledgment of a new species. According to Latreille (1804), the type locality could be the Antilles (“Je la soupçonne des Grandes Indes”), but Lamarck (1818) stated that Latreille really intended Brazil as the type locality. Based on that confusion, the type locality of *P. argus* has been classified as “unknown” (Holthuis 1991). Although a holotype was not designated for the species, possible syntypes from the “Antilles” were deposited at the Paris Museum of Natural History, which suggests that the binomial *P. argus* should be used for the Caribbean species (Holthuis 1991). It is important therefore that analyses of all syntypes, of samples from both species from multiple localities and of the holotypes of other species now in synonymy (e.g. *Palinurus americanus*, *P. ricordi*), be performed to verify if any of the given names can be reassigned. Since Sarver et al. (1998) did not describe the two subspecies they named nor did they present drawings or assigned types for either subspecies (Chan 2010), the names suggested by them (*P. argus argus* and *P. argus westonii*) are not formalised and must be considered *nomina nuda* (Chapter 4, Article 13 of the International Code for Zoological Nomenclature; ICZN 1999; Chan 2010). Hence, we suggest that the binomial *P. argus* be used for the Caribbean species, whereas the Southwest Atlantic species should be called *Panulirus* sp., until it is formally described. A detailed morphological taxonomic analysis is being done and will be published elsewhere.

In the present work, the two species were not found co-occurring in any of the sampling sites. However, there are anecdotal indications of the occasional capture of lobsters with the diagnostic colouration pattern of *P. argus* by industrial fishing boats off the coast of Ceará State, in Northeast Brazil. The southern limit of the distribution of *Panulirus* sp. on the Brazilian coast is Rio de Janeiro

(20°S), and the northern limit of *P. argus* is North Carolina (35°N). We found *Panulirus* sp. along the coast up to 2°S (Pará State) and *P. argus* down to 8°N (Venezuela). *P. argus* is not cited in the area between parallels 8°N and 2°S (for a fisheries faunal list of the French Guyana, see Guéguen 2000; for Suriname, see FAO 2008; Holthuis 1959). This does not mean that the species is absent, but indicates that, if anything, it is rare in the area. It would be interesting to analyse samples from the Guyanas and Suriname if they are found, to verify where the limit of the two species may be and whether they occur in sympatry in those areas. Silberman et al. (1994), analysed restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of mitochondrial genomes of 259 Caribbean lobsters, and registered the occurrence of three more divergent RFLP patterns, two from Florida and one from Venezuela. Those three individuals were genetically identified by Sarver et al. (2000) as belonging to the Southwest Atlantic *Panulirus* sp. (“*P. argus westonii*” in their paper). The presence of individuals bearing *Panulirus* sp. mitochondrial DNA in Florida may be related to introgression or to the presence of recruits resulting from long-range natural or anthropogenic dispersal. Occasional individuals of *P. aff. argus* have been found in West Africa (Holthuis 1991), and Freitas and Castro (2005) reported the presence of *P. cf. argus* in Cape Verde. In both cases, intentional or accidental (possibly through ballast water) anthropogenic transport was suggested as the source of the introductions, but none of the introductions resulted in the establishment of local populations.

The high genetic differentiation between the Caribbean and the Southwest Atlantic lobsters has been explained as the result of the outflow of the Amazon River in the Atlantic Ocean (Sarver et al. 1998; George 2005). According to geological records, the deposition of sediment and freshwater by the Amazon River started at the end of the uplift of the Andes mountains, which inverted the river flow towards the Atlantic Ocean at the beginning of late Miocene, around 10 My (Hoorn 1993, 1996; Hoorn et al. 1995; Potter 1997; Campbell Jr et al. 2006). Currently, the Amazon River discharges about one-fifth of the world’s freshwater runoff into the Atlantic (Curtin 1986a, b), which causes an alteration of salinity and sediment discharge up to 500-km seaward and 30-m depth (Rocha 2003). The divergence time estimated here between the mitochondrial DNA sequences of the Caribbean *P. argus* and the Southwest Atlantic *Panulirus* sp. was of 16 My, which is earlier, but not incompatible considering confidence intervals (8.4 to 26.1 My), with the beginning of the Amazon outflow. During the Miocene (23 to 5 My), the Atlantic Ocean suffered many oceanographic changes, including the formation of a thermocline as a consequence of the ice build-up on Antarctica (Berger 2011). These changes may have helped initiate the speciation process that would later be completed with the formation of a

barrier of low salinity water by the outflow of the Amazon River.

The obvious implication of the results of this paper is that spiny lobster fisheries will have to be managed separately for the Caribbean and the Southwest Atlantic species. The possible presence of Southwest Atlantic *Panulirus* sp. in Florida should be further investigated, including analyses of mitochondrial and nuclear genes to verify if the samples result from current migration or past introgression. The occasional presence of *P. aff. argus* in Africa is also puzzling, and it would be interesting to genetically verify whether those lobsters belonged to the Caribbean or the Southwest Atlantic species to help formulate hypotheses on their origin.

Acknowledgments We thank D. Almeida, E. Araujo, L. Barbosa, P. Coelho Filho, H. Cunha, M.C.O. Matos, N. Leite Jr., F. Magalhães, R. Monteiro, M.C. Ostrowski, P. Paiva, A. Reis, G. Rey, E. Rios, E. Routledge, and S. Ribeiro for help with sample collections. We also thank S.K. Sarver and J. Gusmão for suggestions on an early version of the manuscript and C. Schrago for helping with the Bayesian divergence time analysis. This paper was made possible by grants from the Brazilian Ministries for Fisheries and Aquaculture (MPA) and Science, Technology and Innovation (MCTI), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). This work is part of the MSc thesis of JLT.

References

- Berger WH (2011) Geologist at sea: aspects of ocean history. *Ann Rev Mar Sci* 3:1–34
- Berry PF (1974) A revision of the *Panulirus homarus*-group of spiny lobsters (Decapoda, Palinuridae). *Crustaceana* 27:31–42
- Boisselier-Dubayle MC, Bonillo C, Cruaud C, Couloux A, Richer de Forges B, Vidal N (2010) The phylogenetic position of the “living fossils” *Neoglyphe* and *Laurentaeglyphe* (Decapoda: Glypheidea). *C R Biol* 333:755–759
- Bruce AJ (1975) Coral reef shrimps and their color patterns. *Endeavour* 34:23–27
- Campbell KE Jr, Frailey CD, Romero-Pittman L (2006) The Pan-Amazonian Ucayali Plain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 239:166–219
- Cannas R, Cau A, Deiana AM, Salvadori S, Tagliavini J (2006) Discrimination between the Mediterranean spiny lobsters *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus* (Crustacea: Decapoda) by mitochondrial sequence analysis. In: Thessalou-Legaki M (ed) *Issues of Decapod Crustacean Biology*. *Hydrobiologia* 557:1–4
- Chan TY (2010) Annotated checklist of the world’s marine lobsters (Crustacea: Decapoda: Astacidea, Glypheidea, Achelata, Polychelida). *RaZes Bull Zool* 23:153–181
- Curtin TB (1986a) Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge. 2. Water masses. *Cont Shelf Res* 6:53–71
- Curtin TB (1986b) Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge. 3. Currents. *Cont Shelf Res* 6:73–86
- Diniz FM, Maclean N, Ogawa M, Cintra IHA, Bentzen P (2005) The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. *Mar Biotechnol* 7:462–473
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214–221
- FAO (2008) Fisheries Country Profile. The Republic of Suriname, FAO, Rome
- FAO (2011) FISHSAT plus Version 2.3: Universal software for fishery statistical time series. Capture Production 1950–2009. FAO, Rome
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–373
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299
- Freitas R, Castro M (2005) Occurrence of *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda, Palinuridae) in the Northwest islands of the Cape Verde Archipelago (Central-East Atlantic). *Crustaceana* 78:1191–1201
- Garassino A, Breton G (2010) *Panulirus destombesi* n. sp. (Crustacea, Decapoda, Palinuridae) de l’Albien (Crétacé inférieur) de Wissant (Pas-de-Calais, France). *Geodiversitas* 32:391–397
- George RW (2005) Tethys Sea fragmentation and speciation of *Panulirus* spiny lobsters. *Crustaceana* 78:1281–1309
- Glaholt RD, Seeb J (1992) Preliminary investigation into the origin of the spiny lobster, *Panulirus argus* (Latreille, 1804), population of Belize, Central America (Decapoda, Palinuridae). *Crustac Int J Crustac Res* 62:159–165
- Groeneveld JC, Gopal K, George RW, Matthee CA (2007) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (Decapoda: Palinuridae) with hypotheses on the speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean. *Mol Phylogenet Evol* 45:102–110
- Guéguen F (2000) Distribution et abondance des poissons démersaux et de quelques autres organismes benthiques marins du plateau continental (0–60 m) de Guyane Française. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences—Series III—Sciences de la Vie* 323:775–791
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Hasegawa M, Kishino H, Yano TA (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160–174
- Hateley JG, Sleeter TD (1993) A biochemical genetic investigation of spiny lobster (*Panulirus argus*) stock replenishment in Bermuda. *Bull Mar Sci* 52:993–1006
- Holthuis LB (1959) The Crustacea Decapoda of Suriname (Dutch Guiana). *Zool Verh* 43:1–296
- Holthuis LB (1991) FAO species catalogue. Vol. 13. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date. FAO Fisheries Synopsis 125. FAO, Rome
- Hoorn C (1993) Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the depositional history of Northwestern Amazonia—results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 105:267–309
- Hoorn C (1996) Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science* 273:122–123
- Hoorn C, Guerrero J, Sarmiento GA, Lorente MA (1995) Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene Northern South-America. *Geology* 23:237–240
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755
- ICZN (1999) International Code of Zoological Nomenclature, 4th edn. International Trust for Zoological Nomenclature, London

- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Knowlton N (1986) Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. *J Crustac Biol* 6:356–363
- Lamarck JBPA (1818) Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. Vol. 5:1–612. Imprimerie d'Abel Lanoe, Paris
- Latreille PA (1804) Des langoustes du Muséum National d'Histoire Naturelle. *Ann Mus Hist nat Paris* 3:388–395
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Maddison WP, Maddison DR (2009) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.6. <http://mesquiteproject.org>
- McWilliam PS, Phillips BF (2007) Spiny lobster development: mechanisms inducing metamorphosis to the puerulus: a review. *Rev Fish Biol Fish* 17:615–632
- Naro-Maciel E, Reid B, Holmes KE, Brumbaugh DR, Martin M, DeSalle R (2011) Mitochondrial DNA sequence variation in spiny lobsters: population expansion, panmixia, and divergence. *Mar Biol* 158:2027–2041
- Ovenden JR, Booth J, Smolenski A (1997) Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock lobsters (genus *Jasus*). *Mar Freshw Res* 48:1131–1136
- Palero F, Crandall KA, Abelló P, Macpherson E, Pascual M (2009) Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Mol Phylogenet Evol* 50:152–162
- Palumbi SR, Martin A, Romano S, Mcmillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) The simple fool's guide to PCR, version 2.0. University of Hawaii, Honolulu
- Phillips BF, Melville-Smith R (2006) *Panulirus* species. In: Phillips BF (ed) Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries. Blackwell Publishing, Singapore
- Potter PE (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. *J South Am Earth Sci* 10:331–344
- Ptacek MB, Sarver SK, Childress MJ, Herrnkind WF (2001) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Panulirus* (Decapoda: Palinuridae). *Mar Freshw Res* 52:1037–1047
- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr* 30:1161–1171
- Sarver SK, Silberman JD, Walsh PJ (1998) Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus argus*. *J Crustac Biol* 18:177–186
- Sarver SK, Freshwater DW, Walsh PJ (2000) The occurrence of the provisional Brazilian subspecies of spiny lobster (*Panulirus argus westonii*) in Florida waters. *Fish Bull* 98:870–873
- Silberman JD, Sarver SK, Walsh PJ (1994) Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Mar Biol* 120:601–608
- Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 76:449–462
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Teske PR, Beheregaray LB (2009) Intron-spanning primers for the amplification of the nuclear ANT gene in decapod crustaceans. *Mol Ecol Resour* 9:774–776
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
- Tsang LM, Chan T-Y, Cheung MK, Chu KH (2009) Molecular evidence for the Southern Hemisphere origin and deep-sea diversification of spiny lobsters (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). *Mol Phylogenet Evol* 51:304–311
- Vega FJ, García-Barrera P, Perrilliat MC, Coutiño MA, Mariño-Pérez R (2006) El Espinal, a new plattenkalk facies locality from the Lower Cretaceous Sierra Madre Formation, Chiapas, southeastern Mexico. *Rev Mex Cien Geol* 23:323–333

