

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**LUIZ AUGUSTO CAUZ DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA LAGOSTA  
EUROPEIA (*Palinurus elephas*), NO MEDITERRÂNEO OCIDENTAL DA ESPANHA**

**DOURADOS  
2013**

LUIZ AUGUSTO CAUZ DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA LAGOSTA  
EUROPEIA (*Palinurus elephas*), NO MEDITERRÂNEO OCIDENTAL DA ESPANHA**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, como parte das exigências do curso de Biotecnologia, para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadores: Profa. Dra. Alexéia Baruffati Grisolia  
Profa. Dra. Marta Pascual Berniola  
Prof. Dr. Ferran Palero

DOURADOS  
2013

LUIZ AUGUSTO CAUZ DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA LAGOSTA EUROPEIA (*Palinurus elephas*), NO MEDITERRÂNEO OCIDENTAL DA ESPANHA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, aprovado pela comissão formada por:

---

Orientadora: Prof. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia  
FCBA – UFGD

---

Prof. Dra. Liliam Silvia Candido  
FCBA – UFGD

---

Prof. Dra. Marcia Regina Russo  
FCBA – UFGD

Dourados, 21 de agosto de 2013.

*Dedico este trabalho a minha avó  
Beatriz da Silva Cauz (in memoriam).  
Por sempre ter me incentivado a  
seguir os meus sonhos... Saudades!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me dando forças para seguir em frente e me guiando às escolhas certas.

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade da realização do curso de Biotecnologia, e por ter me introduzido ao meio científico por meio do programa de bolsas de iniciação científica UFGD/CNPq.

A todos os professores e técnicos do curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela atenção, dedicação e disposição em passarem seus conhecimentos, contribuindo assim para uma excelente formação aos acadêmicos do curso. Obrigado!

Ao programa Ciência sem Fronteiras- CNPq e a Universitat de Barcelona, os quais possibilitaram a realização da minha mobilidade acadêmica, tornando possível a realização de um sonho, e consequentemente o desenvolvimento deste estudo.

Aos orientadores deste trabalho professora Dra. Marta Pascual Berniola e professor Dr. Ferran Palero, por terem sido meu apoio científico e financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço imensamente a professora Marta por me acolher em seu grupo de pesquisa, e pela oportunidade em trabalhar no laboratório de Genética Evolutiva da Universitat de Barcelona. Obrigado pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho, Moltes Gràcies per tot...

A minha orientadora professora Dra. Alexéia Baruffati Grisolia, por me abrir as portas do incrível mundo da Genética, pelas oportunidades oferecidas e pela confiança em mim depositada. Agradeço imensamente pela supervisão e apoio científico na escrita deste trabalho.

Aos membros da banca, professora Dra. Liliam Candido e professora Dra. Márcia Russo, pela revisão deste TCC e por contribuírem com seus conhecimentos científicos para o aprimoramento deste trabalho.

Aos serviços científicos técnicos e ao Departamento de Genética da Universitat de Barcelona, por colaborarem com o apoio logístico para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Evolutiva da Universitat de Barcelona, Aymmé Robainas, Gemma Kalabria, Rosana Arizmendi, Célia Shunter e Víctor Sánchez, por todo

auxílio e companherismo durante a execução deste trabalho.

Agradeço a professora Dra. Anelise Samara Nazari Formagio e ao professor Dr. Leonardo Oliveira Seno. Por terem me confiado à realização de pesquisas em seus grupos de estudos, me ajudando assim a crescer cientificamente. E também ao professor Dr. João Tadeu pelo estágio no laboratório de Genética e Terapia Celular da Unesp/Assis. Muito Obrigado!

Aos meus amigos de intercâmbio: Jéssica Pereira, Luiz Fernando Neves, Glauca Muniz, Jéssica Rodrigues, Rafaela Dorold e Suellen Ramalho, agradeço imensamente o apoio, os momentos de descontração e a participação neste momento incrível de crescimento pessoal e profissional em minha vida.

A minha família, por estarem sempre me apoiando e me dando suporte, aos meus Avós, Luiz Cauz e Beatriz da Silva Cauz (*in memoriam*) por serem minha base e por sempre me incentivarem a seguir em frente, aos meus pais Iara Maria Cauz e Paulo José dos Santos, aos meus irmãos Larissa Cauz e Danilo Ramos, e ao meu tio Oreste Cauz por sempre me apoiar a seguir meus estudos. Muito Obrigado!

Aos meus queridos amigos do curso de Biotecnologia, Carla Volobuff, Danielly Beraldo, Igor Chiarelli, Lara Endres, Mônica Ansilago, Nicholas Vinícius e Suellen Ramalho, por todos os incríveis momentos que passamos juntos durante estes 4 anos, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos conselhos, pelos sorrisos, pela amizade, e por fazerem parte do meu crescimento profissional e de um momento tão importante em minha vida. E aos meus amigos Albneir dos Santos, Daiane Baroni, Jéssica Tropaldi, Nathalia Lopez, Fabiana Baroni, obrigado por estarem sempre ao meu lado e por de alguma forma ter contribuído para a realização deste trabalho e conseqüentemente dos meus sonhos.

Aos amigos do Laboratório de Plantas Mediciniais- UFGD, e do Laboratório de Biotecnologia aplicada a Reprodução Animal, em especial ao mestre Bruno Amaral Crispim, por ter contribuído com as análises estatísticas deste trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma participaram nestes 4 anos de minha formação. Em especial a técnica Suzana Heim por ter sido e ser como uma mãe aos alunos do laboratório de plantas medicinais, o meu eterno Obrigado.

*“L'originalitat consisteix en el retorn a l'origen;  
així doncs, original és allò que torna a la  
simplicitat de les primeres solucions”.*

**Antoni Gaudí**

## RESUMO

A lagosta europeia (*Palinurus elephas*) é uma espécie de crustáceo amplamente distribuída no Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo. Possui alto valor comercial e apresenta a forma larval filossoma com uma longa duração da fase planctônica. Considerando que a pesca local diminuiu significativamente nos últimos anos devido à superexploração, há necessidade crescente de se desenvolver planos de conservação para esta espécie. A fim de avaliar a variabilidade genética, uma população de *Palinurus elephas* foi analisada no período compreendido entre 2006 e 2009, utilizando-se 11 marcadores microssatélites. Um total de 163 amostras de *P. elephas* foram coletadas durante o referido período em Cullera, cidade localizada no Mediterrâneo ocidental. As amostras foram estruturadas dentro de cada ano para incluir tanto as temporadas de verão (VR06, VR07, VR08) e inverno (IV06, IV07, IV08, IV09). Além disso, um estudo comparativo entre a distância genética das amostras de Cullera e de 10 populações de *P. elephas* analisadas em um estudo anterior (oeste da Escócia, Western Irlanda, Bretanha, Baía de Biscaia, Sul de Portugal, Mediterrâneo Ocidental, Norte do Mediterrâneo Ocidental, Tunísia, Sicília e Grécia) foi estimado. As análises revelaram que a heterozigosidade observada foi menor do que a heterozigosidade esperada durante todo o período de 4 anos. Os valores de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) observadas na maioria dos marcadores foram de moderado a alto (0,30 a 0,89), e permitiram estimar parâmetros de diversidade e diferenciação genética. Foram encontrados valores mais baixos de distância genética (*Fst*) entre as sete amostras de juvenis de Cullera e as populações do Mediterrâneo, com exceção da Sicília. Estimativas de diferenciação maiores foram obtidas comparando as amostras de Cullera com as populações situadas no Atlântico (Escócia, Irlanda, Bretanha, Biscaia e Portugal). Os resultados não indicaram redução na diversidade genética da população, porém demonstraram que a influência de barreiras oceanográficas na dispersão de espécies pode estar contribuindo para a diferença genética entre as populações de *P. elephas*.

**Palavras-chave:** *Palinurus elephas*, Conservação genética, diversidade genética, marcadores microssatélites.

## ABSTRACT

The European spiny lobster (*Palinurus elephas*) is a widely-distributed crustacean species with high commercial value and which presents a larval form phyllosoma with a long planktonic duration. Given that local fisheries have significantly declined in recent years due to overexploitation, there is an increasing necessity to develop conservation plans for this species. In order to evaluate the genetic variability, a population of *Palinurus elephas* was analyzed during 2006-2009, using 11 microsatellite markers. A total of 163 samples of *P. elephas* were collected over a period of four years (2006-2009) in Cullera, a small town located in the western Mediterranean. Samples were structured within each year to include both the summer (VR06, VR07, VR08) and winter (IV06, IV07, IV08, IV09) seasons. Furthermore, the genetic distance between the Cullera samples and another 10 *P. elephas* populations analyzed in a previous study (Western Scotland, Western Ireland, Brittany, Bay of Biscay, South Portugal, Western Mediterranean, North Western Mediterranean, Tunisia, Sicily and Greece) was estimated. The analyses revealed that the observed heterozygosity were consistently smaller than the expected heterozygosity values over the whole 4-year period. The polymorphism information content (PIC) values observed in most markers was moderate to high (0.30 to 0.89) and allowed for estimating diversity parameters and genetic differentiation. Lower  $F_{st}$  values were found between the seven samples of juvenile from Cullera and the Mediterranean populations, with the exception of Sicily, and larger differentiation estimates were obtained when comparing them with the populations located in the Atlantic (Scotland, Ireland, Brittany, Biscay and Portugal). The results do not indicate a significant reduction on the genetic diversity of this population, but showed that the influence of oceanographic barriers in the dispersal of species maybe contributing to the genetic difference between populations of *P. elephas*.

**Keywords:** *Palinurus elephas*, Conservation genetics, genetic diversity, microsatellite markers.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP -	Amplified Fragment Length Polymorphisms
COI -	Citocromo Oxidase I
FIS -	Coeficiente de consanguinidade intrapopulacional
FST -	Coeficiente de consanguinidade entre subpopulações
He -	Heterozigosidade esperada
Ho -	Heterozigosidade observada
mtDNA -	DNA mitocondrial
PCR -	Polymerase Chain Reaction
PIC -	Polymorphic Information Content
RAPD -	Radom Amplified Polymorphic DNA
RFLP -	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNPs -	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR -	Simple Sequence Repeats

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Períodos amostrais e número de indivíduos coletados da população de *Palinurus elephas* em Cullera ao longo dos anos de 2006 a 2009.....21
- Tabela 2:** Informações referente aos oligonucleotídeos iniciadores (primers), número de acesso ao Genbank, tamanho dos produtos, fluoróforos, grupos multiplex, número de repetição e sequências *Foward* e *Reverse*.....24
- Tabela 3:** Número de amostras ( $N$ ), número médio de alelos ( $N_A$ ), heterozigosidade média observada ( $H_O$ ), heterozigosidade média esperada ( $H_E$ ), e coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).....27
- Tabela 4:** Conteúdo de informação polimórfica (PIC) por marcador dos 11 loci microssatélites das amostras avaliadas em diferentes períodos.....28
- Tabela 5:** Matriz com valores de  $F_{ST}$  comparando a distância genética das amostras de Cullera (2006 a 2009).....30

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa do Mar Mediterrâneo demonstrando as correntes marítimas nas bacias oriental e ocidental.....5
- Figura 2:** Lagosta Vermelha ou Lagosta Europeia (*Palinurus elephas*), **A)** Fase de desenvolvimento larval, **B)** Adultos de *P. elephas*.....7
- Figura 3:** Mapa da distribuição de *Palinurus elephas* ao longo de Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo.....8
- Figura 4:** Representação esquemática de marcadores microssatélites. **A)** Genótipo homocigoto (alelos iguais), **B)** genótipo heterocigoto (alelos diferentes), ambos para uma região genômica que compreende um microssatélite de elementos (CA) / (GT). **C)** Representação de gel de eletroforese de indivíduos diplóides, indicando diferentes genótipos homocigotos e heterocigotos.....16
- Figura 5:** Locais de coleta das amostras no Mar Mediterraneo e no Oceano Atlântico.....20
- Figura 6:** Esquema das etapas da Extração de DNA.....22
- Figura 7:** Esquema das etapas de funcionamento da Eletroforese Capilar em Sequenciador Automático.....25
- Figura 8:** Heterocigosidade média esperada (azul) *versus* a observada (vermelho) na população ao longo do período de 2006 a 2009.....28
- Figura 9:** Matriz de similaridade genética (valores de  $F_{ST}$ ) entre as amostras de Cullera (2006 a 2009) com as outras 10 populações analisadas com referência aos 11 loci marcadores. Os resultados apresentando maior distância genética entre as populações estão representados em vermelho.....29
- Figura 10:** Resultados de  $F_{ST}$  na comparação da distância genética de indivíduos de Cullera com outras 10 populações de *P. elephas*.....30
- Figura 11:** Atribuição dos indivíduos de Cullera (pertencentes a todos os períodos amostrais entre 2006 e 2009) a alguma das 10 populações de origem utilizadas no estudo. NA foram os indivíduos não atribuídos a nenhuma das populações.....31
- Figura 12:** Localidade das 10 populações de *P. elephas* comparadas no teste de distância genética. E barreiras oceanográficas: EG (Estreito de Gibraltar), AOF (Frente de Almería-Orán) e SOS (Estreito da Sicília).....34
- Figura 13:** Esquema desenho da frente de Almería Orán e da corrente da Argélia.....35
- Figura 14:** Mapa de correntes formadas na bacia do Mar Mediterrâneo ocidental. Os círculos

compostos de traços indicam a formação de turbilhões, e as linhas com setas a formação da corrente principal.....37

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 A exploração pesqueira e os efeitos oceanográficos em populações de lagostas.....	3
2.1.1 <i>Biologia e sobre-exploração da lagosta europeia <i>Palinurus elephas</i></i> .....	6
2.2 Estudos genéticos em populações marinhas.....	9
2.2.1 <i>A Filogeografia e a sua implicação na Conservação Genética</i> .....	9
2.2.2 <i>A importância da manutenção da diversidade genética</i> .....	12
2.2.3 <i>Variabilidade e diferenciação genética em populações de lagostas</i> .....	12
2.3 Marcadores moleculares aplicados à genética de populações.....	13
2.3.1 <i>Marcadores moleculares microsatélites</i> .....	15
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Objetivo Geral.....	19
4.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
5.1 Local de Coleta.....	20
5.2 Amostras.....	20
5.3 Extração de DNA.....	21
5.4 Amplificação em PCR multiplex.....	23
5.5 Análise dos fragmentos.....	25
5.6 Análises estatísticas.....	26
5.6.1 <i>Teste de Atribuição da População</i> .....	26
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os oceanos são considerados um dos ecossistemas com grande importância para a humanidade, é um ambiente diversificado tanto em recursos vivos quanto não vivos, e constituem aproximadamente 71% da superfície terrestre. O aumento na demanda por alimentos, assim como por outros recursos provenientes do mar e a proximidade de grandes centros urbanos de áreas costeiras, aumentam a relação entre o homem e os oceanos, incluindo nestes aspectos o lazer, o transporte, a obtenção de minerais e a exploração pesqueira (MELLO e PALMA, 2000).

Com a chegada da revolução industrial, a pesca que inicialmente era considerada uma atividade de pequena escala, progrediu velozmente, e com a sua rápida expansão ao final do século XIX já se calculava um declínio de 30% da abundância dos recursos pesqueiros do Mar do Norte. A superexploração pesqueira começou a tomar maior evidência ao final dos anos 30, onde vários recursos do Mar do Norte e do Oceano Atlântico já demonstravam o conceito hoje conhecido como sobrepesca (CASTELLO, 2007). No Mar Mediterrâneo, os efeitos da sobre pesca ao longo dos anos levaram a diminuição e até a extinção de algumas espécies marinhas. A preocupação com os efeitos da sobrepesca tem levado ao desenvolvimento de medidas de preservação de populações marinhas, como a criação de áreas de conservação (SARDÁ e COLL, 2007).

Para a definição de áreas de conservação, um dos fatores de extrema importância é o conhecimento da conectividade entre as populações. Este fator está fortemente ligado aos padrões de dispersão das espécies ao longo das correntes marítimas. A dispersão larval pode ser afetada por diversos fatores, entre eles as diversas barreiras geográficas encontradas nos oceanos, que podem levar à diferenciação genética entre as populações. Os estudos genéticos são utilizados para a compreensão da dinâmica populacional e conectividade das espécies, considerados aspectos importantes para o estabelecimento de programas de gestão ambiental (ELPHIE et al., 2012).

Os estudos de genética de conservação e de ecologia molecular se interligam na busca de polimorfismos genéticos que levem a compreensão dos processos evolutivos, demográficos, e ecológicos necessários na construção de planos de conservação de espécies (EIZIRIK, 1996). Para tanto, o desenvolvimento de ferramentas, como os marcadores moleculares possibilitaram estudos que permitiram determinar a diversidade genética das espécies.

Os marcadores moleculares podem ser considerados qualquer fenótipo molecular

oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA e GRATAPLAGLIA, 1996). Dentre os marcadores, destacam-se os microssatélites, que são sequências curtas repetidas em tandem, estão espalhadas pelo genoma e são altamente polimórficas (RIEGER et al., 2006). Estes marcadores são de grande aplicabilidade, por possuírem alta taxa de mutação, abundante distribuição através do genoma, neutralidade, codominância, e fácil automatização dos procedimentos analíticos que permitem a estimativa de diversidade genética inter e intra populacional (LIGDA et al., 2009).

Em espécies marinhas, microssatélites empregados na caracterização da diversidade genética de camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, demonstraram alto nível de variabilidade genética na espécie (SOUZA DE LIMA et al., 2010). Estudos com microssatélites também foram realizados em espécies da lagosta Americana *Homarus americanus*, e demonstraram que os marcadores genéticos desenvolvidos para esta espécie têm aplicação tanto em estudos com a lagosta Americana quanto para outras espécies de lagosta (JONES et al., 2003).

A lagosta europeia (*Palinurus elephas*) é uma espécie de crustáceo com elevado valor comercial, e conhecida por possuir longo período larval e ampla distribuição geográfica. A captura desta espécie tem diminuído nas últimas décadas devido à superexploração e a existência de barreiras oceanográficas que podem afetar a sua dispersão (PALERO et al., 2010). Devido a isto, *P. elephas* é uma espécie candidata aos planos de proteção e conservação de recursos marinhos submetidos à exploração pesqueira dentro do âmbito da União Europeia.

Na biologia da conservação, as informações genéticas tem um papel fundamental no desenvolvimento de áreas de proteção, por focar principalmente nas propriedades evolutivas das espécies (MILLIGNAN et al., 1994). Assim, diversas ferramentas, como os marcadores moleculares microssatélites, foram desenvolvidas para auxiliar na compreensão destas informações importantes a genética de conservação.

Diante do exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem os efeitos sazonais e da existência de barreiras oceanográficas que possam interferir na variabilidade genética desta espécie.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A exploração pesqueira e os efeitos oceanográficos em populações de lagostas**

O planeta terra é dotado de grande biodiversidade, uma fonte de riqueza viva, com aproximadamente 8,7 milhões de espécies eucariotas distribuídas nos diversos ecossistemas. Os oceanos representam um dos grandes e mais importantes ambientes existentes no planeta, constituindo aproximadamente 71% da superfície terrestre e 98% da água total existente. Suas dimensões chegam a 361 milhões de km<sup>2</sup> contra 150 milhões de km<sup>2</sup> em área que formam os continentes (PELLEGRINI, 2002; MORA et al., 2011). Trata-se de ambiente diversificado tanto em recursos vivos quanto não vivos, possuindo cerca de 2,2 milhões de espécies, e exercendo grande importância científica e comercial para a humanidade (FIGUEIRA e CUNHA, 1998; MORA et al., 2011).

O aumento na demanda por alimentos assim como por outros recursos provenientes do mar, e a proximidade de grandes centros urbanos das áreas costeiras, aumentam a relação entre o homem e os oceanos, incluindo nestes aspectos o lazer, o transporte, a obtenção de minerais e a exploração pesqueira (MELLO e PALMA, 2000).

A pesca é considerada umas das atividades econômicas mais antigas, possui grande relevância na alimentação de vários povos. Teve seu crescimento acelerado após a segunda guerra mundial até os anos 80. Porém, desde então verificou-se redução na expansão da produção pesqueira devido a fatores como a sobre pesca (BNDS, 1997).

A produção mundial de pescado de captura que chegou a 20 milhões de toneladas em 1950 passou a 90 milhões de toneladas no início dos anos 90, consolidando o forte crescimento do setor, e estabilizando a produção a uma taxa de cerca de 90 milhões de toneladas/ano. No entanto, estimativas da FAO (Food and Agriculture Organization) demonstram que a produção mundial dificilmente ultrapassará as 100 milhões de toneladas, contradizendo assim o antigo pensamento de que os oceanos seriam fonte inesgotável de alimentos. Isto ocorre principalmente pela intensa sobrepesca estar levando os estoques pesqueiros a se encontrarem muito próximos de seus limites máximos de sustentabilidade (HAZIN, 2012).

Dados recentes da FAO (2012) demonstraram que a pesca de captura e a aquicultura mundial chegaram em 2010 a cerca de 148 milhões de toneladas, sendo destas 128 milhões foram destinados ao consumo humano. O setor demonstrou uma taxa média de crescimento anual de 3,2% ao ano entre o período de 1961 a 2009, e manteve a produção mundial de pesca

de captura estável em torno de 90 milhões de toneladas por ano. No entanto, a maioria das populações das 10 espécies mais capturadas (que representam um total de 30% da produção de pesca mundial) se encontram superexploradas, inviabilizando assim o crescimento da produção e causando consequências ecológicas negativas.

As lagostas estão entre os organismos mais importantes para a pesca de captura marinha nos principais oceanos do mundo. Entre elas, duas famílias são as principais detentoras das espécies mais capturadas: a Neohropidae, conhecida como lagosta de pinça (clawfish lobster), e a Palinuridae chamada de lagosta espinhosa (spiny lobster) (FORD, 1980).

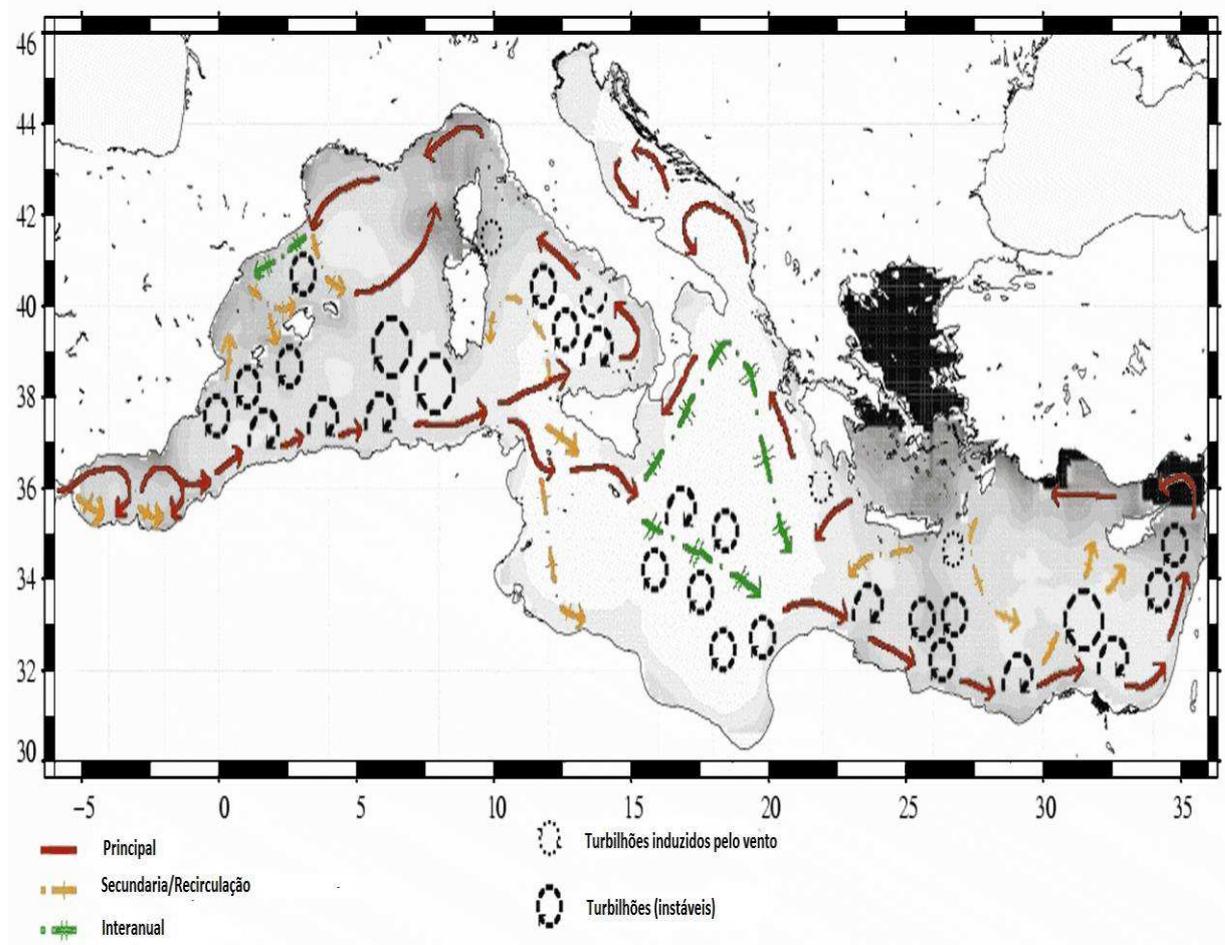
As lagostas da família Palinuridae estão entre os crustáceos mais valiosos do mundo, são comercializadas em mais de 90 países e sua captura foi estimada em 77.000 toneladas por ano. Os principais produtores de lagostas desta família são Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Cuba, Brasil, México e EUA. Porém, devido a grande quantidade capturada, muitas espécies de Palinuridae se encontram superexploradas (PHILIPHS e KITAKA 2000, FRISCH, 2007).

Entre alguns efeitos causados pela superexploração da pesca nestas espécies e também em outras espécies marinhas, destacam-se a alteração na composição etária e no tamanho dos indivíduos que constituem os estoques, ou seja, pode se alterar a estrutura inicial das populações reduzindo drasticamente os indivíduos de maior idade, e modificando assim o equilíbrio natural, pois quando em equilíbrio os estoques são compostos principalmente por indivíduos de maiores idades (DIAS-NETO, 2010). Estes efeitos podem alterar também o tamanho efetivo das populações, que é o número de indivíduos que estão participando na produção da próxima geração, contribuindo assim para a sua evolução (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Além da pesca, os efeitos oceanográficos como as correntes marítimas podem também afetar a composição das populações marinhas.

A distribuição e a dispersão das populações marinhas são diretamente influenciadas pelas barreiras oceanográficas, e estas geram consequências na conectividade genética das populações, levando a fortes barreiras ao fluxo de genes (GALARZA et al., 2008). A distribuição espacial da diversidade genética é influenciada principalmente por barreiras à dispersão. A natureza de tais barreiras varia de acordo com a forma e capacidade de dispersão dos organismos em questão. No entanto, embora estas barreiras sejam frequentemente evidentes em terra, no mar podem ser mais difíceis de serem identificadas.

O Mar Mediterrâneo é um sistema semifechado ou quase isolado do Atlântico, porém realiza trocas de água, sal, calor, e outras propriedades com o Oceano Atlântico Norte. É

composto por duas bacias, a ocidental e a oriental, que possuem aproximadamente o mesmo tamanho e estão ligadas através do Estreito da Sicília. A circulação no Mar Mediterrâneo é forçada principalmente pela troca de águas através dos vários estreitos, pela força dos ventos, e pela formação de turbilhões instáveis (Figura 1) (ROBINSON et al., 2001).



**Figura 1:** Mapa do Mar Mediterrâneo demonstrando as correntes marítimas nas bacias oriental e ocidental. Fonte: adaptado de PUJOL, 2006.

O Mar Mediterrâneo ocidental é considerado um oceano de pequena escala, influenciado pelo fluxo de água através do Atlântico pelo Estreito de Gibraltar. As interações entre a água mais densa do Mediterrâneo, juntamente com a água mais leve do Atlântico, levam a formação de duas frentes oceanográficas que podem afetar a dispersão de organismos, e que estão separadas por cerca de 600 km. A primeira, localizada a 400 km ao leste do Estreito de Gibraltar, chama-se frente de Almería- Orán (AOF), é uma fronteira permanente formada pela convergência entre as massas de águas superficiais do Atlântico e do Mediterrâneo. É caracterizada pela forte densidade de gradientes e por algumas áreas de

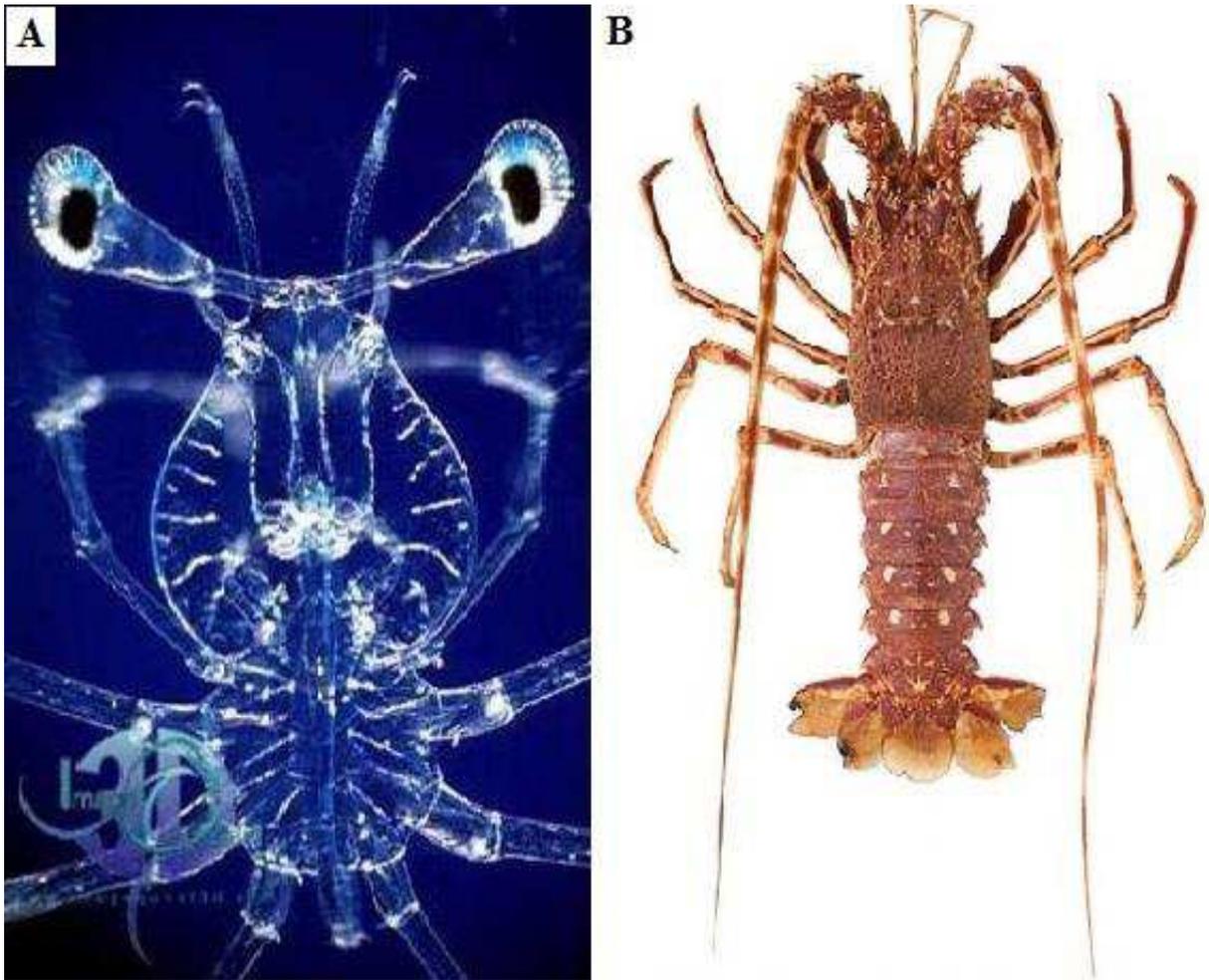
ressurgência. Alguns estudos evidenciaram a atuação desta frente como barreira ao fluxo de genes de diversas espécies. A segunda, a frente das Baleares (BF) é semelhante a uma prateleira ou inclinação. Está presente nos 200 m da superfície no mar, e é caracterizada pela diferença das águas em 0,5 unidades de densidade (GALARZA et al., 2008). A estas frentes oceanográficas somam-se ainda outras barreiras à dispersão das espécies que estão localizadas no Mediterrâneo, entre elas está o Estreito da Sicília, que é caracterizado por uma fina crosta de tipo continental que aumenta progressivamente para a margem do continente africano e abaixo da Sicília (CELLO, 1987), dividindo o Mediterrâneo em duas bacias. Outro fator importante na dispersão de espécies marinhas é a formação de correntes e redemoinhos, pois estes também podem levar a retenção da dispersão larval.

Os efeitos de barreiras oceanográficas na diferenciação genética de populações foram observados na lagosta europeia *Palinurus elephas*, uma das principais espécies superexploradas no Mar Mediterrâneo. Os estudos indicaram diferenciação entre populações desta espécie localizada ao longo do Mediterrâneo, quando comparadas com populações existentes no Oceano Atlântico. Desta forma, os resultados demonstraram que as barreiras existentes nestes ambientes poderiam estar dificultando a dispersão larval e conseqüentemente impedindo o fluxo de genes (PALERO e PASCUAL, 2008).

### **2.1.1. *Biologia e superexploração da lagosta europeia *Palinurus elephas****

As famílias Nephropidae, Palinuridae, Scyllaridae e Synaxidae são as detentoras das 163 espécies de lagostas (Crustáceos decápodes) catalogadas no nosso planeta. A família Palinuridae é uma das famílias mais importantes para a pesca marítima, sendo constituída por 49 espécies (SPANIER e LAVALLI, 2006), dentre as quais, cinco compõem o gênero *Palinurus*, caracterizado por lagostas de clima temperado e de águas profundas (PHILLIPS et al., 1980).

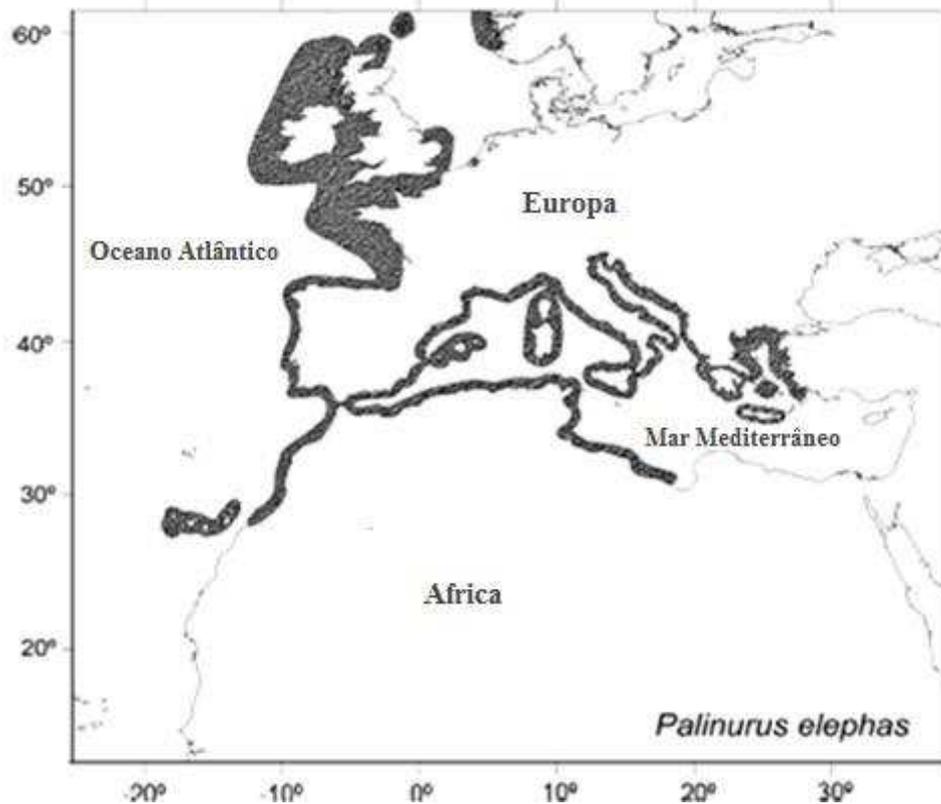
Entre as espécies deste gênero está a lagosta europeia, também conhecida como lagosta vermelha (*Palinurus elephas*) (Figura 2). Esta é uma espécie de crustáceo com elevado valor comercial, e conhecida por possuir longo período larval, porém sua captura tem diminuído nas últimas décadas devido principalmente a superexploração pesqueira (PALERO et al., 2010).



**Figura 2:** Lagosta Vermelha ou Lagosta Europeia (*Palinurus elephas*), **A)** Fase de desenvolvimento larval, **B)** Adultos de *P. elephas*. Fotos: IMAGEM QUEST 3-D, 2000; TRISTAN LE GOFF.

Esta espécie pode ser encontrada no Oceano Atlântico em uma região desde o Marrocos até a Noruega (Figura 3) e também por todo o Mar Mediterrâneo, com exceção dos extremos das regiões leste e sudeste (HOLTHUIS, 1991). *P. elephas* vive em substratos rochosos e micro cavernas entre a costa e até 200m de profundidade (CECCALDI e LATROUITE, 2000). Os indivíduos adultos da espécie são encontrados solitários, aos pares, ou em pequenos grupos preferencialmente sobre a base das rochas. São ativos principalmente durante a noite e os seus movimentos geralmente estão limitados à reprodução e ao forrageamento. A dieta é preferencialmente onívora, porém é generalista em relação à alimentação, e muda suas preferências alimentares em função da abundância bentônica dos organismos. Entre suas principais presas estão moluscos, equinodermos e pequenos crustáceos. As larvas se alimentam principalmente de fitoplânctons ou de outras larvas planctônicas, a alimentação da fase larval esta totalmente ligada aos mecanismos de dispersão

desta espécie, visto que a mesma apresenta seus movimentos quase que limitados ao forrageamento.



**Figura 3:** Mapa da distribuição geográfica de *Palinurus elephas* ao longo de Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo. Fonte: adaptado de GOÑI e LATROUITE, 2005.

A ocorrência de reprodução é relatada no Atlântico entre os meses de junho e outubro, dependendo da região (HUNTER et al., 1996), e no Mediterrâneo ocidental entre os meses de julho e setembro. Os picos de oviposição ocorrem em setembro no Mediterrâneo ocidental (GOÑI et al., 2003) e entre setembro e outubro no Atlântico (LATROUITE e NOËL, 1997).

O período de duração de seu desenvolvimento larval é longo, podendo ser de 5 a 6 meses no Mediterrâneo e de um ano no Atlântico (HUNTER, 1999). A probabilidade de dispersão da larva através das correntes marítimas é maior nas primeiras fases de desenvolvimento larval, onde a espécie permanece por um longo período em oceano aberto (BOOTH e PHILIPHS, 1994). Os juvenis desta espécie podem chegar a migrar por 700 km (GOENEVELD e BRANCH, 2002). Estes mecanismos de dispersão da larva bem como as migrações bentônicas levam a pensar que o fluxo gênico entre as populações desta espécie são mais intensos, e que, portanto sua estruturação genética é baixa. No entanto, os movimentos

das águas que podem afetar a dispersão larval, podem levar ao isolamento de algumas populações, devido a mudanças no padrão das correntes (PALERO et al., 2008).

A espécie possui elevado fluxo gênico, sendo considerada pan-mítica. A panmixia é a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos quaisquer da mesma população. A maturidade reprodutiva é atingida em torno dos 5 anos de idade, e os indivíduos desta espécie podem chegar a ter uma longa vida útil de até 25 anos. Da mesma forma que muitas outras espécies, a maior causa de mortalidade natural é a predação, particularmente durante os estágios de muda e juvenil (MARIN, 1985).

Devido à sobre exploração pesqueira desta espécie, a sua captura tem diminuído de forma alarmante nas últimas décadas em toda a sua área de distribuição (GOÑI e LATROUIT, 2005). Por este motivo, *P. elephas* é uma espécie candidata aos planos de proteção e conservação de recursos marinhos submetidos à exploração pesqueira dentro do âmbito da União Europeia, e esta incluída na lista de espécies protegidas da Convenção de Berna e na lista da SAC de espécies prioritárias a conservação (ADRIAMED, 2007). Assim, são necessários estudos que avaliem a diversidade genética desta população, por gerarem dados que possam contribuir para planos de manejo reprodutivo em áreas de conservação.

## **2.2 Estudos genéticos em populações marinhas**

### **2.2.1 A Filogeografia e sua implicação na Conservação Genética**

As informações genéticas tem papel fundamental no desenvolvimento da biologia da conservação por focar principalmente as propriedades evolutivas das espécies (MILLIGNAN et al., 1994). Para isto, o estudo dos processos evolutivos históricos e contemporâneos, que explicam a distribuição das linhagens genealógicas de uma espécie, ou entre espécies, constituem a área de relevância denominada de filogeografia (AVISE et al., 1987). Esta se originou a partir das técnicas moleculares que surgiram em torno de 1980, e que permitiram estudar de forma sistemática as variações ocorridas no DNA em nível populacional. Assim, estes estudos propiciaram verificar a influência de forças evolutivas (como a mutação, a deriva genética, o fluxo gênico e a seleção natural) ou de processos demográficos (como a migração, a colonização e a extinção) na estrutura das populações e na sua história genealógica.

Os processos ecológicos do passado e do presente e as pressões atuais sofridas pelas espécies, como a super exploração, são os elementos que ao passar do tempo moldaram a

variabilidade genética das populações, desta forma, os fatores evolutivos e demográficos devem ser considerados em estudos de diversidade, pois são importantes para a manutenção da variabilidade genética (MACEY et al., 1999).

O fluxo gênico é um fator evolutivo, que em teoria é o número de migrantes existentes entre as populações em cada geração (BURTON et al., 2002). Em espécie com distribuições geográficas persistentes durante muito tempo, o fluxo gênico ocorre através do movimento dos seus indivíduos entre populações, assim, caso o fluxo seja intermitente ou inexistente as populações evoluem independentemente (SLATKIN, 1987), gerando, desta forma, distância genética com outras populações. Esta distância genética tende a aumentar com a distância geográfica que separa as populações, já o fluxo genético, tende a diminuir conforme há o aumento da distância geográfica (HELLBERG, 1994).

A distância genética está ligada a conectividade existente entre as populações, que é determinada principalmente pelo potencial de dispersão das espécies, de maneira que espécies que possuem restrita capacidade de dispersão podem apresentar populações geneticamente mais estruturadas (PALUMBI, 2003). A duração da larva planctônica (PLD) é considerada um fator chave na definição dos padrões de dispersão e do grau de conectividade entre as populações de espécies marinhas (SHANKS et al., 2003). Sendo assim, espécies que possuem longo PLD e capacidade de dispersão, provavelmente apresentam um grande fluxo de genes (panmixia) e, portanto, baixa ou nenhuma estruturação populacional. Por isso, conhecer e definir os padrões de conectividade nestas populações é de extrema importância para manter e gerir a diversidade biológica das espécies (FRANKHAM et al., 2002).

A deriva genética, que é ocasionada por mudanças aleatórias na frequência dos alelos, é outro mecanismo importante a ser considerado, pois pode alterar a composição genética populacional ao longo do tempo (TEMPLETON, 2011). Este processo afeta principalmente populações grandes, no entanto, é um importante fator quando um número pequeno de indivíduos formam uma nova população ou quando as populações se encontram isoladas (GAVRILETS, 1999).

As barreiras e estruturas oceanográficas existentes no ambiente marinho, como giros ou turbilhões, podem gerar uma subdivisão ou até o isolamento de populações (PALUMBI, 2004). Para isto, a utilização de ferramentas moleculares tem grande aplicabilidade ao tentar desvendar se uma população se encontra ou não isolada, pois a diferenciação genética é muito sensível à migração, desta maneira, quanto maior o grau de dispersão das espécies menor será a diferenciação genética ao longo da sua área de distribuição (PALUMBI, 2003).

De uma forma geral, os eventos genéticos considerados em filogeografia são

importantes e relevantes para o conhecimento e conservação da diversidade. Assim, a conservação utiliza de um conhecimento abrangente da diversidade biológica (incluindo reconhecimento de espécies ou unidades evolutivas independentes), e de dados da estrutura das populações, como o tamanho efetivo, a depressão genética por endogamia ou exogamia, e os efeitos decorrentes do fluxo gênico.

A estruturação das populações possui grande implicação na escolha da estratégia de conservação de uma espécie ameaçada. Se uma espécie que ocupa uma determinada área tem sua população estruturada, a estratégia de conservação deve visar à preservação da diversidade desta espécie em toda a sua distribuição, pois algumas adaptações locais se perderiam, caso estas populações fossem misturadas. Por outro lado, no caso de espécies com distribuição homogênea em toda a sua área de ocorrência, a estratégia de conservação deve visar à proteção da espécie em apenas uma área, utilizando estes indivíduos para recolonizar outras áreas quando necessário (HAIG, 1998).

A conservação genética então tem como objetivos, com base nas informações genéticas e evolutivas envolvidas, identificar as espécies ameaçadas de extinção e os eventos que podem estar afetando as populações. E também fornecer a base para a conservação das unidades evolutivas dentro delas, ou seja, do conjunto de indivíduos da mesma espécie que esteja vivendo num determinado local ao mesmo tempo. De modo que seja possível preservar processos evolutivos indispensáveis para a permanência das espécies a longo prazo (MORITZ, 2002; PERTOLDI et al., 2007). Deste modo, para a manutenção da diversidade genética em espécies marinhas é importante entender os padrões de dispersão, a conectividade entre as populações, o fluxo de genes e as barreiras que os afetam.

### ***2.2.2 A importância da manutenção da diversidade e da variabilidade genética***

A diversidade biológica pode ser definida como a variação presente em todas as espécies de plantas e animais, os seus materiais genéticos, e os ambientes em que estas espécies estão. Assim, se formam três níveis de diversidade, a diversidade genética, a das espécies e a dos ecossistemas.

Segundo a FAO (2008) a diversidade genética nas espécies aparece principalmente como variantes que ocorrem na sequência linear de nucleotídeos no DNA. Assim, a diversidade genética corresponde à quantidade de variabilidade genética existente em uma população, e é definida como o resultado da quantidade de locos e alelos envolvidos na expressão de um determinado caráter numa população da mesma espécie.

A grande importância em se preservar a variabilidade genética em populações, é que esta é a base para a sobrevivência e adaptação das espécies, tornando possível o avanço dos processos adaptativos do qual dependem o sucesso evolutivo, e em certa medida a sobrevivência humana (RAO e HODKGIN, 2002). Assim, populações que possuem maior diversidade genética, apresentam maiores condições de sobrevivência caso ocorra mudança drástica no ambiente em que vivem, visto que há maior probabilidade de possuírem alguns indivíduos que apresentem características que lhes possibilitem sobreviver a tais mudanças (SOLÉ-CAVA, 2001). Ainda, a perda da diversidade genética pode levar a extinção de espécies naturais (FRANKHAM, 2005).

### **2.2.3 Variabilidade e diferenciação genética em populações de lagostas**

Com a necessidade em se desenvolver áreas de conservação para as diversas espécies de lagostas superexploradas, vários estudos genéticos foram e vem sendo desenvolvidos a fim de fornecer informações sobre estas populações.

Como exemplo, a análise da estrutura genética na espécie de lagosta *Nephrops norvegicus* foi realizada com o intuito em se obter informações sobre a diferenciação entre as populações existentes no Atlântico e no Mediterrâneo. Os resultados apresentaram baixos níveis de diferenciação genética entre elas, e demonstraram não haver uma divisão entre Atlântico e Mediterrâneo (STAMATIS et al., 2004). Estudos com a lagosta Caribenha (*Palinurus argus*) demonstraram elevado fluxo gênico entre as populações, e assim, conseqüentemente menor distância genética entre elas. Este resultado deve-se principalmente a longa fase da larva planctônica, que leva ao aumento do potencial de dispersão desta espécie (CRUZ, 2002).

A investigação da estrutura genética de amostras da lagosta Californiana (*Panulirus interruptus*) em 6 localidades, indicou grande variabilidade genética, e observar que todas as localidades partilhavam dos mesmos haplótipos (GARCIA-RODRIGUEZ e PEREZ-ENRIQUEZ, 2006).

Outro estudo da diversidade genética em populações da lagosta *Nephrops norvegicus* provenientes de duas localidades, conseguiu detectar elevada variabilidade no número de alelos e no número de heterozigotos esperados e observados, bem como também demonstrar não haver diferenciação genética entre as localidades analisadas (STREIFF et al., 2001). Análises moleculares empregadas na lagosta Chinesa (*Panulirus stimpsoni*) demonstraram haver variabilidade genética na espécie, e confirmaram a aplicabilidade de ferramentas

moleculares em estudos de diversidade (LIU et al., 2010).

Em *Palinurus elephas*, a aplicação de métodos moleculares em um estudo da variabilidade genética em três populações do Mediterrâneo, evidenciou elevado número de alelos e de heterozigotos nas populações, revelando a existência variabilidade genética (ELPHIE et al., 2012). A distância genética foi observada entre populações distribuídas ao longo do Mediterrâneo e do Atlântico, sugerindo a influência de barreiras no fluxo de genes e na conectividade de populações de *P. elephas* (PALERO et al., 2008; BABBUCCI et al., 2010; PALERO et al., 2011a).

Os métodos moleculares se tornaram parte essencial na maioria dos estudos sobre a diversidade e a distribuição genética, objetivando o entendimento dos gargalos e outros aspectos fundamentais que possam afetar a diversidade genética das espécies. Assim, os marcadores moleculares como os RFLPs, RAPD, AFLPs e os microssatélites, surgiram para a busca da elucidação de informações genéticas importantes para estudos de populações (KARP e EDWARDS, 1995).

### **2.3 Marcadores moleculares aplicados à genética de populações**

Os marcadores moleculares podem ser considerados qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Estas pequenas sequências de DNA podem revelar polimorfismos e assim distinguir indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998). O polimorfismo é denominado como uma variação na sequência de DNA que possa ser encontrada numa frequência superior a 1% em uma população (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Com o passar das décadas pode ser percebido aumento no número de marcadores disponíveis a aplicação de estudos de diversidade genética, e apesar de alguns possuírem diferentes bases moleculares, todos estão focados em determinar a organização da estrutura genética de populações (BECERRA e PEREDES, 2000).

Inicialmente foram desenvolvidos marcadores isoenzimáticos, que são produtos diretos da expressão gênica (OLIVEIRA et al., 2002), através deles é possível uma cobertura do genoma de 10 a 20 loci por espécie, porém é pouco polimórfico quando apresenta poucos alelos para um locus (BECERRA e PEREDES, 2000). Com o advento de novas tecnologias surgiram os marcadores mais avançados. Isso foi possível devido ao avanço das técnicas moleculares que possibilitaram a amplificação de DNA a partir da PCR (*Polymerase Chain*

*Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase), permitindo que os estudos destes marcadores se desenvolvessem.

Os marcadores moleculares mais utilizados na identificação de polimorfismos em estudos de análise da diversidade genética são AFLP, PCR-RFLP, RAPD, Microssatélites ou STR.

A técnica de AFLP está baseada na amplificação por PCR de um subconjunto de fragmentos que foram obtidos a partir da digestão do DNA genômico, utilizando enzimas de restrição do tipo II que clivam o DNA em sítios específicos. Um loco RFLP ou marcador RFLP, do inglês (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), pode ser definido como a combinação de uma enzima de restrição com uma sonda. Este marcador é codominante, pois os cromossomos homólogos podem apresentar fragmentos de um mesmo tamanho (genótipo homozigoto) ou não (genótipo heterozigoto) devido à variações no sítio de restrição da enzima (LOPES et al, 2002).

Outro marcador aplicado na identificação de polimorfismos, os RAPDs (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) com sequências aleatórias na amplificação por PCR, tendo como base os *indels* (inserções ou deleções) e as mutações ocorridas nos locais de hibridização dos *primers*, de modo que os padrões de bandas gerados serão altamente distintos. Esta técnica apresenta vantagens como a obtenção de resultados com maior rapidez e quantidade reduzida de DNA requerido, porém uma de suas desvantagens é a inconsistência dos dados obtidos devido a sua difícil reprodutibilidade (BECERRA e PEREDES, 2000). A dominância é uma diferença encontrada entre os marcadores RAPD e AFLP quando comparados aos marcadores izoenzimáticos e RFLPs, pois os primeiros não são capazes de revelar se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose (LOPES et al., 2002).

Um dos principais marcadores utilizados para estudos de caracterização de variabilidade genética, identificação individual, testes de paternidade, construção de mapas genéticos e estudos de genética de populações são os microssatélites ou STR (*Single Tandem Repeats*) (CAÑON et al., 2000).

### **2.3.1 Marcadores Moleculares Microssatélites**

Em genética de populações os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados, dentre estes se destacam os microssatélites, pois possuem elevado número de alelos, e sua codominância permite a identificação de genótipos heterozigotos em uma

população (BUCHANAN et al., 1996).

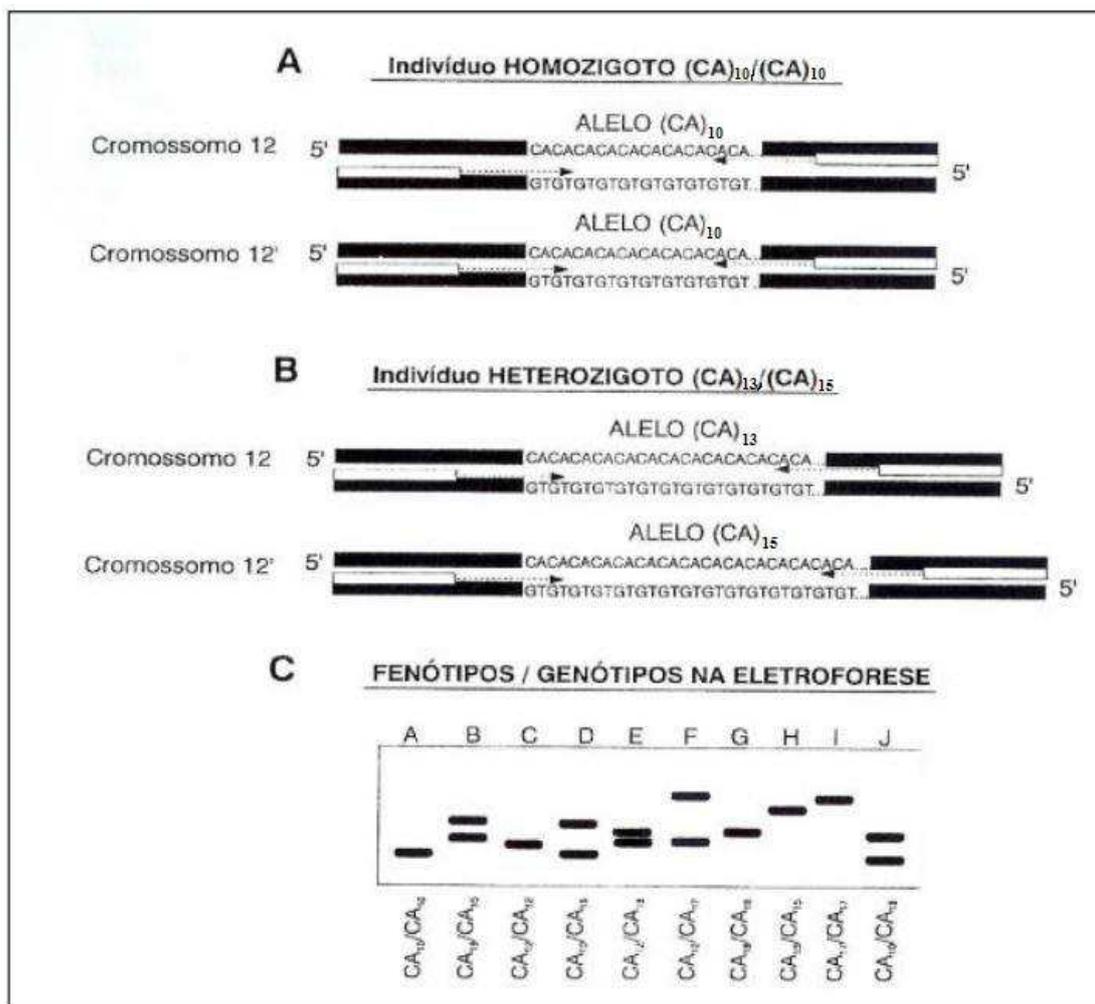
Os microssatélites, também conhecidos como SSRs ou STRs são sequências constituídas de uma a seis bases repetidas em tandem, ou seja, repetidas consecutivamente uma após a outra (HANCOCK, 1999), podem ser mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídicos, variando de acordo com o número de bases que os constituem. Estes marcadores possuem alta taxa de mutação, abundantes no genoma, neutralidade, e fácil automatização dos procedimentos analíticos, permitindo assim a estimação de diversidade genética entre e dentro de populações (LIGDA et al., 2009).

Os microssatélites são originados principalmente por deslizamentos da DNA polimerase e pelo crossing over desigual, sendo que ambos os mecanismos levam a uma constante inserção e deleção de sequências simples no genoma (TAUTZ e RENZ, 1984). Para o desenho destes marcadores, o primeiro passo é a construção de biblioteca genômica para o organismo de interesse, seguido da seleção e do sequenciamento completo de clones que apresentam sequências de microssatélites, e posteriormente a construção dos pares de primers específicos para as sequências únicas que foram selecionadas. A verificação do nível de polimorfismo destes marcadores pode ser visualizada por amplificação em reação de PCR (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998).

Estes marcadores apresentam vasta gama de aplicações em estudos com diferentes organismos. Deste modo, por detectarem genótipos heterozigotos, se apresentam como ferramenta molecular importante para a caracterização da variabilidade genética em populações, visto que o número de heterozigotos observados pode estimar os níveis de variabilidade. A presença do elevado grau de polimorfismo e da possibilidade em detectar ambos os alelos, permitem a sua utilidade na identificação individual, pois é pouco provável que dois indivíduos escolhidos ao acaso, quando analisados para uma série de marcadores compartilhem todos os seus alelos (ARANGUREN-MÉNDEZ et al, 2005).

Em genética de populações estes marcadores possuem grande aplicabilidade, pois além de permitirem estimar os níveis de variabilidade genética, também podem estimar as relações genéticas existentes entre as populações, elucidando questões sobre a diversidade genética, e sendo ferramentas importantes no desenvolvimento de estudos com espécies em perigo de extinção (ARANGUREN-MÉNDEZ et al, 2005). Muitos loci microssatélites estão localizados em regiões não codificadoras, entre os genes ou dentro de íntrons. Assim, por estarem localizados em regiões que podem não sofrer os efeitos da seleção natural, são seletivamente neutros e de grande utilidade em estudos de genética de populações naturais (EISEN, 1999).

A abundância dos microssatélites ao longo do genoma, o alto grau de polimorfismo e a codominância, são as principais características que tornam este marcador uma grande ferramenta para a análise genômica. Estes podem ser amplificados pela reação de PCR, utilizando-se primers com sequência de aproximadamente 20 a 30 bases, e que flanqueiem sequências específicas. Em espécies diplóides, a amplificação via PCR pode gerar um único fragmento (produto) no caso de o indivíduo ser homocigoto, ou dois fragmentos de tamanhos diferentes no caso de indivíduos heterocigotos. (KRUGLYAK et al., 1998). O resultado da amplificação pode ser visualizado em gel conforme demonstrado na Figura 4. Cada fragmento amplificado apresentado na eletroforese representa um alelo diferente do mesmo loco, assim indivíduos homocigotos que são formados por alelos iguais apresentam uma única banda no gel de eletroforese, ao contrário dos heterocigotos que por serem formados por alelos diferentes apresentam duas bandas (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998).



**Figura 4:** Representação esquemática de marcadores microssatélites. **A)** Genótipo homocigoto (alelos iguais), **B)** genótipo heterocigoto (alelos diferentes), ambos para uma

região genômica que compreende um microssatélite de elementos (CA) / (GT). C) Representação de gel de eletroforese de indivíduos diplóides, indicando diferentes genótipos homozigotos e heterozigotos. Fonte: FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998.

### 3. HIPÓTESE

Os efeitos oceanográficos alteram a conectividade entre as populações de *Palinurus elephas* contribuindo para a ocorrência de diferença genética entre as populações.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Gerar informações relativas à espécie *Palinurus elephas*, a fim de contribuir com planos de manejo reprodutivo desta espécie em áreas de conservação.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a variabilidade genética de uma população de *P. elephas* de Cullera na Espanha em diferentes períodos sazonais entre os anos de 2006 e 2009.

Realizar comparação entre a população de *P. elephas* de Cullera na Espanha e outras distribuídas ao longo do Atlântico e Mediterrâneo.

Avaliar a influência das barreiras oceanográficas na dispersão das espécies.

Avaliar marcadores moleculares microssatélites como ferramentas para estudos aplicados a genética de conservação.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local de coleta

As amostras de uma população de *Palinurus elephas* foram coletadas na região de Cullera, Espanha, no Mediterrâneo ocidental (WMED), (GPS: 39,1595°S-0,2094° N).

Indivíduos pertencentes a outras 9 populações de *P. elephas* distribuídas ao longo do Atlântico e Mediterrâneo também foram coletados nas seguintes localidades: Oban, na Escócia ocidental (WSCO); Galway, Irlanda ocidental (WIRE); Conquet, Bretanha (BRIT); Gijón, golfo de Biscaia (BISC); Sagres, sul de Portugal (SPOR); Cap de Creus, norte do Mediterrâneo ocidental (NWME); Túnis, Tunísia (TUNI); Isola delle Femmine, Sicília (SICI) e Dia, na Grécia (GREC) (Figura 5).



**Figura 5:** Locais de coleta das amostras no Mar Mediterrâneo e no Oceano Atlântico. Fonte: adaptado de PALERO e colaboradores, (2011a).

### 5.2 Amostras

Para as análises moleculares foram utilizados 163 amostras de tecido muscular da lagosta europeia (*P. elephas*) proveniente de Cullera, coletadas respectivamente ao verão (junho a agosto) e inverno (dezembro a fevereiro) dos anos de 2006, 2007, 2008 e 2009.

Foram atribuídos os códigos **VR** para as amostras de verão, e **IV** para amostras de inverno (Tabela 1).

**Tabela 1:** Períodos amostrais e número de indivíduos coletados da população de *Palinurus elephas* em Cullera ao longo dos anos 2006 a 2009.

<b>Períodos amostrais</b>	<b>Número de indivíduos coletados</b>
<b>IV06</b> – Inverno de 2006	24
<b>IV07</b> – Inverno de 2007	24
<b>IV08</b> – Inverno de 2008	24
<b>IV09</b> – Inverno de 2009	19
<b>VR06</b> – Verão de 2006	24
<b>VR07</b> – Verão de 2007	24
<b>VR08</b> – Verão de 2008	24

Para as análises estatísticas de atribuição e distância genética também foram utilizados os dados moleculares de 331 indivíduos provenientes de 10 populações de *P. elephas* distribuídas ao longo do Mediterrâneo e Atlântico, no qual também foi incluída uma amostragem da população de Cullera (WMED). Estes dados das 10 populações foram previamente analisados em estudos anteriores (PALERO, et al., 2011a).

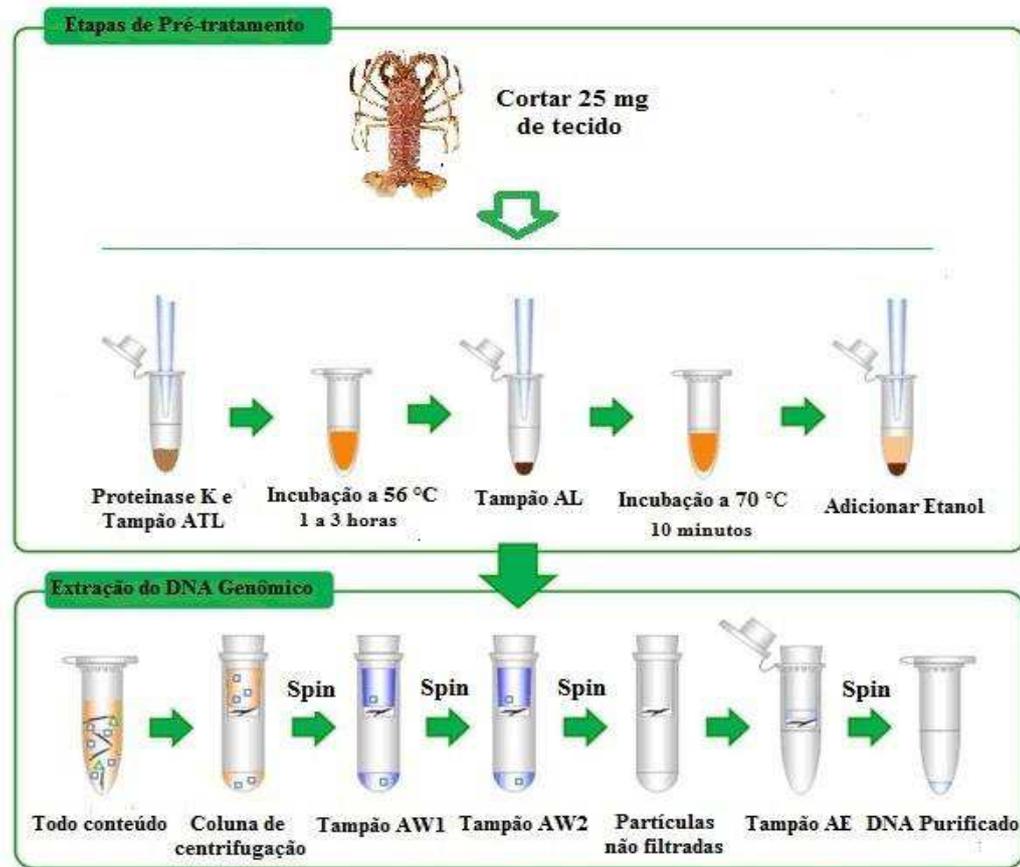
### 5.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração: QIAamp DNA mini Kit 250 (Qiagen), e depois o protocolo para análises de tecidos (Tissue Test Protocol) (Figura 6).

Para a etapa de pré tratamento, 25 mg de tecido muscular de cada amostra foram inseridos em tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, e em seguida foram adicionados 180 µl tampão ATL (tampão de lise de tecido) e 20 µl de proteinase K. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vortex e incubado a 56 °C (período variável de 1 a 3 horas de acordo com a lise do tecido).

Após a lise do tecido os tubos foram retirados da incubação e centrifugados. A estes foram adicionados 200 µl do tampão AL, utilizado durante o processo de isolamento do DNA. Os tubos foram então incubados a 70 °C por um período de 10 minutos, e após a incubação, foi adicionado a cada tubo 200 µl de etanol (96-100%). Na extração do DNA genômico, o conteúdo dos tubos de microcentrifuga foi passado para a coluna de filtração QIAamp

inserida em um tubo de coleta de 2 ml, e em seguida centrifugado a 8000 rpm (rotações por minuto) durante 1 minuto. A coluna de filtração foi passada a um novo tubo de coleta de 2 ml, e o tubo contendo o filtrado foi descartado.



**Figura 6:** Esquema das etapas da Extração de DNA. Fonte: Adaptado de BIONNER, 2012.

Ao passo seguinte a coluna passou sucessivamente por duas lavagens utilizando os tampões AW1 e AW2. Foi então adicionado 50 µl de tampão AE na coluna, e a mesma foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, após, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm durante 1 minuto. O conteúdo filtrado, neste caso eluído a partir do tampão AE e contendo o DNA purificado foi armazenado a -20 °C. A qualidade do Dna extraído foi avaliada em eletroforese com gel de agarose a 1,5%.

#### 5.4 Amplificação em PCR multiplex

O DNA foi amplificado por reação de PCR multiplex em termociclador 2720 Applied Biosystems. O procedimento de PCR multiplex permite a amplificação simultânea de

múltiplas regiões do DNA em uma única reação, gerando fragmentos em pares de base (produtos) com diferentes tamanhos.

Para a amplificação das amostras foram utilizados 11 loci microssatélites descritos na Tabela 2: Pael 10, Pael 11, Pael 12, Pael 14, Pael 20, Pael 21, Pael 28, Pael 31, Pael 48, Pael 49 e Pael 53 (PALERO e PASCUAL, 2008). As sequências *Forward* foram marcadas por um dos corantes fluorescentes (fluoróforos): HEX (6-carboxy-2',4'7',4,7-hexaclorofluoresceína) que emite fluorescência verde, FAM (6- carboxifluoresceína) que emite fluorescência azul, ou NED (2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-tricloro-5- carboxifluoresceína) que emite fluorescência amarela. Com a utilização de corantes fluorescentes diferentes, loci que geram fragmentos com sobreposição de tamanho em pares de bases da sequência, podem ser analisados em conjunto, porém identificados individualmente, devido às características distintas de cada fluoróforo na emissão dos espectros (MAYRAND et al., 1992).

Para as reações de amplificação (PCR) foram montados três conjuntos multiplex, o conjunto A1 com os oligonucleotídeos iniciadores Pael 10; 11; 12; 14; 20, o conjunto A2 com Pael 31 e 53, e o conjunto B com Pael 21; 28; 48 e 49. As reações de amplificação foram preparadas contendo um volume final de 10 µl, consistindo de 30 ng de DNA genômico, 5 µl do kit multiplex PCR (Qiagen), 2 µl de água ultrapura e 2 µl do conjunto de primers (1 mM) específicos de cada reação. O perfil térmico da PCR prosseguiu com um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguido por 27 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 40 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos. Ao final dos 27 ciclos realizou-se uma extensão final a 60 °C durante 20 minutos, e ao término do processo as amostras foram resfriadas a 4 °C.

O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™, utilizando 3 µl do produto da amplificação e 3 de µl de tampão de eletroforese (corrida). As reações de amplificação foram então diluídas dez vezes em água ultra-pura e armazenadas.

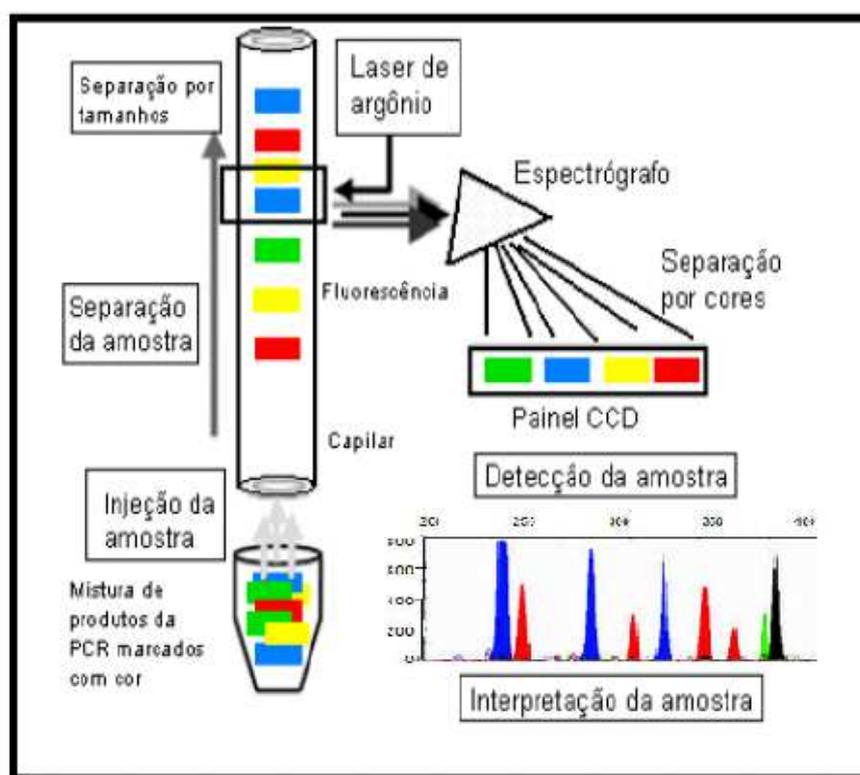
**Tabela 2:** Informações referente aos oligonucleotídeos iniciadores (primers), número de acesso ao Genbank, tamanho dos produtos, fluoróforos, grupos multiplex, número de repetição e sequências *Foward* e *Reverse*.

<b>Oligonucleotídeo iniciador/ Número de acesso Genbank</b>	<b>Tamanho do Produto (pb)</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Grupo Multiplex</b>	<b>Repetição em tandem</b>	<b>Sequências (5'-3') F: <i>Foward</i> / R: <i>Reverse</i></b>
<b>Pael 10 / EU525181</b>	237 – 246	Amarelo	A1	2	F: NED-TGCAGACTTGATTGGAGGGCAG R: GCTAGTGGAGATACGAGTGGTCC
<b>Pael 11 / EU525182</b>	268 – 280	Azul	A1	3	F: 6-FAM-CGACACACAAAAGACTACGG R: TTCGCCTCCGTAGACCTGTGAGC
<b>Pael 12 / EU525184</b>	154 – 234	Verde	A1	4	F: HEX-ACTCTCTGAAAATCGTTTCGGGG R: CGGGTCACATGTGTGAGGCATGC
<b>Pael 14 / EU525186</b>	130 – 199	Amarelo	A1	4	F: NED-AGGTTATTACATGACCAACAGCC R: ATCTCTCCCCTGGTGGTCAGC
<b>Pael 20 / EU525175</b>	326 – 370	Azul	B	2	F: 6-FAM-TCCAGTGTATGTTAGCCCTCACG R: ACACCACAGGTTATGGCAGTACC
<b>Pael 21 / EU525185</b>	237 – 329	Verde	B	4	F: HEX-GCGTCCTTTACTCTCGGATCCCC R: ACTGCATCCACGTCACACAC
<b>Pael 28 / EU525172</b>	243 – 263	Amarelo	B	2	F: NED-AGTCACATGTATCGTCCGGT R: TGTCTGCCCAAACAGAGTCAGG
<b>Pael 31 / EU525183</b>	362 – 435	Verde	A2	4	F: HEX-ACGTGAAGACATCCTGCCCAAG R: AGGGAGGAAAAGACACTGAGGGG
<b>Pael 48/ GQ401341.1</b>	140 – 180	Amarelo	B	3	F: NED-ACTGGTGCAAGTCCCTTTTG R: GCTATCGGCAACAAAAGAACAAC
<b>Pael 49 / EU525179</b>	214 – 267	Azul	B	3	F: 6-FAM-TGCAGTGAACAAAACCTCGTCCC R: ACCTACAACATCCACCAACCG
<b>Pael 53 / EU525178</b>	163 – 186	Azul	A2	2	F: 6-FAM-TGCCTCGTATCGTGAAGACA R: CTGAAATTGAGGCAGTCACG

## 5.5 Análise dos fragmentos

Para análise de discriminação alélica dos fragmentos, os produtos amplificados foram aplicados e submetidos a eletroforese capilar. As amostras continham 1,3  $\mu\text{l}$  do produto da diluição da amplificação, 0,3  $\mu\text{l}$  do marcador CST Rox 70-500 (BioVentures Inc.) e 12,7  $\mu\text{l}$  de formamida.

As regiões amplificadas foram então submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3770 dos serviços científicos técnicos da Universitat de Barcelona. Nesta etapa (Figura 7), as amostras migram através de um capilar e passam por um feixe de laser que rastreia o gel excitando as moléculas marcadas com os fluoróforos, estes então emitem comprimentos de onda específicos para cada marcador utilizado. Como controle foi utilizado um padrão interno com fragmentos de DNA conhecidos e marcados com outro corante (TANG e TO, 2006), que no caso foi CST Rox. A geração de comprimentos de onda diferentes através dos fluoróforos permitiu a análise simultânea de distintos produtos da amplificação.



**Figura 7:** Esquema das etapas de funcionamento da Eletroforese Capilar em Sequenciador Automático. Fonte: adaptado de PENA, 2010.

A utilização de um marcador de padrão interno forneceu um controle para comparação

das faixas de espectros geradas (KASHYAP et al., 2004). Assim, os alelos foram dimensionados através do software PEAKSCANNER v. 1.0 (Applied Biosystems), utilizando como padrão interno o marcador de CST Rox 70-500. O ajuste dos alelos é um processo utilizado para reduzir os efeitos que podem diminuir o desempenho de alguns métodos analíticos em genética (BROMAGHIN e CRANE, 2005). No caso, o ajuste alélico foi determinado utilizando MICROSATELLIGHT, versão 1.0 (PALERO et al., 2011b).

## 5.6 Análise estatística

O número total de alelos e o número médio de alelos foram calculados utilizando o programa GENECLASS2. A heterozigotidade média esperada ( $H_E$ ) e a observada ( $H_O$ ) foram estimadas a partir de MICROSATELLITE TOOLKIT, versão 3.1.1 (PARK, 2011). O coeficiente de consanguinidade ( $F_{IS}$ ) na população de Cullera, e a distância genética (aproximação  $F_{ST}$ ) entre a população estudada com as 10 populações previamente analisadas foram estimadas a partir das estatísticas F de Wright utilizando o software GENEPOP versão 4.0.7 (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

### 5.6.1 Teste de atribuição da população

O teste de atribuição foi realizado através do software GENECLASS2, a partir do método Bayesiano descrito por Rannala e Moutain (1997). Para o teste foram utilizadas 10 populações de *P. elephas* previamente analisadas (PALERO et al., 2011a), as populações foram provenientes das seguintes localidades: Oban, na Escócia ocidental (WSCO); Galway, Irlanda ocidental (WIRE); Conquet, Bretanha (BRIT); Gijón, golfo de Biscaia (BISC); Sagres, sul de Portugal (SPOR); Cullera, no Mediterrâneo ocidental (WMED Cap de Creus, norte do Mediterrâneo ocidental (NWME); Túnis, Tunísia (TUNI); Isola delle Femmine, Sicília (SICI) e Dia, na Grécia (GREC). No teste, foram atribuídos apenas os indivíduos dos sete grupos amostrais da população de Cullera que apresentaram similaridade genética acima de 80% com alguma das populações de origem.

## 6. RESULTADOS

Os resultados demonstraram que a população de Cullera possui grande riqueza genética, sendo encontrados 397 alelos, com tamanhos de fragmentos que variaram de 130 a 435 pares de base para os 11 loci analisados. O número médio de alelos das amostras provenientes de diferentes épocas foi de 9.50 (Tabela 3).

Os resultados referentes a heterozigosidade (Tabela 3), indicaram que os valores de heterozigosidade observada foram menores que os valores de heterozigosidade esperada durante todo o período de quatro anos. Os valores para o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) variaram de 0,043 a 0,228, e foram considerados significativos a um  $P$ -value de 0,05. Os valores do conteúdo de informação polimórfica médios (Tabela 4) foram de moderados a altos (0,27 a 0,88), de acordo com BOLSTEIN e colaboradores, 1980. Pode ser constatado também que os valores para a heterozigosidade observada variaram durante os períodos dos 4 anos de estudo, demonstrando assim estar ocorrendo pequena variação no número de heterozigotos na população durante este período (Figura 8).

Os resultados do teste de significância  $F_{ST}$  (Figura 9 e 10), estimados para avaliar a diferenciação genética entre as populações, demonstraram que os valores mais baixos de distância genética foram para as populações do Mediterrâneo (WMED e NWME).

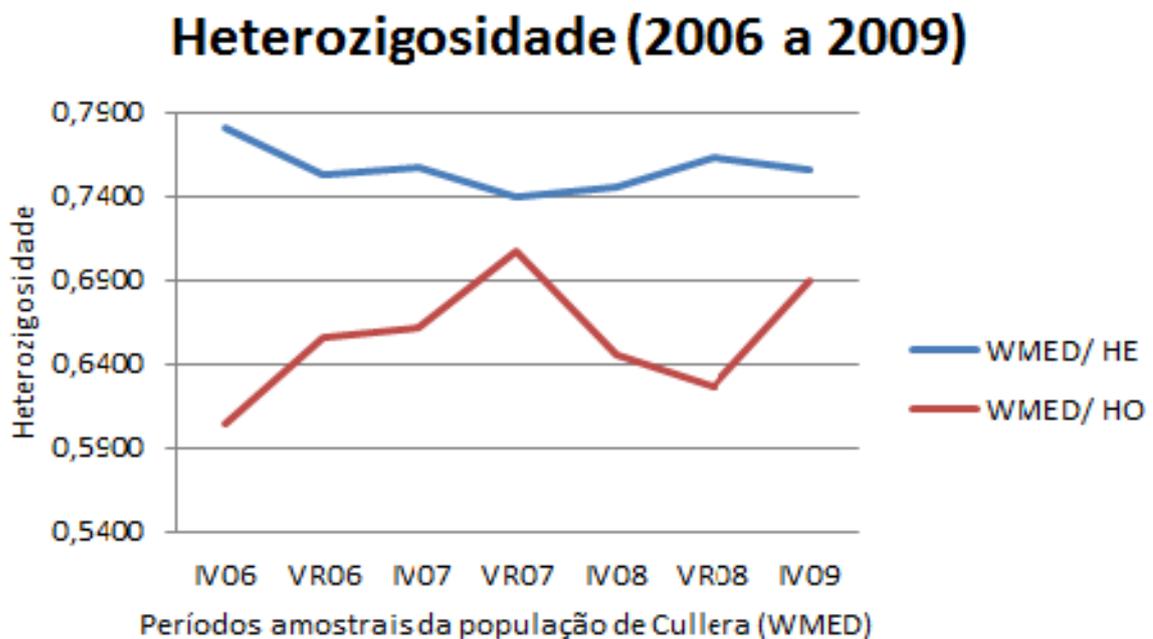
**Tabela 3:** Número de amostras ( $N$ ), número médio de alelos ( $N_A$ ), heterozigosidade média observada ( $H_O$ ) e heterozigosidade média esperada ( $H_E$ ), e coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).

Amostras	$N$	$N_A$	$H_O \pm DP$	$H_E \pm DP$	$*F_{IS}$
<b>VR06</b>	24	10,18	0,6042 $\pm$ 0,030	0,7800 $\pm$ 0,052	0,228
<b>IV06</b>	24	10,00	0,6558 $\pm$ 0,030	0,7521 $\pm$ 0,064	0,043
<b>VR07</b>	24	9,09	0,6616 $\pm$ 0,030	0,7569 $\pm$ 0,062	0,131
<b>IV07</b>	24	9,27	0,7079 $\pm$ 0,029	0,7388 $\pm$ 0,068	0,133
<b>VR08</b>	24	9,55	0,6456 $\pm$ 0,031	0,7452 $\pm$ 0,062	0,121
<b>IV08</b>	24	9,73	0,6259 $\pm$ 0,032	0,7631 $\pm$ 0,066	0,179
<b>VR09</b>	16	8,73	0,6894 $\pm$ 0,035	0,7560 $\pm$ 0,062	0,086

\* Valores de  $F_{IS}$  foram significativos ( $P < 0,05$ ) para todos os períodos.

**Tabela 4:** Conteúdo de informação polimórfica (PIC) por marcador dos 11 loci microssatélites das amostras avaliadas em diferentes períodos

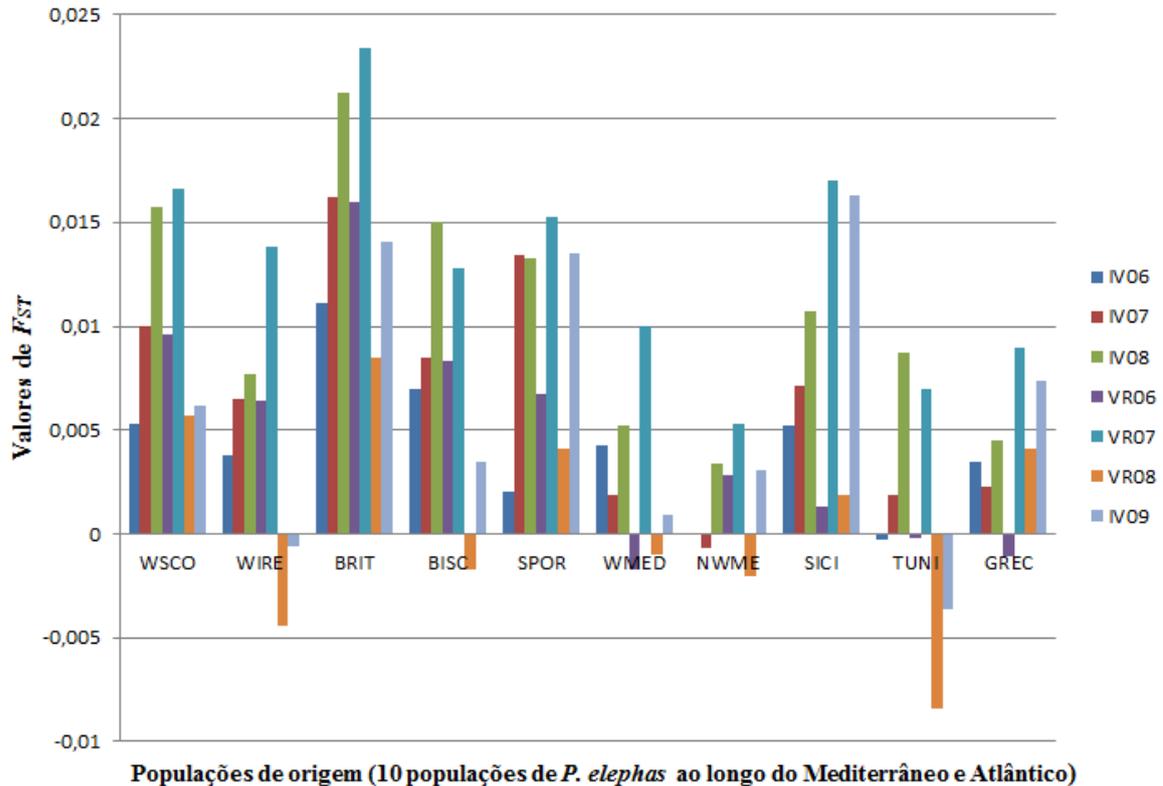
Loci	Amostras							Média (PIC)
	VR06	IV06	VR07	IV07	VR08	IV08	IV09	
<b>PE10</b>	0,30	0,26	0,21	0,23	0,24	0,36	0,29	<b>0,27</b>
<b>PE11</b>	0,54	0,54	0,50	0,66	0,43	0,63	0,42	<b>0,53</b>
<b>PE12</b>	0,89	0,87	0,88	0,86	0,90	0,88	0,89	<b>0,88</b>
<b>PE14</b>	0,88	0,89	0,87	0,84	0,87	0,87	0,86	<b>0,86</b>
<b>PE20</b>	0,78	0,71	0,63	0,72	0,53	0,68	0,68	<b>0,67</b>
<b>PE21</b>	0,87	0,85	0,89	0,86	0,89	0,89	0,89	<b>0,87</b>
<b>PE28</b>	0,83	0,81	0,80	0,80	0,82	0,82	0,78	<b>0,80</b>
<b>PE31</b>	0,87	0,86	0,84	0,84	0,84	0,87	0,83	<b>0,85</b>
<b>PE48</b>	0,53	0,37	0,50	0,30	0,54	0,22	0,39	<b>0,40</b>
<b>PE49</b>	0,80	0,84	0,80	0,84	0,82	0,87	0,84	<b>0,83</b>
<b>PE53</b>	0,75	0,79	0,83	0,70	0,74	0,76	0,77	<b>0,76</b>



**Figura 8:** Heterozigosidade média esperada (Ho) (azul) versus a observada (He) (vermelho) na população ao longo do período de 2006 a 2009.

AMOSTRAS	WSCO	WIRE	BRIT	BISC	SPOR	WMED	NWME	SICI	TUNI	GREC	IV06	IV07	IV08	VR06	VR07	VR08	IV09
WSCO																	
WIRE	0,0001																
BRIT	-0,0006	0,0020															
BISC	-0,0014	-0,0007	0,0019														
SPOR	0,0015	0,0048	0,0094	0,0053													
WMED	0,0083	0,0033	<b>0,0110</b>	0,0042	<b>0,0110</b>												
NWME	0,0087	-0,0001	<b>0,0114</b>	0,0078	0,0040	0,0051											
SICI	0,0042	0,0063	0,0066	-0,0057	0,0098	-0,0008	0,0102										
TUNI	0,0047	-0,0055	0,0070	0,0034	0,0005	0,0064	-0,0030	0,0130									
GREC	0,0096	0,0096	<b>0,0141</b>	<b>0,0162</b>	<b>0,0171</b>	0,0075	0,0046	<b>0,0124</b>	0,0031								
IV06	0,0053	0,0038	<b>0,0111</b>	0,0070	0,0020	0,0043	0,0000	0,0052	-0,0003	0,0035							
IV07	0,0100	0,0065	<b>0,0162</b>	0,0085	<b>0,0134</b>	0,0019	-0,0007	0,0071	0,0019	0,0023	-0,0025						
IV08	<b>0,0157</b>	0,0077	<b>0,0212</b>	<b>0,0150</b>	<b>0,0133</b>	0,0052	0,0034	<b>0,0107</b>	0,0087	0,0045	-0,0018	-0,0004					
VR06	0,0096	0,0064	<b>0,0160</b>	0,0083	0,0067	-0,0017	0,0028	0,0013	-0,0002	-0,0011	-0,0030	-0,0017	-0,0040				
VR07	<b>0,0166</b>	<b>0,0138</b>	<b>0,0234</b>	<b>0,0128</b>	<b>0,0153</b>	0,0100	0,0053	<b>0,0170</b>	0,0070	0,0090	0,0046	0,0043	0,0090	0,0001			
VR08	0,0057	-0,0044	0,0085	-0,0017	0,0041	-0,0010	-0,0020	0,0019	-0,0084	0,0041	-0,0013	-0,0002	-0,0014	-0,0054	0,0009		
IV09	0,0062	-0,0006	<b>0,0141</b>	0,0035	<b>0,0135</b>	0,0009	0,0031	<b>0,0163</b>	-0,0036	0,0074	0,0039	0,0014	0,0095	0,0006	0,0069	-0,0034	

**Figura 5:** Matriz de similaridade genética (valores de  $F_{ST}$ ) entre as amostras de Cullera (2006 a 2009) com as outras 10 populações analisadas com referência aos 11 loci marcadores. Os resultados apresentando maior distância genética entre as populações estão representados em vermelho.



**Figura 11:** Resultados de  $F_{ST}$  na comparação da distância genética de indivíduos de Cullera com outras 10 populações de *P. elephas*.

Os resultados ainda evidenciaram diferenciação genética das amostras da população de Cullera com as populações localizadas no Atlântico, Escócia, Bretanha, Irlanda e Biscaia (WSCO, BRIT, WIRE e BISC, respectivamente), (Figura 10). Quando realizado o teste de comparação da distância genética com as amostras de Cullera de 2006 a 2009 entre si (Tabela 5), constatamos que os valores para  $F_{ST}$  foram baixos, confirmando assim não haver distância genética entre indivíduos da mesma população durante o período.

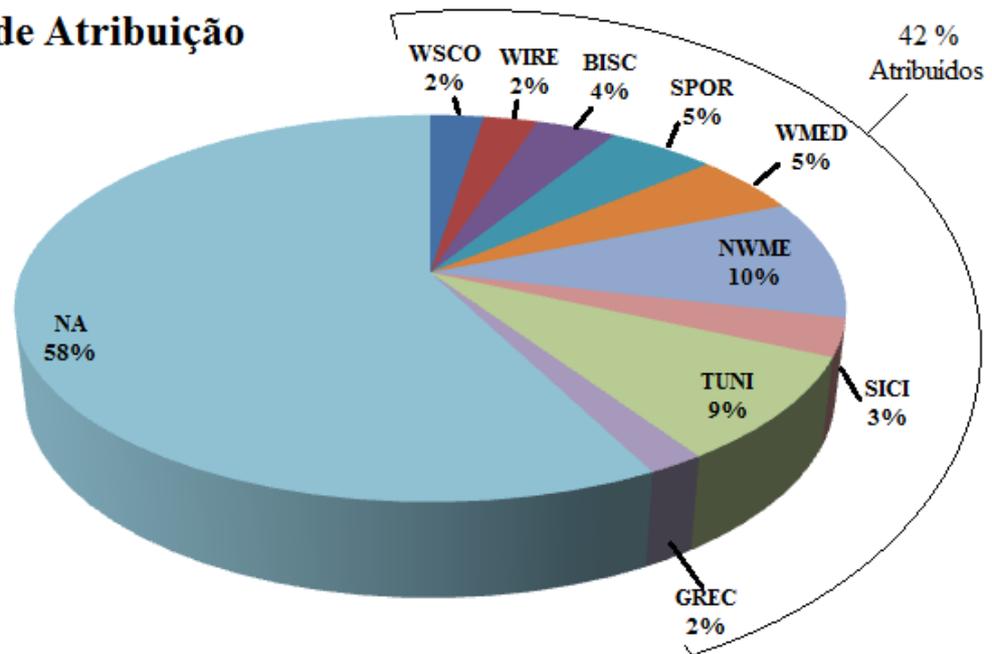
**Tabela 5:** Matriz com valores de  $F_{ST}$  comparando a distância genética das amostras de Cullera (2006 a 2009).

	<b>IV06</b>	<b>IV07</b>	<b>IV08</b>	<b>VR06</b>	<b>VR07</b>	<b>VR08</b>	<b>IV09</b>
<b>IV06</b>							
<b>IV07</b>	-0,0025						
<b>IV08</b>	-0,0018	-0,0004					
<b>VR06</b>	-0,0003	-0,0017	-0,0004				
<b>VR07</b>	0,0046	0,0043	0,0009	0,0001			

<b>VR08</b>	-0,0013	-0,0002	-0,0014	-0,0054	0,0009	
<b>IV09</b>	0,0039	0,0014	0,0095	0,0006	0,0069	-0,0034

Quando analisada as amostras de Cullera em conjunto (Figura 12), por meio do teste de atribuição, foi possível atribuir 42% dos indivíduos a alguma das populações de origem: Oban, na Escócia ocidental (WSCO); Galway, Irlanda ocidental (WIRE); Conquet, Bretanha (BRIT); Gijón, golfo de Biscaia (BISC); Sagres, sul de Portugal (SPOR); Cullera, no Mediterrâneo ocidental (WMED Cap de Creus, norte do Mediterrâneo ocidental (NWME); Túnis, Tunísia (TUNI); Isola delle Femmine, Sicília (SICI) e Dia, na Grécia (GREC). Enquanto, 58% dos indivíduos não foram atribuídos a nenhuma população (NA). Os resultados da atribuição foram mais elevados para populações de NWME e TUNI, localizadas na bacia do Mediterrâneo ocidental.

### Teste de Atribuição



**Figura 12:** Atribuição dos indivíduos de Cullera (pertencentes a todos os períodos amostrais entre 2006 e 2009) a alguma das 10 populações de origem utilizadas no estudo. NA foram os indivíduos não atribuídos a nenhuma das populações.

## 7. DISCUSSÃO

Os dados moleculares são ferramentas de extrema importância para o desenvolvimento de planos para a preservação de espécies em perigo de extinção ou que estejam submetidas a super exploração. Estas necessitam de estratégias de conservação não somente para evitar a perda no seu tamanho populacional, mais também a perda de sua variabilidade genética. Um parâmetro importante na tomada de decisões em programas de conservação é a riqueza alélica, gerada pelo número de alelos que estão segregando em uma determinada população (CABALLERO et al., 2010). Neste trabalho foi encontrada grande riqueza alélica na população de Cullera, com média de alelos de 9.50. Este resultado é semelhante aos descritos por Palero e colaboradores (2011a) que encontrou média de alelos de 11,02 para 10 populações de *Palinurus elephas* distribuídas ao longo do Atlântico e Mediterrâneo.

Oscilações com perda e ganho do número médio de alelos (variando de 8,73 a 10,18) foram observadas ao longo dos sete períodos avaliados dentro da população de Cullera. Este resultado pode ter ocorrido devido à oscilação genética ocorrida na população, já que a mesma possui forte influência sobre a frequência alélica ao longo do tempo, causando mudanças no número de alelos (TEMPLETON, 2011).

Os níveis de variabilidade genética de uma população podem ser medidos através da heterozigosidade observada e também podem ser verificados através da sua diversidade alélica (MOREIRA et al., 2007), sendo assim, a população em estudo apresentou nível de variabilidade genética considerável, apresentando um total de 397 alelos para todos os locos estudados em todas amostras da população.

Os dados de heterozigosidade observada foram encontrados valores inferiores ao esperado, sugerindo aumento no número de homozigotos na população. Palero e colaboradores (2011a) de maneira similar a este estudo e avaliando a mesma população de *P. elephas*, porém utilizando indivíduos diferentes coletados em outra época, também encontraram valores de heterozigosidade observada menores que a esperada.

Os valores de heterozigosidade observada ao longo do inverno e verão dos quatro anos em estudo demonstraram não estar ocorrendo perda da variabilidade genética, assim, a população esta mantendo o número de heterozigotos, porém com pequenas oscilações durante os períodos. Durante os anos de 2006 e 2007 houve aumento da heterozigosidade, seguido de um decréscimo em 2008, e novamente de um aumento no ano de 2009, gerando assim consequentemente aumento na variabilidade genética. Assim, apesar da diferença entre heterozigosidade esperada e observada, os valores de heterozigosidade observada se

mantiveram constantes ao longo do tempo. Palero e colaboradores (2010) descrevem valores de heterozigosidade observada próximos a 0,642 que também se aproximam dos valores encontrados neste trabalho, desta forma pode-se constatar que a população de Cullera possui consideráveis níveis de variabilidade genética, visto que em uma população a heterozigosidade observada indica a variação genética, que é a porcentagem de indivíduos que são heterozigotos para um loco gênico (SOLÉ-CAVA 2001).

O coeficiente de endogamia é um importante parâmetro a ser estimado, pois a endogamia afeta diretamente a diversidade genética das populações, este parâmetro foi introduzido por Wright (1951). Os resultados deste trabalho demonstraram que população de Cullera apresentou valores significativos para o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) em todos os períodos, com valor mais elevado ao verão de 2006 (VR06). A endogamia leva a geração de um número maior de homozigotos na população, assim, este resultado pode ser comparado a heterozigosidade observada, que quando visualizado os sete períodos amostrais, apresentou o menor valor no verão de 2006, demonstrando assim haver excesso de homozigotos neste período, e confirmando haver correlação entre o coeficiente de endogamia e o número de heterozigotos na população. Este resultado pode estar sendo gerado pelo acasalamento entre indivíduos parentais na população, levando assim a geração de um número maior de homozigotos.

Os marcadores foram polimórficos quando calculado o PIC (conteúdo de informação polimórfica), segundo Bolstein e colaboradores (1980), o PIC pode ser utilizado como um indicador de qualidade do marcador para estudos genéticos, e podem ser classificados em muito informativos com valores superiores a 0,50, mediantemente informativos entre 0,25 e 0,50 e pouco informativos com valores inferiores a 0,25. Desta forma os resultados demonstram que os marcadores foram de médio a altamente informativos com valores de 0,27 a 0,88, e permitiram estimar parâmetros de diversidade e diferenciação genética.

A distribuição da diversidade genética em ambientes aquáticos, assim como em ambientes terrestres, esta ligada e mantida principalmente por barreiras a dispersão das espécies. Os movimentos de espécies no mar principalmente em seus estágios larvais são influenciados por processos oceanográficos, tais como sistemas de ressurgência, frentes, convergências em movimento, vórtices e correntes, que podem levar à dispersão por centenas de quilômetros.

De acordo com Hartl e Clark (1997) os resultados da significância de  $F_{ST}$  para distância genética podem ser interpretados da seguinte forma: os valores de 0 a 0,05 indicam baixa, 0,05 a 0,15 média, 0,15 a 0,25 alta, e valores acima de 0,25 expressam elevada

diferenciação genética. Assim, os resultados para a diferenciação genética entre as populações (Figura 9) indicaram distância genética entre populações do Mediterrâneo e do Atlântico, formando dois subgrupos. Algumas amostras de Cullera (Mediterrâneo) apresentaram alta diferenciação genética com as populações do Atlântico, sendo as amostras do verão de 2007 as mais diferenciadas principalmente com as populações de Escócia, Bretanha e Biscaia (Atlântico), com valores de  $F_{ST}$  0,166; 0,234; 0,0153, respectivamente. A diferença pode estar relacionada a dificuldade ou a redução no movimento de dispersão larval e conseqüentemente no fluxo de genes entre populações destes dois ambientes, eventos determinados pela dificuldade em se passar as barreiras: frente Almería- Orán e o Estreito de Gibraltar (Figura 11 e 12).



**Figura 11:** Localidade das 10 populações de *P. elephas* comparadas no teste de distância genética. E barreiras oceanográficas: EG (Estreito de Gibraltar), AOF (Frente de Almería-Orán) e SOS (Estreito da Sicília). Fonte: adaptado de PALERO e colaboradores, 2011a.

Estudos observaram maior variabilidade sazonal no inverno no Mar Mediterrâneo, levando a formação de correntes marítimas e turbilhões mais intensos (BOSSE et al., 2013),

que levam a formação de vórtices na superfície do mar levando a retenção das larvas, e consequentemente, este fato pode estar relacionado as amostras de Cullera se encontrarem diferenciadas quando comparada as outras populações. No período do verão normalmente ocorre número maior de turbilhões do que em outras épocas do ano, assim seria explicado o fato de amostras de verão, como a do verão de 2007, apresentarem-se também diferenciadas das demais populações.



**Figura 12:** Esquema desenho da frente de Almería Orán e da corrente da Argélia. Fonte: adaptado de TINTORÉ e colaboradores, 1988.

Estes efeitos oceanográficos já foram observados em estudos com espécies de peixes, Naciri e colaboradores (1999) já relatavam a diferença genética entre populações de robalo (*Dicentrarchus labrax*) do Mar do Norte, Bretanha, Portugal, Marrocos, Mar de Alborán e do Mediterrâneo ocidental, estimando a partir das frequências alélicas de 6 locos microssatélites. Viñas e colaboradores em 2006 também relataram a diferença genética entre populações de peixe espada do Mediterrâneo e do Atlântico, demonstrando que a Almería-Orán poderia ser

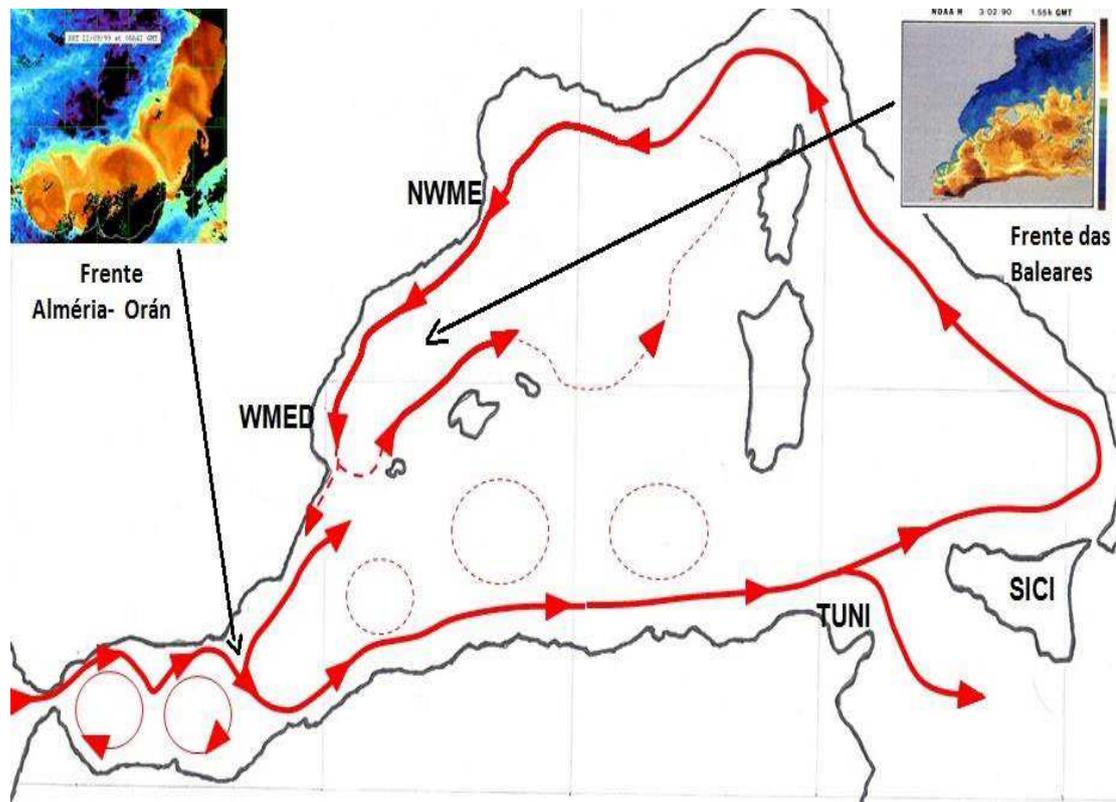
uma barreira à dispersão e ao fluxo de genes. Em lagostas, a diferença genética entre populações de *Palinurus elephas* provenientes do Atlântico e do Mediterrâneo, foram avaliadas por meio de uma parcela da região controle do gene mitocondrial e também por sete marcadores microssatélites, com os resultados foi possível observar que as populações do Atlântico e Mediterrâneo formavam dois grupos genéticos distintos, demonstrando haver diferenças genéticas entre populações destas duas regiões (BABBUCI et al., 2010).

As pequenas diferenças genéticas encontradas entre populações do Mediterrâneo ocidental e oriental podem ser explicadas pelas influências do Estreito da Sicília na dispersão larval e na migração das espécies (PATTARNELO et al., 2007). A baixa diferença genética entre a população de Cullera e as populações da bacia do Mediterrâneo ocidental (NWMED e TUNI), deve-se ao fato estarem localizadas mais próximas geograficamente, e também ao levante de águas no leste do Mediterrâneo que poderia através da formação de redemoinhos e giros oceanográficos estar causando isolamento das larvas nestas regiões, e impedindo a dispersão para outras áreas do Mediterrâneo e também para o Atlântico. Estes giros e redemoinhos podem chegar a durar vários meses ou anos, como é o caso da corrente da Argélia no Mediterrâneo, que chega a durar um período de 3 anos, e causa a retenção das larvas que possuem longo período de duração da fase planctônica (PUILLAT et al., 2002) (Figura 11). Assim, estes efeitos juntamente com outras barreiras a dispersão podem contribuir para a diferenciação genética entre as populações.

Comparando as 10 populações de origem com os indivíduos dos sete períodos amostrais da população de Cullera (Figura 9 e 10), foi possível observar que as diferenças entre Atlântico e Mediterrâneo são evidenciadas na maioria das amostras, tanto no verão quanto no inverno entre os anos de 2006 a 2009, com exceções do verão de 2008 para Irlanda e golfo de Biscaia e do inverno de 2009 para Irlanda. Os sete períodos amostrais apresentaram menor diferença com populações do Mediterrâneo, com exceção de Sicília, principalmente ao verão de 2007 e ao inverno de 2009. Os resultados demonstram que embora sejam influenciadoras da dispersão larval e que comprometem a conectividade das espécies marinhas, as correntes, não se comportam de maneira semelhante em todas as estações, ou seja, não são constantes. Isto ocorre principalmente pelo fato de que o maior efeito influente na formação das correntes são as massas de ar, e estas apresentam características próprias que se diferenciam conforme as condições do ambiente. Além de haver também a existência de turbilhões instáveis que ocorrem na circulação do Mar Mediterrâneo nos diferentes períodos do ano.

Com o teste de atribuição foi observado que a população de Cullera se aparenta mais

com as populações do norte do Mediterrâneo e de Tunísia, conseqüentemente por estarem localizadas mais próximas de si geograficamente, e por não sofrerem efeitos de barreiras como a frente de Almería-Orán ou do Estreito da Sicília (Figura 11). Deve ser considerado ainda que as três populações estão na bacia formada no Mediterrâneo ocidental (Figura 13), e que correntes oceanográficas poderiam estar causando retenção das larvas nesta bacia, impedindo a dispersão desta espécie para outras regiões. Pattarnelo e colaboradores (2007) evidenciaram os efeitos do Estreito da Sicília como barreira ao fluxo de genes de algumas espécies, conseqüentemente levando a diferenciação genética entre as populações. Estudos com *P. elephas* também vem demonstrando que os efeitos do Estreito da Sicília desempenham um papel fundamental na diferenciação de populações desta espécie (PALERO et al., 2011a).



**Figura 13:** Mapa de correntes formadas na bacia do Mar Mediterrâneo ocidental. Os círculos compostos de traços indicam a formação de turbilhões, e as linhas com setas a formação da corrente principal. Fonte: adaptado de PATARNELO e colaboradores, 2007; GALARZA e colaboradores, 2008.

Neste estudo não foi evidenciado forte efeito da frente das Baleares na diferenciação genética em *P. elephas*, visto que a população de Cullera (WMED) e a do norte do Mediterrâneo (NWMED), que são as que estão submetidas a influência desta barreira (Figura

13) não demonstraram estar diferenciadas geneticamente.

O teste de atribuição é um método que determina às populações mais propensas a terem originado um indivíduo, ou seja, determina a origem dos indivíduos. Os valores mais baixos de atribuição foram observados nas populações do Atlântico, indicando novamente efeitos de barreiras como a AOF e de correntes marítimas na conectividade destas populações, principalmente do levante ocorrente no leste do Mediterrâneo. No total um número alto de indivíduos não foi atribuído a nenhuma população, este resultado pode ter sido gerado pela escolha do nível de confiança (*P-value*) dos resultados, pois o desempenho do método é fortemente influenciado pelo valor de confiança.

Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados em um estudo desenvolvido com uma população de *P. elephas* localizada ao noroeste do Mediterrâneo, utilizando 10 marcadores microssatélites semelhantes aos empregados neste estudo. Foi possível atribuir 117 indivíduos a população de referência (população de *P. elephas* localizada no noroeste do Mediterrâneo) em um total de 238 amostras estudadas, ou seja, aproximadamente 50%, quando assumido um *P-value* de 0,05, (ELPHIE et al., 2012).

Os marcadores microssatélites utilizados demonstraram ser uma excelente ferramenta no estudo da variabilidade genética desta população, e na elucidação dos padrões de conectividade com as outras populações avaliadas. Desta forma foi possível gerar resultados que levaram a identificação de algumas barreiras ao fluxo de genes, e que podem contribuir para a diferenciação genética entre populações da mesma espécie. Compreender este padrão de conectividade entre as populações é fundamental para se entender os ciclos de vida marinha, e assim desenvolver planos para espécies em perigo de extinção (ELPHIE et al., 2012).

## 8. CONCLUSÕES

A população em estudo apresentou variabilidade genética, e não havendo perda desta diversidade ao longo dos 4 anos, da mesma forma que não se encontrou grandes diferenças entre as épocas de verão e inverno. A influência de barreiras oceanográficas na dispersão de espécies foi evidenciada em todos os períodos, demonstrando assim a contribuição destas barreiras para a diferenciação genética entre as populações de *P. elephas*, e destacando a existência de duas sub-populações, uma no Atlântico e outra no Mediterrâneo. Os marcadores microsatélites foram altamente informativos, confirmando seu papel como ferramenta fundamental na elaboração de planos de conservação de espécies exploradas comercialmente, e na compreensão da conectividade entre as populações.

## 9. REFERÊNCIAS

ADRIAMED. Some considerations on the concept and on criteria for defining “priority species” for fishery assessment and management purposes in the GFCM area. In: GFCM-SAC Sub Committee on Stock Assessment, 2007, Kavala. **Anais...** Kavala, 2007.

ARANGUREN-MÉNDEZ, J. A.; ROMÁN-BRAVO, R.; ISEA, W.; VILLASMIL, Y.; JORDANA J. Los microsátélites (STR´s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.13, p.1-6, 2005.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMIGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

BABBUCCI, M.; BUCCOLI, S.; CAU, A.; CANNAS, R.; GOÑI, R.; DÍAZ, D.; MARCATO, S.; ZANE, L.; PATARNELLO T. 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.1040-1050, 2010.

BALASUBRAMANIAN, S. P.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v.30, p.593-601, 2004.

BECERRA, V. V.; PEREDES, M. C. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética, **Agricultura Técnica**. v.60, 2000.

BIONNER. For the Whole blood, Animal tissue and Cultured cells, Spin column type Genomic DNA Extraction Kit –*AccuPrep*® Genomic DNA Extraction Kit. **AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit from Bioneer**, 2012. Disponível em: <http://eng.bioneer.com/products/DNARNAPrep/GenomicDNAExtraction-technical.aspx> [acessado em julho de 2013].

BNDS. Panorama da Pesca Marítima no Mundo e no Brasil. **BNDES Setorial**, n.5, 1997.

BOOTH, J. D.; PHILLIPS, B. F. Early life history of spiny lobster. **Crustaceana**, v.66, p.271-294, 1994.

BOSSE, A.; TESTOR, P.; MORTIER, L.; BEGUERY, L.; BERNARDET, K.;

TAILLANDIER, V.; D'ORTENZIO, F.; PRIEUR, L.; COPPOLA, L.; BOURRIN, F. New insights of the northern current in the Western of Mediterranean Sea from Gliders data: Mean structure, Transport, and Seasonal variability. **Geophysical Research Abstracts**, V.15, 2013.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BROMAGHIN, J. F.; CRANE, P. A. A method to bin alleles of genetic loci that maintains population heterogeneity. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.62, p.1570-1579, 2005.

BUCHANAN, F. C.; FRISEN, M. K.; LITTLEJOHN, R. P.; CLAYTON, W. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. **Molecular Ecology**, v.5, p.571-575, 1996.

BURTON, C.; KREBS, C. J.; TAYLOR, E. B. Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. **Molecular Ecology**, v.11, p.1689-1701, 2002.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, v.11, p.409-419. 2010.

CAÑÓN, J. The genetic structure of Spanish celtic horse breeds inferred from microsatellite data. **Animal Genetics**, v.31, p.39-48, 2000.

CASTELLO, J. P. Gestão sustentável dos recursos pesqueiros, isto é realmente possível? **PanAmerican Journal of Aquatic Sciences**, v.2, p.47-52, 2007.

CECCALDI, H. J.; LATROUITE, D. The French fisheries for the European spiny lobster *Palinurus elephas*. In: Spiny Lobster Fisheries and Culture, 2nd edition. **Fishing News Book, Blackwell Science**, p 200-209, 2000.

CELLO, G. Structure and deformation processes in the Strait of Sicily "rift zone". **Tectonophysics**, v.141, p.237-247, 1987.

CRUZ, R. Manual de métodos de muestreo para la evaluación de poblaciones de langosta espinosa. **FAO Fisheries Technical Paper**, 43p, 2002.

DIAS-NETO, J. Gestão do uso dos recursos pesqueiros marinhos no Brasil. **Ibama**, 2010.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications*. **Oxford University Press**, p.34-48, 1999.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian journal of genetics**, v.19, p.23-29. 1996.

ELPHIE, H.; RAQUEL, G.; DAVID, D.; SERGE, P. Detecting immigrants in a highly genetically homogeneous spiny lobster population (*Palinurus elephas*) in the northwest Mediterranean Sea. **Ecology Evolution**, v.10, p.2387-96, 2012.

FAO. Aquaculture development. Genetic resource management. Roma, 2008.

FAO. El estado mundial de la pesca y la agricultura. Roma, 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 3<sup>a</sup> ed. **Embrapa/Cenargen**, 1998.

FIGUEIRA, R. C. L.; CUNHA, I. I. L. A contaminação dos oceanos por radionuclídeos antropogênicos. **Química Nova**, vol.21, 1998.

FORD, R. F. Introduction. In COOBB, J. S.; PHILLIPS, B. F. (Ed) *The biology and management of lobsters. Ecology and management*. **Academic Press**, New York, p.3-9, 1980.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. Introduction to conservation genetics. **Cambridge University Press**, 2002.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v.126, p.131-140, 2005.

FRISCH, A. J. Growth and reproduction of the painted spiny lobster (*Panulirus versicolor*) on the Great Barrier. **Reef Fisheries Research**, v.85, p.61-67, 2007.

GALARZA, J. A.; CARRERAS-CARBONELL, J.; MACPHERSON, E.; PASCUAL, M.; ROQUES, S.; TURNER, G. F.; RICO, C. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. **PNAS**, v.106, 2008.

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

GOÑI, R.; QUETGLAS, A.; REÑONES, O. Size at maturity, fecundity and reproductive potential of a protected population of the spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) from the Western Mediterranean. **Marine Biology**, v.143, p.583-592, 2003.

GOÑI, R.; LATROUITE, D. Biology, ecology and fisheries of *Palinurus* spp. species of European waters: *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) and *Palinurus mauritanicus* (Gruvel, 1911). **Cahiers de Biologie Marine**, v.46, p.127-142, 2005.

GOENEVELD, J. C.; BRANCH, G. M. Long-distance migration of South African deep-water rock lobster *Palinurus gilchristi*. **Marine Ecology Progress Series**, v.232, p.225-238, 2002.

GAVRILETS, S. Evolution and speciation in a hyperspace: the roles of neutrality, selection, mutation and random drift. In J. Crutchfield and P. Schuster, eds. Towards a comprehensive dynamics of evolution—exploring the interplay of selection, neutrality, accident, and function. **Oxford University Press**, 1999.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, p.413-425, 1998.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In GOLDSTEIN, D. B. SCHLÖTTERER, C. (Ed) Microsatellites: Evolution and Applications. **Oxford University Press**, p.1-9, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Principles of Population Genetics. **Sinauer**, Canadá, 542p, 1997.

HAZIN, F. H. V. A sustentabilidade da pesca marítima como tarefa do presente e do futuro. **Ação ergonômica**, v.7, 2012.

HELLBERG, M. E. Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. **Evolution**, v.48, p.1829-1854, 1994.

HOLTHUIS, L. B. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date. **FAO Fisheries Synopsis**, v.13, 1991.

HUNTER, E.; SHACKLEY, S. E.; BENNETT, D. B. Recent studies on the crawfish *Palinurus elephas* in South Wales and Cornwall. **Journal of the Marine Biological**, v.76, p.963-983, 1996.

HUNTER, E. Biology of the European spiny lobster, *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) (Decapoda, Palinuridea). **Crustaceana**, v.72, p.545-565, 1999.

IMAGEM QUEST 3-D. Lobster Phyllossoma larvae – Palinuroidae. 2000. Disponível em: <http://www.imagequest3d.com/pages/current/pictureoftheweek/phyllossoma/phyllossoma.htm> [acessado em julho de 2013].

JONES, M. W.; O'REILLY, J. P. T.; MCPARLAND, A. A.; MCPARLAND, T. L.; ARMSTRONG, D. E.; COX, A. J.; SPENCE, K. R.; KENCHINGTON, E. L.; TAGGART, C. T.; BENTZEN, P. Development, characterisation, inheritance, and cross-species utility of American lobster (*Homarus americanus*) microsatellite and mtDNA PCR-RFLP markers. **Genome**, v.46, p.59-69, 2003.

KARP, A.; EDWARDS, K. J. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In Molecular genetic techniques for plant genetic resources. In: IPGRI workshop, 1995, Rome. **Anais...** Rome, 1995.

KASHYAP, V. K.; SITALAXIMI, T.; CHATTOPADHYAY, P.; TRIVEDI, R. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. **International Journal of Human Genetics**, v.4, p.11-30, 2004.

KRUGLYAK, S.; DURRETT, R.; SCHUG, M. D.; AQUADRO, C. F. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. **PNAS**, v.95, p.10774-10778, 1998.

LATROUITE, D.; NOËL, P. Pêche de la langouste rouge *Palinurus elephas* en France, éléments pour fixer une taille marchande. **ICES CM 1997/BB**, v.13, 1997.

LIGDA, C.; ALTARAYRAH, J.; GEORGOUDIS, A. Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. **Small Ruminant Research**, v.83, p.42-48, 2009.

LIU, C. W.; LI, J. M.; LIU, L.; GUO, Y. S. Screening and genetic diversity analysis of microsatellite markers in Chinese lobster (*Panulirus stimpsoni*). **Yi Chuan**, v.32, p.737-743, 2010

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.5, p.56-60, 2002.

MACEY, J. R.; WANG, Y.; ANANJEVA, N. B.; LARSON, A.; PAPENFUSS, T. J. Vicariant patterns of fragmentation among Gekkonid lizards of the genus *Teratoscincus* produced by the Indian collision: a molecular phylogenetic perspective and an area cladogram for central Asia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.12, p.320-332, 1999.

MARIN, J. La langouste rouge: biologie et exploitation. **La Pêche Maritime**, p.105-113, 1985.

MAYRAND, P. E.; CORCORAN, K. P.; ZIEGLE, J. S.; ROBERTSON, J. M.; HOFF, L. B.; KRONICK, M. N. The use of fluorescence detection and internal lane standards to size PCR products automatically. **Applied and Theoretical Electrophoresis Medline Documents**, v.3, p.1-11, 1992.

MELLO, S. L. M.; PALMA, J. J. C. Geologia e geofísica na exploração de recursos minerais marinhos. **Brazilian Journal of Geophysics**, v.18, 2000.

MILLIGNAN, B. G.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A. E. Conservation genetics beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v.3, p.423-435, 1994.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **Plos Biology**, v.8, 2011.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, v.51, p.238-254, 2002.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. N.; SILVA, J. V.; SOUZA, U. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, p.521-526, 2007.

NACIRI, M.; LEMAIRE, C.; BORSA, P.; BONHOMME, F. Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Heredity**, v.90, p.591-596, 1999.

OLIVEIRA, A. C. B.; SEDIYAMA, M. A. N.; SEDIYAMA, T.; FINGER, F. L.; CRUZ, C. D. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. **Horticultura Brasileira**, v.2, p.576-582, 2002.

PALERO, F.; PASCUAL, M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.1477-1479, 2008.

PALERO, F.; ABELLÓ, P.; MACPHERSO, E.; GRISTINA, M.; PASCUAL, M. 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.; ABELLÓ, P.; MACPHERSO, E.; GRISTINA, M.; PASCUAL, M. Genetic diversity levels in fishery-exploited *Palinurus* spiny lobsters (Decapoda: Achelata). **Journal of Crustacean Biology**, 2010.

PALERO, F.; ABELLÓ, P.; MACPHERSO, E.; BEAUMONT, M.; PASCUAL, M. Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*). **Biological Journal of Linnean Society**, v.104, p.407-418, 2011a.

PALERO, F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; PASCUAL, M. MICROSATELITE—Pipeline to Expedite Microsatellite Analysis. **Journal of Heredity**, v.102, p.247-249, 2011b.

PALUMBI, S. R. Population genetics, demographics connectivity, and the design of marine reserves. **Ecological Applications**, v.13, 2003.

PALUMBI, S. R. Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. **Annual Review of Environment and Resources**, v.29, p.31-68, 2004.

PARK, S. D. E. The Excel microsatellite toolkit. 2011. Disponível em: <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit> [acessado em maio de 2013].

PATTARNELLO, T.; VOLCKAERT, F. A. M. J.; CASTILHO, R. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? **Molecular Ecology**, v.16, p.4426-4444, 2007.

PELLEGRINI, C. H. Terra e Oceanos – Fonte da vida. **Análise**, v.5, p.25-30, 2002.

PENA, L. S. **Frequência Alélica de 14 locos do cromossomo X de indivíduos da região sul do Brasil**. Porto Alegre: UFGRS, 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PERTOLDI, C.; BIJLSMA, R.; LOESCHCKE, V. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. **Biodiversity and Conservation**, v.16, p.4147-4163, 2007.

PHILLIPS, B. F.; COBB, J. S.; GEORGE, R. W. The biology and management of lobsters. **Academic Press**, New York, v.1, p.1-82, 1980.

PHILLIPS, B. F.; KITAKA, J. Spiny lobster: fisheries and culture. **Blackwell Scientific Publications Fishing News Books**, 2000.

PULLAT, I.; TAUPIER-LETAGE, I.; MILLOT, C. Algerian Eddies lifetime can near 3 years. **Journal Marine of Systems**, v.30, p.245-259, 2002.

PUJOL, M. I. "Analyse de la variabilité de surface en Méditerranée à partir des données altimétriques et comparaison aux simulations MERCATOR et MOG2D". Toulouse, 2006. Tese (Doutorado) - l'Universite Paul Sabatier, Toulouse, 2006.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **PNAS**, v.94, p.9197-9221, 1997.

RAO, V. R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic Resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.1-19, 2002.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

RIEGER, T. T.; CAMPOS, S. R. C.; SANTOS, J. F. A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade. **Floresta e Ambiente**, v.13, p.11-24, 2006.

ROBINSON, A. R.; LESLIE, W. G.; THEOCARIS, A.; LASCARATOS, A. Mediterranean Sea Circulation. **Encyclopedia of Ocean Sciences**, p.1689-1706, 2001.

SARDÁ, F.; COLL, M. La pesca marina en el mar Mediterráneo. **Ecologia politica**, p.57-59, 2007.

SHANKS, A. L.; GTANTHAM, B. A.; CARR, M. H. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. **Ecological Applications**, v.13, p.159-169, 2003.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v.236, p.787-792, 1987.

SPANIER, E; LAVALLI, K. L. Scyllarides species In: PHILLIPS, B.F. (eds.) Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries. Part 2: Lobsters of Commercial Importance. **Blackwell**, Oxford, p.462-496, 2006.

SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. Genética da Conservação. In MATTIOLI, S. (Ed). *Biologia Molecular e Evolução*. **Holos Press**, São Paulo, p.172-192, 2012.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade Molecular e genética da conservação. In MATTIOLI, S. (Ed). *Biologia Molecular e Evolução*. **Holos Press**, São Paulo, p.172-192, 2001.

SOUZA DE LIMA, A. P.; SILVA, S. M. B. C.; OLIVEIRA, K. K. C.; MAGGIONI, R.; COIMBRA, M. R. M.. Genetics of two marine shrimp hatcheries of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v.40, 2010.

STAMATIS, C.; TRIANTAFYLLIDIS, A.; MOUTOU, K. A.; MAMURIS, Z. Mitochondrial DNA variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. **Molecular Ecology**, v.13, p.1377-1390, 2004.

STREIFF, R.; GUILLEMAUD, T.; ALBERTO, F.; MAGALHAES, J.; CASTRO, M.; CANCELA, M. L. Isolation and characterization of microsatellite loci on the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.71-72, 2001.

TANG, W. M.; TO, K. Y. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. **Forensic Science International**, v.162, p.64-65, 2006.

TAUTZ, D. RENZ, M. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.4127-4137, 1984.

TEMPLETON, A. R. Genética de Populações e Teoria Microevolutiva. **SBG**, Ribeirão Preto, 705p, 2011.

TINTORÉ, J.; GOMIS, D.; ALONSO, S.; WANG, D. P. A theoretical study of large sea level oscillations in the Western Mediterranean. **Journal of Geophysical Research.**, v.93, p.10797-10803, 1988.

TRISTAN LE GOFF. *Palinurus elephas*. Biodiversité des algues marines et de la faune marine des côtes françaises: Manche et Atlantique. Disponível em: <http://www.marevita.org/index.php?option=classification&path=Arthropoda/Crustacea/Malacostraca/Eumalacostraca/Eucarida/Decapoda/Pleocyemata/Palinura/Palinuroidea/Palinuridae/Palinurus/Palinurus%20elephas> [acessado em agosto de 2013].

VIÑAS, J.; BREMER, J. A.; MEJUTO, J.; SERNA, J. M.; GARCÍA-CORTÉS, B.; PLA, C. Swordfish genetic population structure in the north Atlantic and Mediterranean. **Collective Volume of Scientific Papers - Iccat**, v.61, p.99-106, 2006.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugene**, v.15, p.323-354, 1951.