



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR**  
**CURSO DE OCEANOGRAFIA**

**HÉLIO MARQUES TEIXEIRA MOREIRA**

**ASPECTOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE *PUERULI* DE LAGOSTAS  
DO GÊNERO *Panulirus* NA ORLA DE FORTALEZA**

**FORTALEZA**

**2021**

HÉLIO MARQUES TEIXEIRA MOREIRA

ASPECTOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE *PUERULI* DE LAGOSTAS DO  
GÊNERO *Panulirus* NA ORLA DE FORTALEZA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Ciências do  
Mar (Labomar) da Universidade  
Federal do Ceará como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em  
Oceanografia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Co-orientadora: Dra. Juliana de Carvalho Gaeta

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M837a Moreira, Hélio Marques Teixeira.  
ASPECTOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE PUERULI DE LAGOSTAS DO GÊNERO *Panulirus*  
NA ORLA DE FORTALEZA / Hélio Marques Teixeira Moreira. – 2021.  
83 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do  
Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.  
Coorientação: Prof. Dr. Juliana de Carvalho Gaeta.

1. Pueruli. 2. Genoma mitocondrial. 3. Morfologia. 4. *Panulirus*. 5. Filogenética. I. Título.

CDD 551.46

---

HÉLIO MARQUES TEIXEIRA MOREIRA

ASPECTOS GENÉTICOS E MORFOLÓGICOS DE *PUERULI* DE LAGOSTAS DO  
GÊNERO *Panulirus* NA ORLA DE FORTALEZA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Ciências do  
Mar (Labomar) da Universidade  
Federal do Ceará como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em  
Oceanografia

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ma. Ingrid Luana da Silveira Siqueira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Raúl Cruz Izquierdo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, ao meu  
irmão e ao mar

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, Leoneida e Helano, por sempre estarem me incentivando a explorar e estudar o mundo e a nunca desistir de seguir meus objetivos.

Ao meu irmão, por seu companheirismo e incentivo a continuar em frente com os estudos nos momentos difíceis.

Aos meus avós Antônia, Hélio e Hilda por seu carinho, conselhos, cuidados e por terem sempre me mantido perto do mar.

A todos os meus tios e tias, em especial minha tia Heline, que me inspirou a ser cientista e a seguir os meus sonhos.

A todos os meus professores e professoras que me acompanharam e guiaram ao longo da graduação, com seus conselhos e ótimas didáticas de ensino.

A toda a equipe de servidores do Labomar, que sempre dão o máximo para manter em ordem o campus, os laboratórios, o restaurante universitário, a biblioteca e a limpeza dos prédios.

A toda a equipe do CEDECAM, em especial a Ingrid e a Graça (Gracinha), e o Rafael, sempre me aconselhando e me ajudando a me tornar um pesquisador mais organizado, responsável e preparado para o mundo, de fato aprendi o significado de ser cientista no CEDECAM.

Ao meu orientador Rodrigo Maggioni, e a minha coorientadora Juliana Gaeta, que sempre estiveram dispostos a oferecer ajuda, e a me guiar nesse mundo maravilhoso e único da genética marinha e das lagostas, sempre me motivando a seguir adiante e nunca desistir.

A minha turma de 2017.1, meus maiores conselheiros e amigos dos momentos difíceis da vida e de se fazer uma graduação, à Thays, Caio, Marina, Ruama, Felipe, Ben, às Débora Melo e Débora Gordiano, Mariana, Eduarda, Marina Martins, Letícia Paulino, Letícia Mesquita, Camille, Dávila, Ingra, Laís, Monique, Luíza e Vitória, enfim, todos vocês, apesar de tudo sempre juntos conseguimos superar os desafios e chegar a tão almejada formatura.

A todos meus colegas de outras turmas do curso de Oceanografia, e amigos da vida, Ada, Davi, Amanda Pinto e Amanda Fonseca, Pedro, Sarinha, Lidiana, Fabrício,

que sempre estiveram me motivando, apoiando e compartilhando ótimos momentos ao longo desses anos de amizade e de graduação.

E por fim, quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar aqui, nesse momento de privilégio de se finalizar o ensino superior, aos meus professores do colégio, do infantil até o ensino médio, a pessoas que cruzaram o meu caminho e que proferiram palavras de sucesso, superação e conquista.

Assim como a onda não pode existir por si mesma, mas faz parte da superfície do oceano, nunca devo viver minha vida por si mesma, mas sempre na experiência que está acontecendo ao meu redor.

Albert Schweitzer

## RESUMO

O estado do Ceará tem sido o maior exportador de lagostas do país nas últimas décadas, com destaque para as lagostas do gênero *Panulirus*. As espécies mais exploradas pelo setor pesqueiro são aquelas que se encontram em maior abundância no litoral cearense, *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*. Apesar de estudadas e gerenciadas durante décadas, aspectos fundamentais da biologia dessas lagostas ainda não foram elucidados. Uma das lacunas mais evidentes é o conhecimento acerca do recrutamento. No processo de recrutamento uma das fases cruciais é o assentamento, representado no ciclo vital pela fase de *puerulus*. Os estudos a respeito da distribuição e abundância dos *pueruli* de lagosta são escassos em território brasileiro, e se tornam mais complexos pela dificuldade de identificação das espécies nessa fase de desenvolvimento. O presente trabalho teve como objetivo realizar descrições morfológicas das diferentes fases de desenvolvimento de *pueruli* amostrados na costa do Ceará, com o intuito de permitir a identificação no menor nível taxonômico possível. Nos dias de hoje a identificação morfológica de espécies é frequentemente sustentada e corroborada por caracterizações genéticas. Com a finalidade de estabelecer um arcabouço para este tipo de estudo complementar, além da descrição morfológica também foi revisado e analisado o genoma mitocondrial das lagostas do gênero *Panulirus*. As análises morfológicas foram realizadas por meio de observações e medições sob estereomicroscópio e fotodocumentação digital. As análises genéticas se basearam em genomas mitocondriais completos disponíveis no GenBank, assim como em sequências inéditas do gene 16S para *Panulirus echinatus*, as quais foram usadas para construir árvores filogenéticas. As análises morfológicas realizadas revelaram um padrão semelhante de estruturas e coloração entre as amostras que estavam no mesmo estágio de desenvolvimento. Foi possível classificar as amostras em estágio mais avançado em nível de espécie, mas os estágios mais precoces mostraram características que precisarão da contraprova genética. As análises genéticas revelaram estabilidade no genoma mitocondrial entre as diversas espécies do gênero *Panulirus*, quando comparado com o genoma de *Drosophila melanogaster*. O gene mais conservado foi *cox1* ( $p = 0,189$ ) e a porção mais variável do genoma foi a região controle ( $p = 0,390$ ). Avaliados separadamente todos os genes produziram árvores de topologia semelhante com exceção da região controle. As árvores filogenéticas dividiram as lagostas analisadas em dois grupos, consistentes com o conhecimento atual acerca da evolução destas lagostas. O

gene 16S de *P. echinatus* apresentou baixa variabilidade intraespecífica e foi consistentemente diferente das demais espécies, indicando que poderá ser utilizado para caracterização genética de *pueruli*.

Palavras-chave: Pueruli, Genoma mitocondrial, Morfologia, *Panulirus*, Filogenética

## ABSTRACT

In recent decades, the state of Ceará has been the largest lobster exporter in Brazil, with emphasis on lobsters from genus *Panulirus*. The main species exploited by the fishing sector are those found in higher abundance, *Panulirus argus* and *Panulirus laevicauda*. Despite decades of scientific studies and fishery management, fundamental aspects of the biology of these lobsters have yet to be elucidated. One of the most significant gaps in knowledge is about recruitment. In the recruitment process, one of the crucial phases is settlement, represented in the life cycle by the *puerulus* phase. Studies on the distribution and abundance of lobster *pueruli* are scarce and become more complex due to the difficulty in identifying the species at this stage of development. This study aimed to present morphological descriptions of the different stages of development of *pueruli* sampled on the coast of Ceará, in order to allow identification at the lowest possible taxonomic level. Today, the morphological identification of species is often supported by genetic characterizations. In order to establish a framework for this type of complementary study, in addition to the morphological description, the mitochondrial genome of *Panulirus* lobsters was also reviewed and analysed. Morphological analyses were performed through observations and measurements under a stereomicroscope and digital photo documentation. Genetic analyses were based on complete mitochondrial genomes available on GenBank, as well as on unpublished 16S gene partial sequences for *Panulirus echinatus*, which were used to build phylogenetic trees. The morphological analyses performed revealed a similar pattern of structures and coloration among samples that were at the same stage of development. It was possible to classify the later stage samples at species level, but the earlier stages showed characteristics that will need genetic validation. The genetic analysis revealed stability in the mitochondrial genome among the different *Panulirus* species, when compared to the genome of *Drosophila melanogaster*. The most conserved gene was *coxI* ( $p = 0,189$ ) and the most variable portion of the genome was the control region ( $p = 0,390$ ). Assessed separately, all genes produced trees of similar topology with the exception of the control region. The phylogenetic trees divided the species into two groups, consistent with current knowledge about the evolution of these lobsters. The 16S gene from *P. echinatus* showed low intraspecific variability and was consistently different from the other species, indicating that it could be used for genetic characterization of *pueruli*.

Key words: Pueruli, Mitochondrial DNA, Morphology, *Panulirus*, Phylogenetic

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1	Ciclo de vida das lagostas .....	17
2.2	Biologia de pueruli .....	19
2.2.1	<i>Diferentes fases de pueruli</i> .....	21
2.3	Genética de lagostas .....	23
3	OBJETIVOS .....	26
4	MATÉRIAS E METODOS .....	27
4.1	Área de estudo e coleta .....	27
4.2	Análises morfológicas .....	28
4.3	Análises de variabilidade genética .....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1	Descrição morfológica .....	31
5.1.1	<i>Fases de pueruli observadas</i> .....	31
5.1.2	<i>Cefalotórax</i> .....	32
5.1.3	<i>Abdômen</i> .....	45
5.1.4	<i>Identificação das amostras</i> .....	52
5.2	Variabilidade genética de lagostas do gênero <i>Panulirus</i> .....	52
5.2.1	<i>Tabelas de distancias genéticas entre os genes mitocondriais</i> .....	52
5.2.2	<i>Árvores filogenéticas dos genes mitocondriais</i> .....	57
6	Conclusão .....	73
	Referencias .....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos diferentes estágios de desenvolvimento de lagostas do gênero <i>Panulirus</i> .....	17
Figura 2 – Vista ventral de uma larva filossoma de <i>Panulirus longipes</i> no estágio VII de desenvolvimento .....	18
Figura 3 – Padrão de assentamento de pueruli no município de Flecheiras (CE) nos anos de 2003, 2005 e 2006 .....	20
Figura 4 - Desenvolvimento da pós larva de <i>P. argus</i> em três diferentes estágios .....	21
Figura 5 – Organização do genoma mitocondrial da lagosta <i>Panulirus echinatus</i> .....	24
Figura 6 – Região da coleta dos pueruli, na enseada do Mucuripe em Fortaleza .....	27
Figura 7 – Placas de assentamento para avaliação da comunidade biológica marinha ..	27
Figura 8 – Representação da fase de <i>puerulus</i> de <i>P. argus</i> .....	29
Figura 9 - Pueruli e pós pueruli coletados na enseada do Mucuripe .....	31
Figura 10 – Diferentes estágios de desenvolvimento da larva <i>puerulus</i> .....	32
Figura 11 – Antênulas da fase de <i>puerulus</i> .....	32
Figura 12 – Antenas de <i>puerulus</i> anterior a fase de calcificação .....	33
Figura 13 – Antenas de <i>puerulus</i> na fase de calcificação mais avançada .....	34
Figura 14 – Placa antennular do <i>puerulus</i> da amostra 5 .....	35
Figura 15 – Placa antennular de <i>puerulus</i> na fase de calcificação .....	36
Figura 16 – Região orbital do cefalotórax de <i>puerulus</i> sem calcificação .....	38
Figura 17 – Região orbital do cefalotórax de <i>puerulus</i> na fase de calcificação .....	38
Figura 18 – Comparação entre a região do sulco cervical das larvas pueruli com o trabalho de GUERAO et al (2006) .....	40
Figura 19 – <i>Puerulus</i> anterior a fase de calcificação, em destaque a região branquial ...	40

Figura 20 – Região ventral do cefalotórax de puerulus sem calcificação, com o esterno destacado na imagem .....	41
Figura 21 – Região ventral do cefalotórax de puerulus que já se iniciou a fase de calcificação .....	42
Figura 22 – Região ventral do cefalotórax do puerulus anterior a fase de calcificação, representando os pereiópodos .....	44
Figura 23 – Região ventral do cefalotórax do puerulus na fase de calcificação representando os pereiópodos .....	44
Figura 24 – Região dorsal do abdômen do puerulus, representando em destaque as placas pleurais .....	46
Figura 25 – Região dorsal do abdômen do puerulus, com as placas pleurais terminando em dois dentes alongados .....	47
Figura 26 – Região dorsal do abdômen de puerulus, destacando o par de espinhos presentes no 6º segmento abdominal .....	47
Figura 27 – Região dorsal do abdômen de puerulus, representando os urópodes .....	49
Figura 28 – Representação da dorsal do abdômen do puerulus na fase de calcificação..	49
Figura 29 – Região ventral do abdômen, representando os pleópodes .....	51
Figura 30 – Genoma mitocondrial da espécie <i>Drosophila melanogaster</i> .....	55
Figura 31 – Organização do mtDNA da lagosta <i>P. argus</i> .....	56
Figura 32 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXI para as sequências analisadas .....	58
Figura 33 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXII para as sequências analisadas .....	59
Figura 34 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial ATP 8 para as sequências analisadas .....	59
Figura 35 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial ATP 6 para as sequências analisadas .....	60

Figura 36 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXIII para as sequências analisadas .....	61
Figura 37 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 3 para as sequências analisadas .....	61
Figura 38 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 5 para as sequências analisadas .....	62
Figura 39 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 4 para as sequências analisadas .....	63
Figura 40 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 4L para as sequências analisadas .....	63
Figura 41 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 6 para as sequências analisadas .....	64
Figura 42 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial Citocromo b para as sequências analisadas .....	64
Figura 43 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 1 para as sequências analisadas .....	65
Figura 44 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 16S para as sequências analisadas .....	66
Figura 45 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 12S para as sequências analisadas .....	66
Figura 46 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial região controle para as sequências analisadas .....	67
Figura 47 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 2 para as sequências analisadas .....	68
Figura 48 – Árvore filogenética de Ptacek et al. (2001) .....	69
Figura 49 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 16S com as novas sequências de <i>P. echinatus</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da distância genética entre os genes mitocondriais do genoma mitocondrial de lagostas espinhosas do gênero *Panulirus* disponíveis no GenBank ..... 54

Tabela 2 – Resultado da distância genética entre os genes analisados do mtDNA com o grupo externo, *Homarus americanus*, incluído na análise filogenética dessa tabela ..... 54

## 1. INTRODUÇÃO

As lagostas espinhosas (Decapoda: Palinuridae) são consideradas um dos recursos pesqueiros mais importantes do globo (GIRALDES; SMYTH, 2016). Em território brasileiro, a espécie *Panulirus argus* (Latreille, 1804), conhecida popularmente como lagosta vermelha, é a mais encontrada nos estoques, e conseqüentemente a mais exportada, totalizando em média 5,3 mil toneladas anuais de peso inteiro nos últimos 10 anos, e a *Panulirus laevicauda* (Latreille, 1817), ou lagosta verde, com 900 toneladas de peso inteiro (ARAGÃO; CINTRA, 2019), enquanto as contribuições da lagosta pintada e lagostas-sapateiras são inexpressivas comercialmente na costa brasileira (ARAGÃO; CINTRA, 2019). A pesca comercial de lagosta ocorre entre os estados do Amapá e Rio de Janeiro (TUBINO et al., 2007), e de acordo com as estatísticas do Governo do Estado do Ceará (GEC, 2019) o estado é o maior exportador do país, chegando a exportar o valor de US\$ 29 milhões entre janeiro e agosto de 2019.

A costa cearense apresenta um ambiente favorável para o assentamento de larvas e desenvolvimento desses organismos, assim como zonas de alimentação e reprodução, possuindo um clima semiárido (KELTING, 2007), e um oceano com águas quentes devido à proximidade com o Trópico do Equador. As características desse ambiente, assim como outros que possuem o substrato coberto por algas vermelhas e *Halimeda* spp. é um dos escolhidos pelas lagostas como área de alimentação, crescimento e reprodução (FONTELES-FILHO, 2007).

Após saírem dos ovos, os organismos chamados de phyllosoma pouco se parecem com os animais adultos, estes permanecem no plâncton marinho, e após dez estágios de desenvolvimento larval se tornam *puerulus* (GOLDSTEIN et al., 2008), um estágio de pós-larva nectônica, e que se assemelha aos indivíduos adultos, porém de coloração transparente (PHILLIPS et al., 2006). Com relação ao estágio pós larval, os *puerulus* são conhecidos por procurarem ambientes de assentamento em zonas protegidas de fortes ondas e ventos, tendendo a se abrigarem em costas rochosas, recifes, fendas ou cavernas (BOOTH; PHILLIPS, 1993) e em grandes massas de macroalgas flutuantes, como *Sargassum* spp. (LEITE; TURRA, 2003) e *Amansia* sp. (IGARASHI, 2010). Nessa última fase, é conhecido que *puerulus* de algumas espécies, como as dos gêneros *Jasus* e *Panulirus*, não se alimentam, dependendo da energia estocada durante os estágios larvais anteriores (BOOTH, 2002; HAYAWAKA; NISHIDA, 2005; JEEFS et al., 1999;

LEMMENS, 1994; NISHIDA, 2002).

Após a muda de filossoma para *puerulus*, agora já na fase de pós-larva, os indivíduos nadam para zonas de plataforma continental ou litorânea, para ocorrer o seu assentamento e se tornarem seres bentônicos que darão prosseguimento ao seu ciclo de vida (GÓES; CARVALHO, 2005). Observações diretas de *pueruli* ativos foram apenas registradas durante o período noturno, e na maioria foi visto o comportamento de natação em linha reta à centímetros da superfície oceânica, e em algumas ocasiões com condição de mar calmo foi possível observar suas antenas acima da superfície (PHILLIPS; OLSEN, 1975). Esse movimento em direção a costa, começa a ocorrer a distâncias consideráveis dela, acima de 50 km, envolvendo uma combinação de fatores, como natação ativa em direção à costa, uso de advecção natural *onshore* e processos passivos, como a circulação superficial gerada pelo vento (BUTTLER; HERRNKIND, 2000).

Pesquisas relacionadas a descrição morfológica e genética desses animais são escassas na bibliografia brasileira, e internacionalmente o único trabalho que obteve sucesso em analisar e desenvolver as fases larvais da lagosta espinhosa *Panulirus argus* em cultivo, foi o de Goldstein et al. (2008), abordando aspectos morfológicos de cada um dos 10 estágios larvais planctônicos, e sobre as pós larvas *pueruli*. Na fase de *puerulus* o comprimento do cefalotórax é em torno de 8 mm (BOOTH; PHILLIPS, 1993), já no trabalho de Goldstein et al. (2008) o tamanho médio encontrado foi de 6,35 mm, sendo o tamanho médio do corpo de 17 mm. A duração desse estágio varia entre as espécies, mas geralmente é menor que um mês, sendo a temperatura da água muito influente (BUTTLER; HERRNKIND, 2000).

Com relação à reprodução de lagostas espinhosas, essas são espécies ovulíparas, apresentando fecundação e desenvolvimento embrionário externo, no qual os machos vão depositar uma massa espermatofórica que vai endurecer e fornecer os espermatozóides, na qual a fêmea vai raspar a mesma após a ovulação, para ocorrer a fecundação (CRUZ et al., 2011). Os ovos possuem em torno de 1 mm de tamanho, e o estágio seguinte compreende a fase larval (*phyllosoma*) e uma fase pós larval (*puerulus* nos *Panulirus* e *nisto* nas *Scyllarids*), ambos precedendo o estágio juvenil das lagostas (PHILLIPS et al., 2006).

A conservação e estudo desse estágio pós-larval da lagosta é de suma importância para o manejo pesqueiro e preservação da espécie. É nesse estágio em que vai ocorrer o assentamento do animal, e transição para a fase juvenil, e futuramente ao atingir tamanho ideal este desloca-se para o grupo de indivíduos adultos da espécie em maiores

profundidades, podendo ser explorado pelas atividades de pesca. Estudos já trazem dados sobre as capturas virem decrescendo com o passar dos anos, e apesar disso, os esforços de pesca estão cada vez maiores (ARAGÃO; CINTRA, 2019; MELO; BARROS, 2006). Com isso, os *pueruli* se destacam para a manutenção das espécies, pois são eles que irão passar pela fase de assentamento adiante, e consequentemente permitir a renovação da população e do estoque pesqueiro disponível para as gerações futuras.

As espécies que geralmente são mais encontradas na costa cearense pertencem à família Palinuridae, do gênero *Panulirus*, que engloba as lagostas de espinho, sendo elas *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*. Alguns estudos (GIRALDES; SMYTH, 2016; PEIXOTO et al., 2020; SARVER; SILBERMAN; WALSH, 1998) da espécie *P. argus* abordaram que houve uma separação genética entre as lagostas caribenhas e brasileiras e esta deve ter ocorrido no último período glacial máximo, sendo a pluma gerada pelas desembocaduras dos rios Amazonas e Orinoco a barreira física que deu início a essa provável especiação alopátrica, sendo recente proposta a espécie *Panulirus meripurpuratus* presente no litoral brasileiro, localizada a leste da foz de ambos os rios e *P. argus* com distribuição à oeste da foz dos dois rios (GIRALDES; SMYTH, 2016).

Alguns estudos utilizam de ferramentas genéticas e moleculares para alcançar seus resultados, abordando aspectos desde dieta de larvas de lagosta (O’RORKE et al., 2012) até estudos sobre estruturas populacionais de adultos de lagostas espinhosas (GAETA et al., 2020). Com o passar dos anos e com o avanço tecnológico e científico, pesquisas como essas serão cada vez mais frequentes e importantes para uma melhor compreensão da dinâmica populacional e reprodutiva das lagostas, fornecendo bases científicas mais atuais e concretas para melhor manejo ecológico e pesqueiro das espécies.

Considerando este histórico, o presente trabalho tem como objetivo revisar dados bibliográficos acerca da morfologia de larvas de lagosta do gênero *Panulirus* no estágio de *puerulus*, e integrar essas informações com características de amostras coletadas na enseada do Mucuripe, Fortaleza – Ceará, que foram observadas através de fotografias em lupa. Objetiva-se também a realização de análise *in silico* de dados obtidos a partir de base de dados genéticos disponíveis online, acerca da genética de lagostas do gênero *Panulirus*. Para essa análise genética serão utilizadas sequências completas e parciais dos genes mitocondriais disponíveis publicados no National Center for Biotechnology Information (NCBI), com o intuito de avaliar a diversidade genética das espécies encontradas no Brasil, e a distribuição de variabilidade no genoma mitocondrial das mesmas.

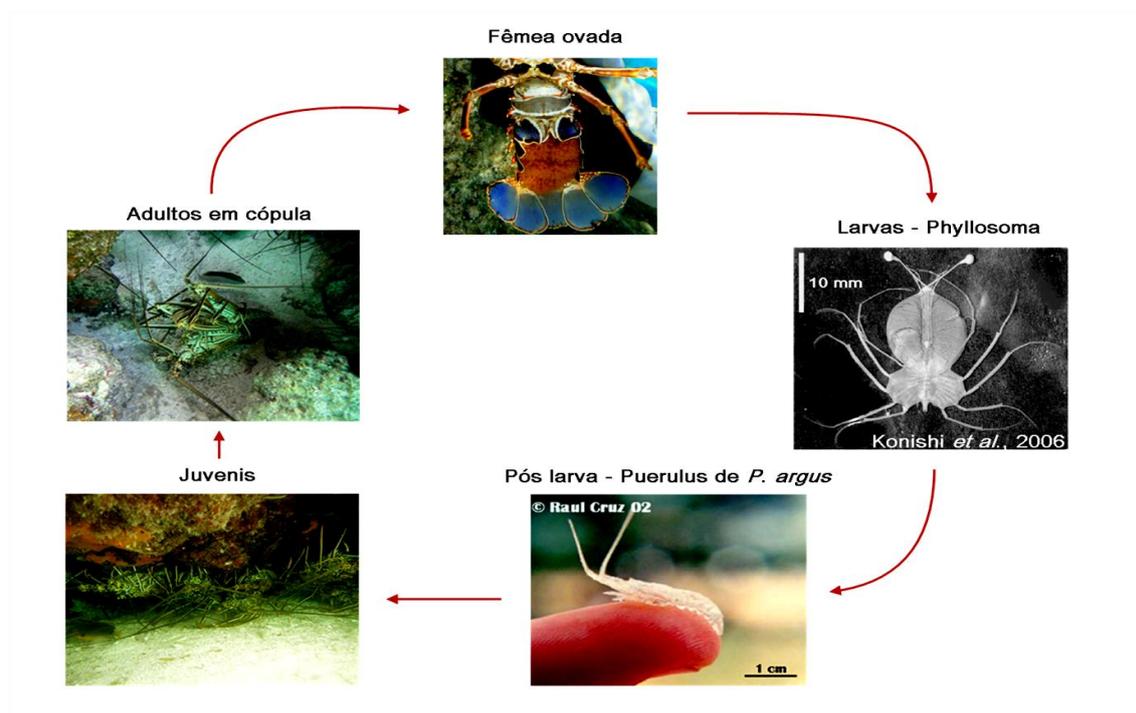
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Ciclo de vida das lagostas espinhosas

O complexo ciclo de vida das lagostas espinhosas vem sendo estudado mundialmente há algumas décadas, tendo ganhado cada vez mais destaque nos últimos anos devido as medidas de preservação por conta da elevada pressão pesqueira sobre esses animais, sendo registrada uma queda na captura dos estoques (ARAGÃO; CINTRA, 2019; DINIZ, 2001; MELO; BARROS, 2006).

Ao longo do seu ciclo de vida, a lagosta habita os mais variados tipos de ambientes, passando por várias mudanças fisiológicas e de habitat com base no seu estágio de desenvolvimento (Figura 1). As fases gerais são: o animal adulto, com mais de 80 mm de comprimento da carapaça (CRUZ; BERTELSEN, 2008), os ovos, que apresentam em torno de 5 mm de diâmetro, e são carregados pelas fêmeas ovadas até sua eclosão e liberação das larvas filossoma em oceano aberto (CRUZ; 1980), seguida da de *puerulus* e *pós-puerulus*, juvenil, e fase de pré-recrutamento (CRUZ et al., 2021; FAUSTO-FILHO; COSTA, 1969).

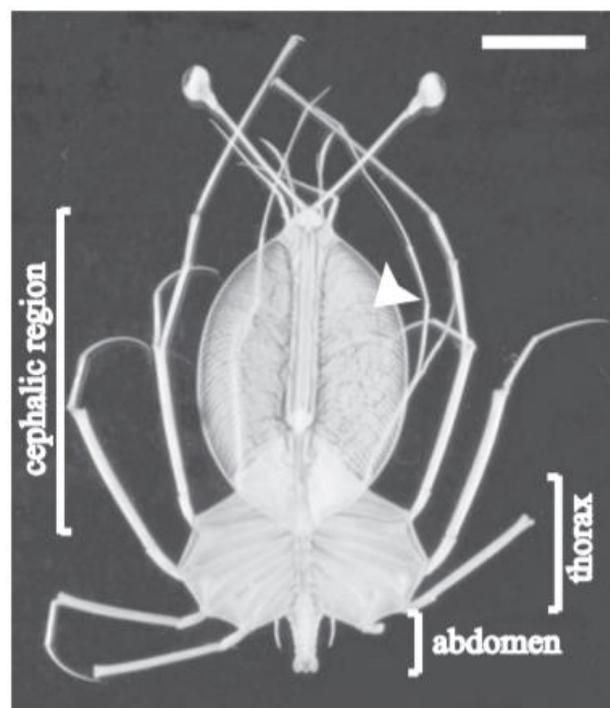
Figura 1 - Representação dos diferentes estágios de desenvolvimento de lagostas do gênero *Panulirus*.



Fonte: Gaeta (não publicado).

Anterior a metamorfose para *puerulus*, a larva passa pela fase de filossoma, conhecida por sua forma achatada semelhante a uma folha (Figura 2), há a presença de 11 estágios de desenvolvimento diferentes (LEWIS et al., 1951), chegando a até 13 estágios em *Jasus lalandii* (PHILLIPS et al., 2006), todos apresentando características morfológicas distintas, durando meses até a larva de lagosta se desenvolver para um estágio conhecido como *puerulus*. Com relação a alimentação nesse estágio, através do estudo molecular de (SUZUKI et al., 2006), que buscou identificar o DNA das presas consumidas com a utilização do hepatopâncreas das larvas, foram observadas que as principais presas das filossoma são espécies dos grupos do Urochordata e Cnidaria.

Figura 2 – Vista ventral de uma larva filossoma de *Panulirus longipes* no estágio VII de desenvolvimento, barra de escala = 5 mm



Fonte: Adaptado de SUZUKI et al. (2006).

A fase de *puerulus*, que vem após a metamorfose de filossoma, vai ser discutida de maneira mais aprofundada no próximo tópico, por ser o tema principal do trabalho, e serão abordados aspectos acerca da biologia e desenvolvimento entre as duas diferentes fases desse estágio, *puerulus* e *pós-puerulus* ou juvenil solitário da fase algal (BUTLER; HERRNKIND, 2000)

Após a fase de *puerulus*, as lagostas já passaram pelo processo de assentamento do ambiente pelágico para o bentônico, se tornando juvenis a seguir, apresentando entre 16 e 50 mm de comprimento da carapaça. São comumente encontrados agregados em fendas de rochas marinhas, possivelmente como método de evitar a predação (CHILDRESS; HERRNKIND, 1997; SMITH; HERRKIND, 1992).

A última fase, é o estágio de pré-recrutamento, momento anterior à idade adulta das lagostas, apresentando o comprimento da carapaça entre 50 e 79 mm, na qual os indivíduos vão migrar dos abrigos em águas rasas litorâneas, para regiões bentônicas mais profundas, onde a maioria dos animais já adultos são encontrados (CRUZ et al., 2001a).

## 2.2 – Biologia de *pueruli*

Esse novo estágio de vida antecede a fase juvenil do animal, e inicialmente não apresenta pigmentação e nem calcificação em seu corpo, logo sua coloração é transparente, porém ao se aproximar da fase de *pós-puerulus*, a calcificação e pigmentação ficam mais evidentes e ao final do estágio a larva já está semelhante ao animal adulto, porém de tamanho bem reduzido (GOLDSTEIN et al., 2008; GUERAO et al., 2006).

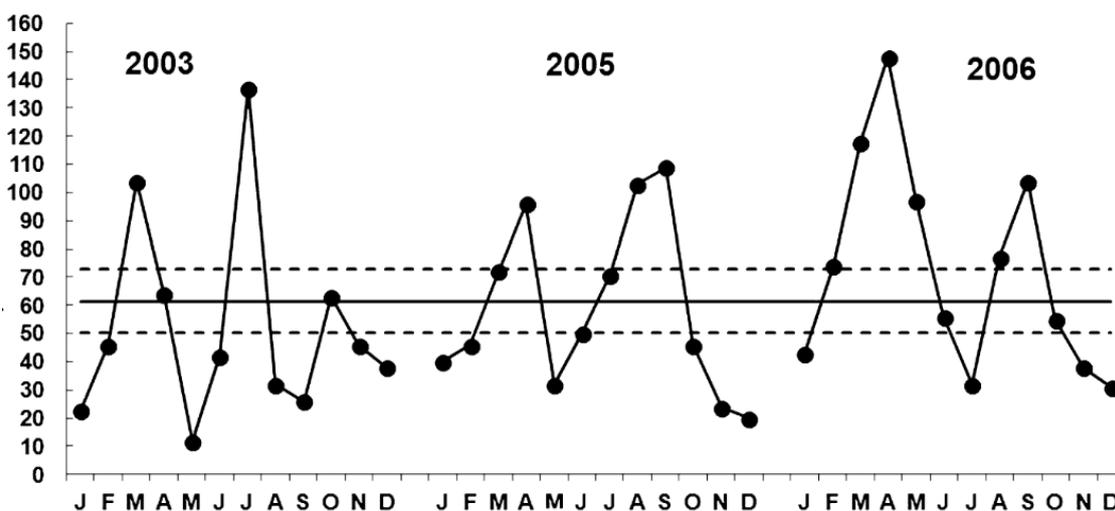
Nesse estágio a larva não se alimenta, dependendo de reservas energéticas que foram armazenadas através da alimentação nos estágios de desenvolvimento anteriores. (MCWILLIAMA; PHILLIPS, 1998). Anger (1989) criou o termo ‘lecitotrofia secundária’ para descrever esses estágios larvais em que o organismo não se alimenta. A metamorfose da fase de filossoma para *puerulus* aparentemente não é influenciada por fatores ambientais, porém ela somente procede após ocorrer uma acumulação de reservas energéticas suficientes para suprir as necessidades do estágio de *puerulus* (MCWILLIAMA; PHILLIPS, 1998).

Neste estágio ocorre um dos principais momentos de todo o ciclo larval e juvenil das lagostas, o assentamento, a transição do estágio planctônico, no qual a larva é dependente dos movimentos das correntes e ondas oceânicas para o seu deslocamento, para o estágio bentônico, no qual os *pueruli* irão migrar dezenas de quilômetros em direção as zonas costeiras (WILKIN; JEFFS, 2011), procurando locais protegidos como massas de algas flutuantes ou cavernas e rochas marinhas para o seu assentamento (BUTLER; HERRNKIND, 2000).

Os padrões de dispersão e os hábitos de vida das larvas de lagosta é pouco compreendido até o momento de seu retorno para o litoral onde irá ocorrer o assentamento. Alguns estudos dizem que as larvas anteriores a fase de *puerulus* são totalmente dependentes dos padrões de circulação oceânica, ficando muitas vezes retidas em giros oceânicos ciclônicos ou anti-ciclônicos, servindo como fonte para o futuro processo de assentamento (CRUZ et al., 2015; CRUZ et al., 2011) e consequentemente do estoque adulto de lagostas das regiões próximas (GAETA et al., 2020).

Com relação aos padrões anuais de assentamento de *puerulus* na costa cearense (Figura 3), é observado que ocorre o processo ao longo do ano todo, porém existe dois picos anuais, um entre fevereiro e abril, na estação chuvosa, e outro entre julho e setembro, na estação seca, estando relacionados aos padrões de circulação oceânica próximo a costa do Ceará (CRUZ et al., 2015). Outras condições oceanográficas, como salinidade e temperaturas (PHILLIPS et al., 2006), condições atmosféricas, abordando a questão do *El niño* (BOOTH et al., 2000), e até mesmo geológicas, como cadeias de montanhas marinhas, por exemplo a dorsal mesoatlântica e erupções vulcânicas (GAETA et al., 2020), podem influenciar nesses padrões de assentamento das larvas de lagosta.

Figura 3 – Padrão de assentamento de *pueruli* no município de Flecheiras (CE) nos anos de 2003, 2005 e 2006. O gráfico mostra o número de puerulus por meses do ano.



Fonte: CRUZ et al. (2015).

O ambiente que os recém formados *pueruli* irão buscar ao chegar na costa é variável, procurando desde vegetação marinha densa, como gramas marinhas, macroalgas marrons e vermelhas (HERRNKIND; BUTLER, 1986), até pequenos buracos ou fendas

em rochas e pequenos recifes (BOOTH; PHILLIPS, 1993), em busca de regiões protegidas de fortes ondas e correntes e possíveis predadores, como polvos, caranguejos, raias e o peixe-sapo (SMITH; HERRNKIND, 1992).

Com relação as larvas de *Panulirus argus*, a espécie de lagosta espinhosa mais comum na costa cearense, sabe-se que a fase filossoma dura em torno de seis meses, passando por 11 fases diferentes durante esse estágio, para a posterior metamorfose para *puerulus*, com duração entre 4 e 8 dias em seu ambiente natural (BOOTH; PHILLIPS, 1993; BUTLER; HERRNKIND, 1991).

Os processos que induzem a metamorfose do estágio de filossoma para *puerulus* ainda não são totalmente compreendidos, mas as deduções abordam processos físicos oceanográficos que ocorrem próximos a quebra da plataforma continental (PHILLIPS; MCWILLIAM, 1986) ou o contato da larva filossoma, em seu estágio final de desenvolvimento, com o ambiente bentônico (BOOTH; PHILLIPS, 1993) como possíveis estimulantes para a metamorfose. Outros trabalhos abordam que a larva percebe 'pistas' químicas e físicas que remetem ao seu ambiente de origem (POLLOCK, 1990; POLLOCK, 1992), mas essa sugestão necessita de mais dados para ser melhor esclarecida.

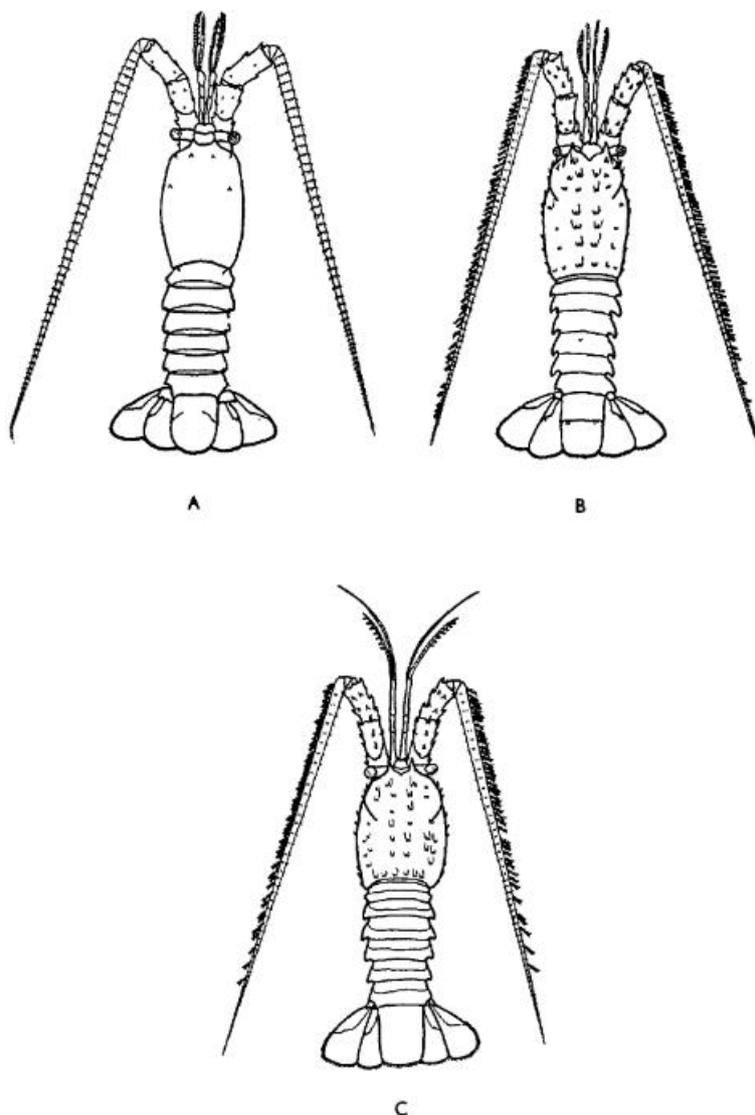
### 2.2.1 Diferentes fases de puerulus

A larva *puerulus* apresenta tamanho do comprimento do cefalotórax (em inglês Carapace Length - CL) que varia de 6 a 12 mm, com um tamanho médio de 8 mm (PHILIPPS et al., 2006; BOOTH; PHILIPPS, 1993).

De acordo com a bibliografia o início da pigmentação é um indicativo de que os *pueruli* já estão se desenvolvendo para o estágio *pós-puerulus*, também conhecido como fase algal (BUTLER et al., 1997), na qual os organismos passam a adquirir um comportamento bentônico, ocorrendo seu assentamento e conseqüentemente adquirindo a coloração típica da espécie em questão (IVO; PEREIRA, 1996).

Com o avançar do desenvolvimento da pós-larva (Figura 4), também é observado uma maior quantidade de espinhos se desenvolvendo pelo cefalotórax e pedúnculo antenal, a definição do sulco cervical, assim como a formação de ranhuras nos somitos abdominais caso o *puerulus* pertença a espécie *Panulirus argus* (LEWIS et al., 1951).

Figura 4 - Desenvolvimento da pós larva de *Panulirus argus* em três diferentes estágios: A, B e C, do mais inicial para o mais avançado, respectivamente.



Fonte: LEWIS et al. (1951).

### 2.3 Genética de lagostas

Estudos genéticos envolvendo as populações de lagostas são cada vez mais frequentes nos últimos anos, visto os avanços tecnológicos, gerando uma maior eficácia dos resultados obtidos, e o aumento da demanda que tem surgido nesse ramo de pesquisa. Geralmente essas pesquisas envolvem características da ecologia, da biologia reprodutiva de populações de lagostas e identificação de espécies (KENNINGTON et al., 2013; SUZUKI et al., 2006), porém também tem se observado mais abordagens relacionadas as relações filogenéticas entre os gêneros e espécies de lagostas (GAETA et al., 2020; NARO-MACIEL et al., 2011; PALERO et al., 2009; PTACEK et al., 2001).

A estruturação das populações depende de vários fatores, sendo o principal as barreiras físicas que existem ou passaram a existir entre esses grupos, dificultando a dispersão larval pelas correntes oceânicas entre as populações (GAETA et al., 2020; KENNINGTON et al., 2013; SARVER et al., 1998). Porém no caso das lagostas espinhosas, a maioria das espécies apresentam uma inexistência de estruturação genética entre as populações, o que condiz com o seu longo período larval planctônico, que apresenta uma alta capacidade de dispersão em oceano aberto (CRUZ, 2002; OVENDEN et al., 1992; SILBERMAN et al., 1994; THOMPSON et al., 1996; TOLLEY et al., 2005).

A respeito da variabilidade genética relacionada ao gênero *Panulirus* ao longo do Atlântico, uma grande quantidade de variação genética foi encontrada no genoma mitocondrial das populações de *Panulirus argus*, sendo uma característica comum de organismos que possuem estágios larvais de longa duração (AVISE, 1992; CAMPER et al., 1993; CRUZ 2002). Alguns fatores podem intervir para dificultar a subdivisão genética entre as populações de lagosta vermelha, como o longo período larval sob a ação de fortes correntes marinhas, mantendo constante o fluxo gênico entre as populações, assim como a oceanografia física do oceano Atlântico, que favorece o fluxo entre os continentes e as ilhas oceânicas. (SILBERMAN et al., 1994).

Gaeta et al. (2020) sugere que o sistema de circulação equatorial das correntes do Atlântico, funciona como uma barreira biofísica entre os giros subtropicais do oceano atlântico norte e sul para a dispersão de larvas de *Panulirus echinatus* entre as ilhas, e que outros fatores acabam desempenhando a mesma função, como a cadeia de montanhas submarinas da dorsal mesoatlântica, a distância entre os lados oeste e leste do oceano e diferenças entre massas de água.

Estudos tem buscado compreender a relação filogenética entre as populações de lagosta do gênero *Panulirus* (GAETA et al., 2020; NARO-MACIEL et al., 2011; PALERO et al., 2009). Ptacek et al. (2001) sugere que houve uma divergência entre as duas maiores linhagens desse gênero em um período geológico anterior ao pleistoceno, possivelmente no Mioceno tardio (GEORGE, 1997), suportando hipóteses mais antigas baseadas em característica morfológicas que mencionam essa divisão (GEORGE; MAIN, 1967; MCWILLIAM, 1995).

A alta variabilidade genética, uma grande quantidade de haplótipos relacionados e a presença de duas linhagens de evolução distintas (NARO-MACIEL et al., 2011) é consistente com a história de evolução das lagostas envolvendo dois abrigos formados durante o último período glacial máximo, seguido de uma alta expansão das populações

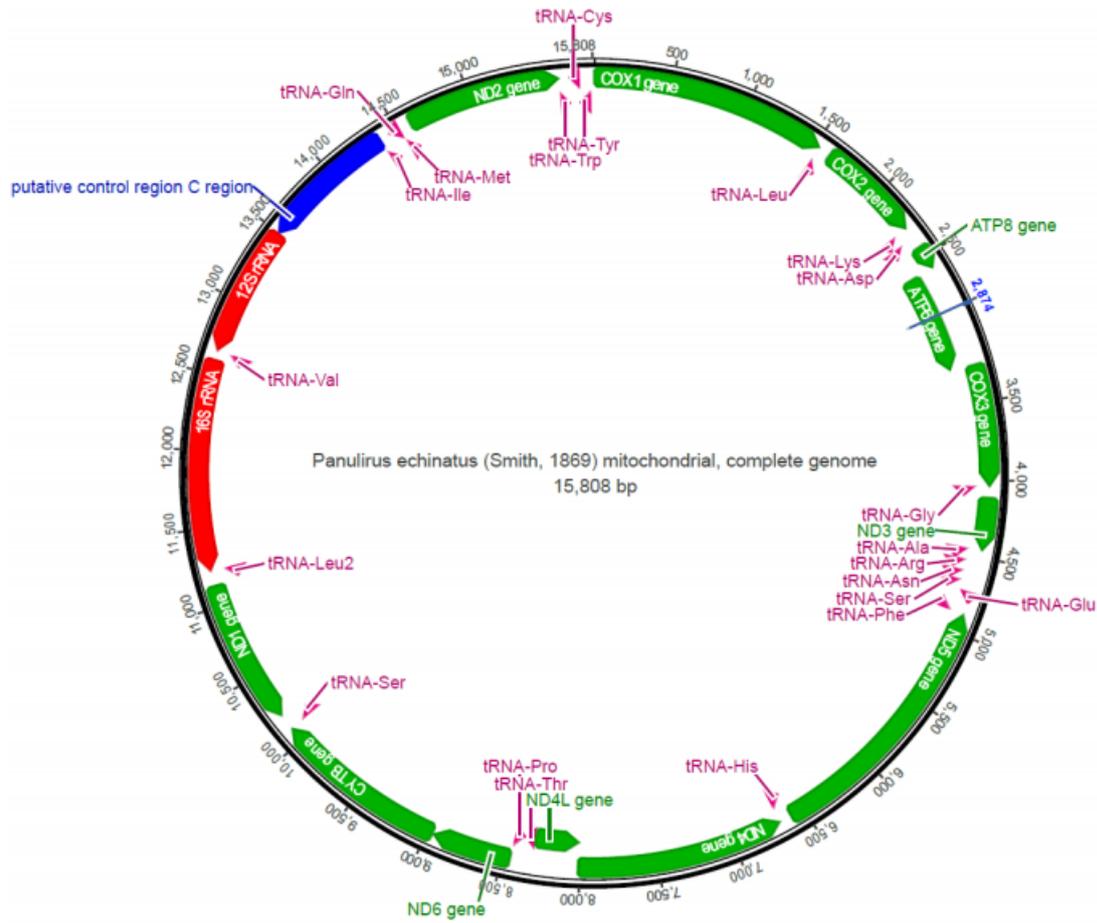
(GOPAL et al., 2006; PALERO et al., 2009; TOLLEY et al., 2005). Análises comparativas de variação genética observadas em *P. argus* relevam um nível de divergência interespecífica parecido com o de várias espécies de *Panulirus* (NAROMACIEL et al., 2011), dando maior suporte a hipótese de ocorrência de panmixia nesse local (OGAWA et al., 1991; TOLLEY et al., 2005; SILBERMAN et al., 1994).

Alguns métodos são mais comumente utilizados para análises da variabilidade genética em organismos marinhos, como aloenzimas, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA), microssatélites, entre outros (DINIZ et al., 2005), destacando o mtDNA, como uma importante região do genoma para o estudo da variação genética em animais marinhos ao nível populacional.

Os genes mitocondriais com melhor acurácia para a análise e caracterização da variação genética em crustáceos são o 16S rDNA (16S), o 12S rDNA (12S) e o citocromo oxidase subunidade I (COI), pois apresentam um ótimo sinal filogenético, realizando uma boa delimitação em grupos de crustáceos (TOON et al. 2009; MATZEN DA SILVA et al. 2011; PEDRAZA-LARA et al. 2012).

O trabalho de Dos santos (2016), realiza uma descrição do genoma mitocondrial da lagosta *Panulirus echinatus*, abordando a sua organização estrutural ( Figura 5) contendo 15.808 pb de comprimento, um dos mais longos do gênero. O genoma está dividido em 13 genes codificadores de proteínas, 22 tRNAs que são utilizados para a tradução de proteínas codificadas pelo mtDNA, duas subunidades do ribossomo da mitocôndria (16S e 12S) e uma região controle, também conhecida como d-loop.

Figura 5 – Organização do genoma mitocondrial da lagosta *Panulirus echinatus*, os genes codificadores de proteínas estão em verde, os 22 tRNAs estão destacados em roxo pelas setas, a região controle está em azul, e os rRNAs estão em vermelho



Fonte: Dos santos (2016)

A proposta inicial do estudo era analisar geneticamente as amostras de puerulus coletadas na enseada do Mucuripe em Fortaleza. No entanto, a pandemia de COVID-19 impossibilitou a realização desta etapa laboratorial e, portanto, o trabalho foi reorganizado, logo uma análise *in silico* foi feita a respeito da genética de lagostas, para melhor compreensão de seu genoma devido à escassez de estudos a respeito dos aspectos taxonômicos morfológicos e genéticos de puerulus, que é uma etapa do desenvolvimento fundamental para a manutenção dos estoques lagosteiros.

### **3. OBJETIVO:**

Caracterizar morfológica e geneticamente os pueruli das espécies de lagosta do gênero *Panulirus* que ocorrem na costa do Ceará.

#### **Objetivos específicos:**

1. Descrever morfológicamente pueruli coletados na costa do Ceará
2. Avaliar a variabilidade e níveis de diferenciação dos genes mitocondriais das lagostas espinhosas do gênero *Panulirus*
3. Avaliar a diversidade do gene 16S mitocondrial de *Panulirus echinatus*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo e coleta

A coleta dos pueruli ocorreu na região da enseada do Mucuripe, no Iate Clube (Figura 6) ( $3^{\circ} 43' 12''\text{S}$ ,  $38^{\circ} 28' 40''\text{W}$ ), localizada na orla de Fortaleza no litoral central do estado do Ceará (CE) que é banhado pelo oceano Atlântico tropical.

Figura 6 – Região da coleta dos pueruli, na enseada do Mucuripe em Fortaleza (CE), a seta em vermelho destaca o pequeno espigão do Iate Clube, onde foi realizada a coleta

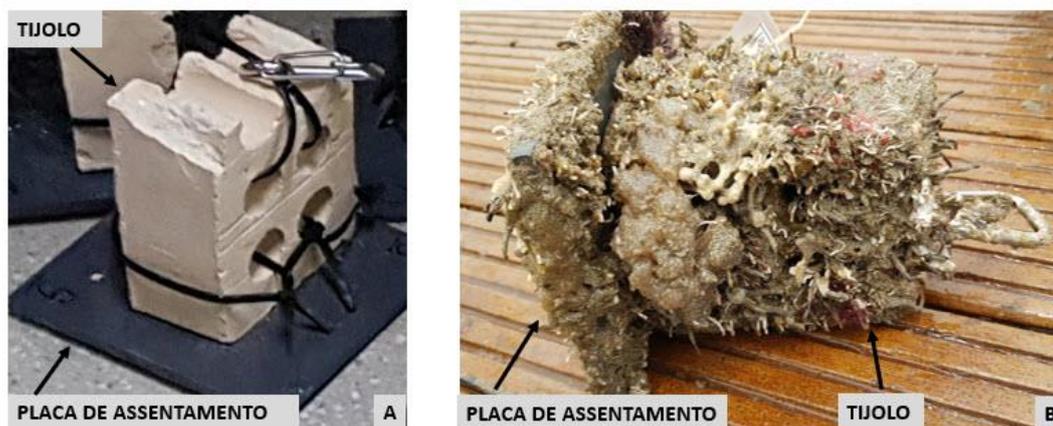


Fonte: Google maps (2019).

### Coleta

Os organismos foram coletados ao longo dos meses de março a maio de 2019, no período diurno. Os pueruli foram encontrados em tijolos (Figura 7) que serviram de base para placas de assentamento de outro experimento visando a avaliação da comunidade biológica marinha.

Figura 7 - Placas de assentamento para avaliação da comunidade biológica marinha. **A** – Antes de ser instalado no oceano e **B** – Após três meses de acompanhamento no oceano.



Fonte: Cedecam (2019).

Os tijolos proporcionam o habitat ideal para os *puerulus*, por possuir furos em sua estrutura que criam um ambiente com características de águas calmas e por garantir proteção contra predadores (BOOTH; PHILLIPS, 1993). Após a coleta os organismos foram fotografados e conservados em álcool 95% para futuras análises morfológicas e moleculares.

#### 4.2 Análises morfológicas

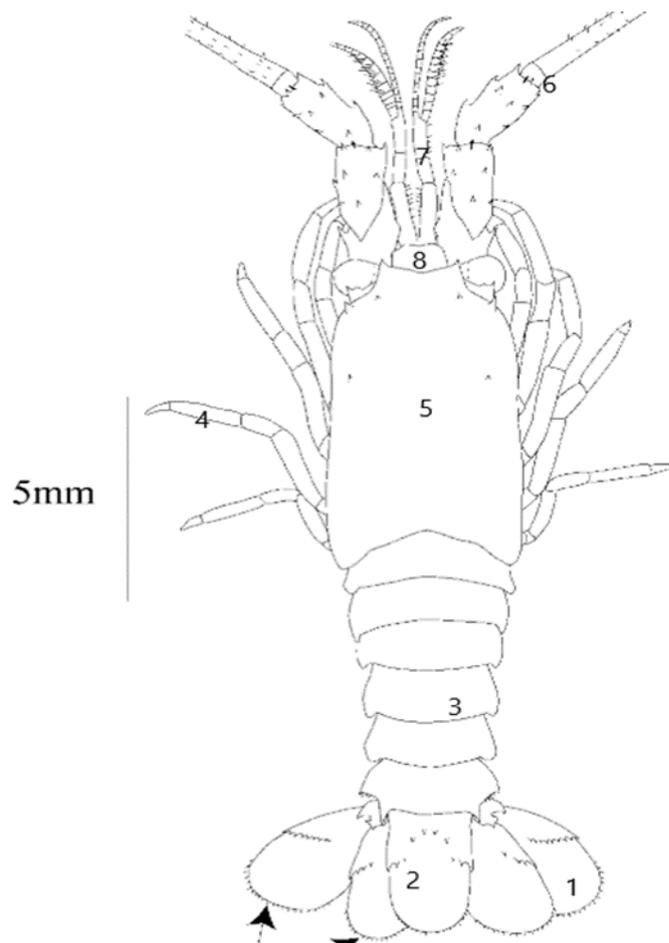
As análises morfológicas foram realizadas com a utilização de uma lupa em laboratório, que permitiu a visualização mais próxima e em melhor qualidade das estruturas dos *pueruli*.

Todas as amostras foram observadas separadamente em uma placa de petri sob a lupa com o fundo preto, para melhor visualização e com o auxílio de um software de visualização das imagens e registro das mesmas em um computador.

As características observadas em cada uma das larvas *puerulus* se basearam em estudos anteriores a fim de comparação e que levaram em consideração a similaridade morfológica desse estágio entre as diferentes espécies de *Panulirus* o que torna a identificação complexa, sendo necessária a observação detalhada e focada em diferenças na quantidade e tamanho dos espinhos, proporções corporais e o processo de calcificação, para auxiliar na identificação (BOOTH; PHILLIPS, 1993). Além disso, para fins didáticos foi feita a divisão corporal de puerulus em duas partes, o cefalotórax e o abdômen, conforme descrito previamente na bibliografia (GOLDESTEIN et al., 2008;

GUERAO et al., 2006; HOLTHUIS, 1991; WILLIAMS, 1986). E em cada uma delas foram observadas diversas estruturas que serão detalhadas a seguir (Figura 8):

Figura 8: Representação da fase de *puerulus*, com numeração das estruturas analisadas abaixo, sendo: 8 – Placa antennular, 7 – Antenulas, 6 – Antenas, 5 – Região central do cefalotórax, 4 – Pereiópodes, 3 – Somitos abdominais, 2 – Telson, 1 – Urópodes.



Fonte: Adaptado de Goldstein et al. (2008).

#### 4.3 Análises de variabilidade genética

Foram compilados os genomas mitocondriais completos das lagostas do gênero *Panulirus* que estavam disponíveis no GenBank: *P. japonicus*: NC\_004251.1, *P. longipes*: NC\_052749.1, *P. cygnus*: NC\_028024.1, *P. homarus*: NC\_016015.1, *P. ornatus*: NC\_014854.1, *P. penicillatus*: NC\_052750, *P. stimpsoni*: NC\_014339, *P.*

*versicolor* : NC\_028627, *P. argus*: NC\_039671, *P. polyphagus*: MK503959.1 e a lagosta *Homarus americanus* : NC\_015607.1, como grupo externo.

Com o auxílio do programa de análises filogenéticas MEGA X (KUMAR et al., 2018) foram analisados separadamente a região controle, as sequências codificadoras e os genes de Rna-s ribossômicos e de transferência, e após isso foram construídas matrizes de distância percentual utilizando o modelo k2p. (KIMURA, 1980) para cada um dos genes.

Finalmente, foram construídas árvores filogenéticas pelo método Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987) para cada um dos genes separadamente, com a avaliação da consistência dos ramos por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 10.000 repetições.

Para as análises de *P. echinatus*, sequências inéditas para o gene 16S, disponíveis no CEDECAM, foram incluídas nos alinhamentos do MEGA X e adicionadas a árvore filogenética do gene 16S juntamente com as sequências das outras espécies analisadas, para fins de comparação de distâncias entre elas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Descrição morfológica

#### 5.1.1 Fases de *pueruli* observadas

Foram coletadas ao todo 22 amostras que foram divididas em 2 grupos (Figura 9), baseados na calcificação do exoesqueleto, sendo que a primeira fase em que a larva é transparente/esbranquiçada e que já se iniciou o processo de calcificação do exoesqueleto nas larvas (IVO; PEREIRA, 1996) e que foram coletadas dez amostras (amostras de 1 a 10, Figura 10A e 10B) de *puerulus* com estas características. E a segunda fase em que os *pueruli* iniciam o processo de calcificação e adquirem uma tonalidade diferente de esbranquiçada ou transparente, sendo observada essas pigmentações de coloração avermelhada e amarronzada de diferentes intensidades, distribuídas em bandas laterais pelo cefalotórax, rostrum e abdômen abrangendo 12 amostras (amostras de 11 a 22, Figura 10C e 10D).

Figura 9: Os dois grupos de *pueruli* e *pós-pueruli* coletados na enseada do Mucuripe na cidade de Fortaleza no litoral central do estado do Ceará.



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 10: Diferentes estágios de desenvolvimento da larva *puerulus*. Primeira fase: A – fase transparente e B – Início de pigmentação; Segunda fase: C – Pigmentação avançada e pouca calcificação, D - Pigmentação e calcificação avançadas



Fonte: Cedecam, 2019.

### 5.1.2 Cefalotórax

#### A) Região Dorsal do cefalotórax

##### 1. Antênula

Apresentam o pedúnculo com três segmentos (Figura 11), no qual há pequenas cerdas no 1º segmento ou segmento proximal, sendo cinco cerdas interiores, e uma cerda exterior. O 2º e 3º segmentos, ou segmentos distais, apresentam menos cerdas. O flagelo interno é levemente mais longo do que o externo, esse último apresentando várias cerdas em sua extremidade anterior, sendo essas maiores que as presentes nos segmentos. As características morfológicas observadas na antênula são semelhantes às do trabalho de Goldstein et al. (2008).

As antênulas não apresentam uma variação significativa na sua coloração entre os estágios de *puerulus* e *pós-puerulus*, possuindo sempre uma coloração esbranquiçada sem pigmentação.

Figura 11 – Antênula da fase de *puerulus* em destaque, as numerações 1, 2 e 3 representam a ordem dos segmentos, e a 4 destaca as cerdas do flagelo exterior.



Fonte: Autor, 2020.

## 2. Antena

Possui quatro segmentos nos pedúnculos, sendo o mais proximal e o distal os menores, e os dois centrais maiores (Figura 12). O segmento proximal apresenta um espinho anterolateral robusto, no segmento central distal há a presença de 8 espinhos dorsais e um anterior e no segmento distal não há espinhos e nem cerdas. Goldstein et al. (2008), menciona que no 3º segmento há um espinho arredondado na margem anterolateral, o que não foi possível de ser observado em lupa e nas fotografias.

Figura 12 – Antenas de *puerulus* anterior a fase de calcificação, em numeração de 1 a 4 os segmentos do pedúnculo antenal, e representando a antena, está o número 5.



Fonte: Autor, 2020.

A antena é maior em comprimento do que o tamanho corporal da larva puerulus, sendo maior que o pedúnculo antenal, possuindo vários pares de espinhos diminutos distribuídos na lateral por todo o seu comprimento. A coloração inicial é esbranquiçada, tanto na antena, como no pedúnculo, porém à medida que ocorre o desenvolvimento da larva, o pedúnculo é o primeiro que apresenta a alteração inicial da cor, surgindo tons vermelho-amarronzados nessa estrutura, que se estendem até a base das antenas, porém nessas com menor intensidade da cor ao longo de sua distribuição (Figura 13).

Figura 13 – Antenas de puerulus na fase de calcificação mais avançada, perceba a mudança da coloração para vermelho amarronzado do pedúnculo antenal até a base das antenas, seguindo a seta ilustrada.



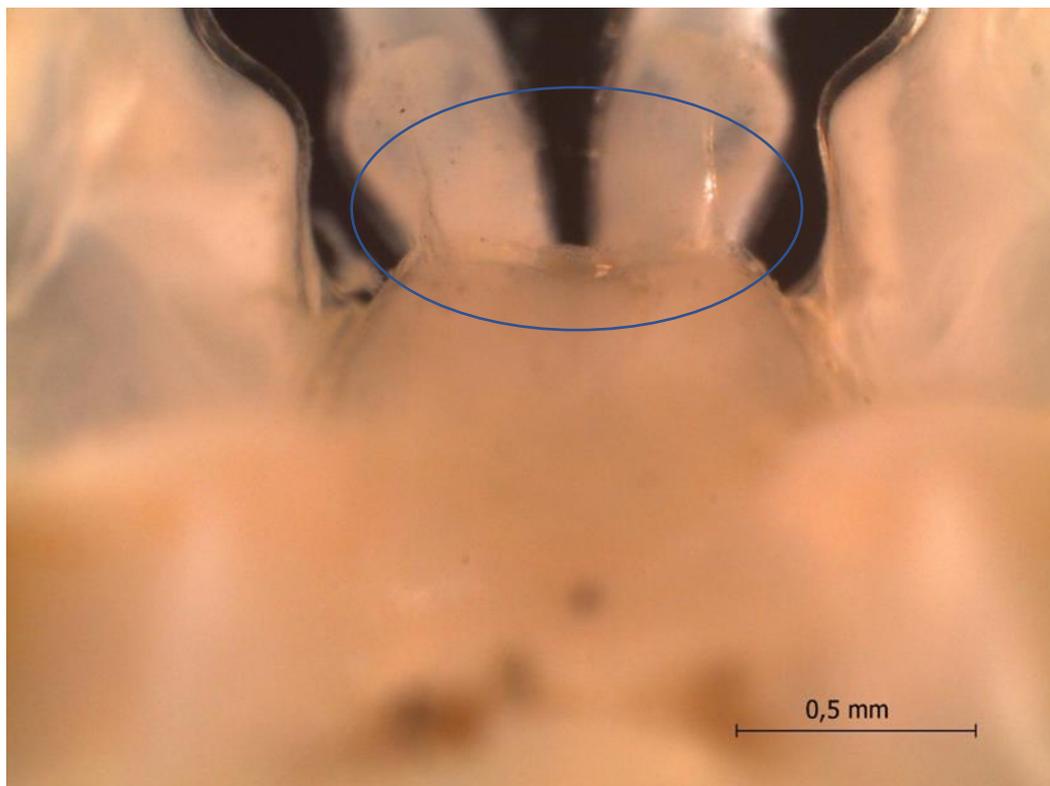
Fonte: Autor, 2020.

### 3. Placa antenular

A placa antenular, situada entre os olhos, se caracteriza como a base das antenas e antenulas, se assemelhando a um formato de uma placa triangular, a partir da fase juvenil surgem na região um ou dois pares de espinhos robustos (HOLTHUIS, 1991).

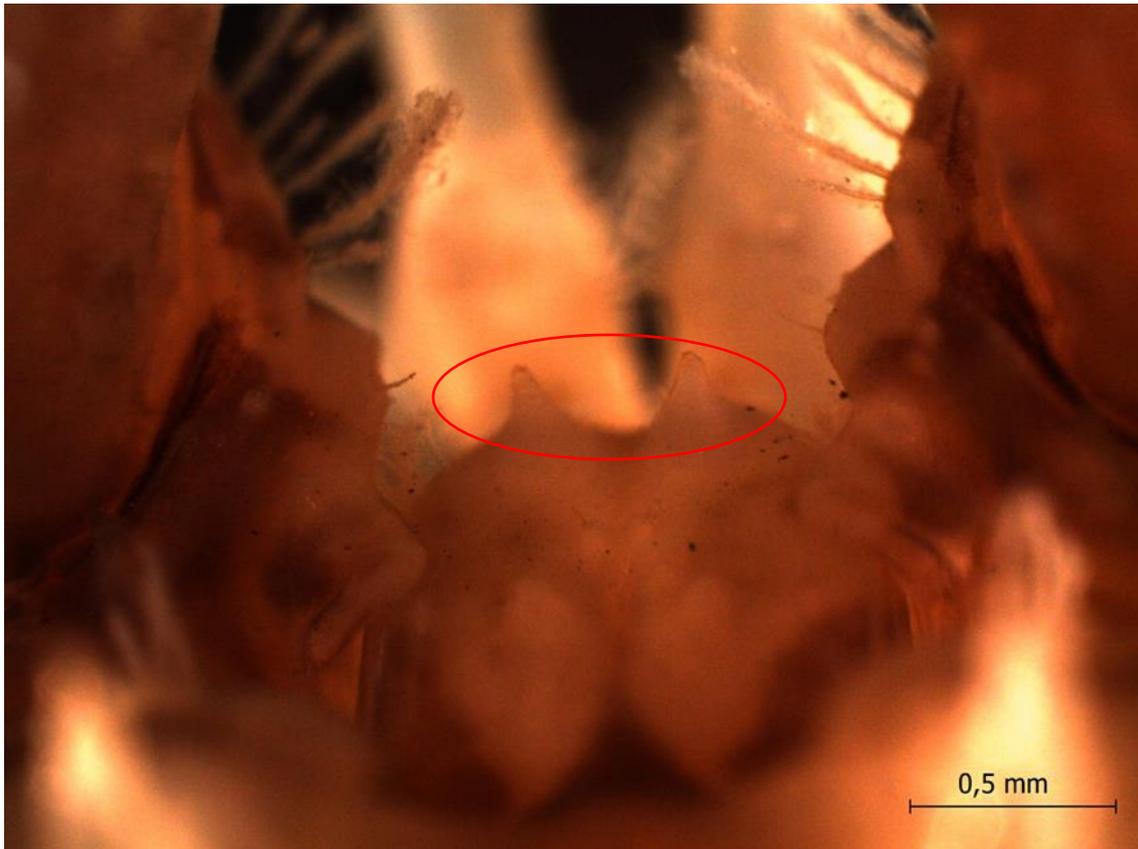
Os estágios de *puerulus* sem pigmentação evidente não apresentaram espinhos em sua estrutura, com exceção da amostra 5, que havia 2 espinhos anterolaterais finos na mesma (Figura 14). Porém nas amostras de *pós-puerulus* era visível o crescimento de um par de pequenos espinhos posterolaterais na estrutura, se tornando mais evidente à medida que o desenvolvimento da pós-larva ocorre (Figura 15), sendo possível notar o crescimento do 2º par de espinhos da imagem. Em algumas amostras os espinhos eram mais robustos, nessas era evidente o desenvolvimento para pós-larva, porém em uma, na amostra 13, em que a pigmentação da larva já havia se iniciado, se apresentou mais fina, semelhante ao que foi observado na amostra 5.

Figura 14 – Placa antenular do *puerulus* da amostra 5, destaque para a presença de um par de espinhos finos na região anterior da estrutura.



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 15 - Placa antenular de *puerulus* na fase de calcificação, perceba o crescimento do par de espinhos robustos na região anterior da estrutura



Fonte: Cedecam, 2019.

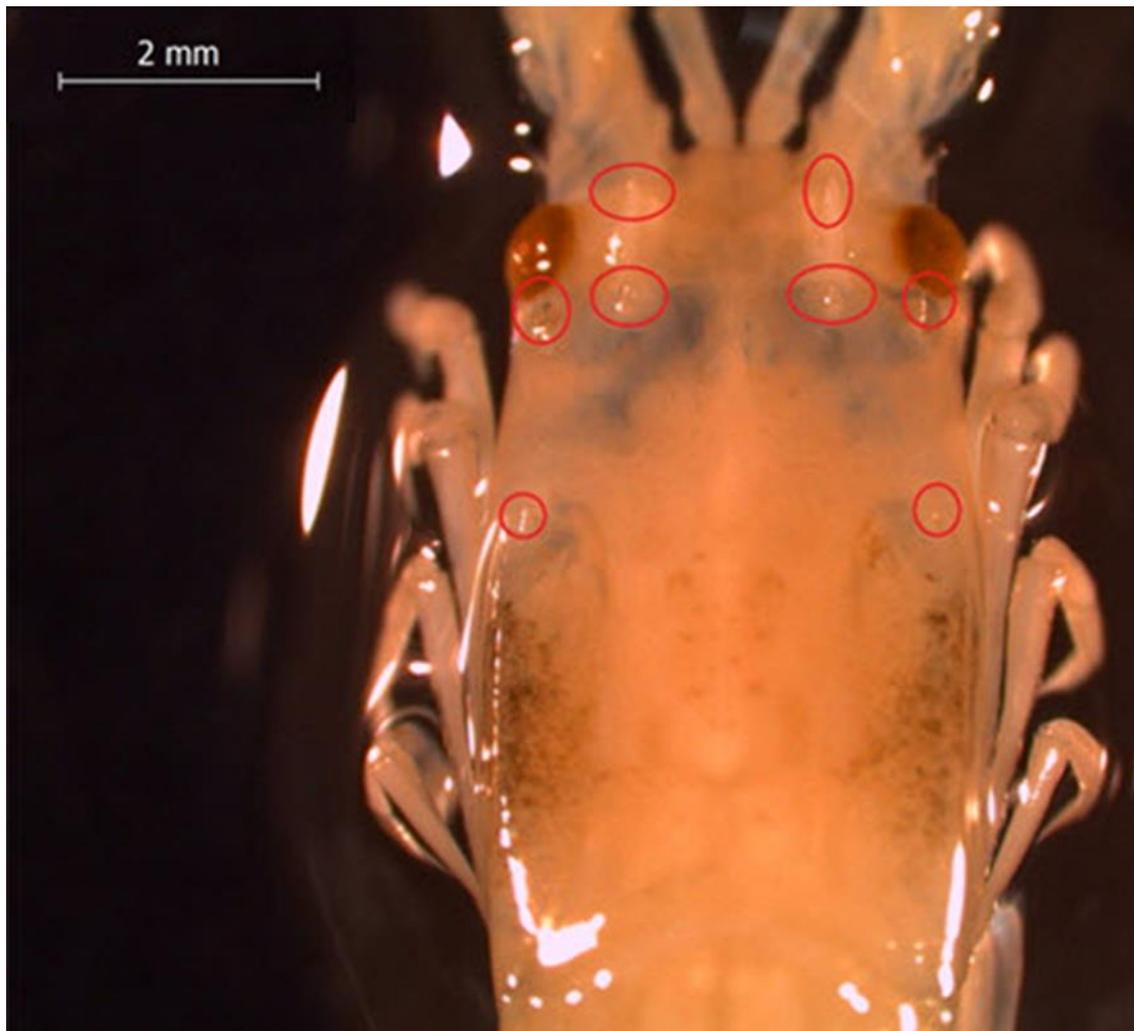
Com relação a calcificação, não foram observadas mudanças significativas nessa estrutura, apresentando um tom amarelado esbranquiçado na maioria das vezes, porém, nos estágios de *pós-puerulus*, as regiões mais próximas as margens, adquirem uma tonalidade amarronzada vermelha.

#### **4. Região Orbital**

##### **Espinhos**

Na região orbital do cefalotórax das amostras sem calcificação foram observados os pares de espinhos mais visíveis nessa estrutura (Figura 16), sendo esses o par de espinhos supraorbitais, espinhos anterolaterais, espinhos posteriores aos anterolaterais, e os espinhos branquiais mais abaixo, assim como descritos em Goldstein et al. (2008).

Figura 16 – Região orbital do cefalotórax de *Puerulus* sem calcificação com os 4 pares de espinhas em destaque, notemos que o sulco cervical não é perceptível.



Fonte: Cedecam, 2019.

À medida que ocorre o desenvolvimento larval, com o aumento da calcificação sobre a estrutura corporal, outros espinhos se desenvolvem, e os espinhos já observados tornam-se mais proeminentes e visíveis (Figura 17).

Figura 17 – Região orbital do cefalotórax de *puerulus* que já iniciou a fase de calcificação, em destaque os 4 pares de espinhas descritos, note para o aumento da quantidade de espinhos e formação do sulco cervical nessa região, entre o 3° e o 4° par de espinhos



Fonte: Cedecam, 2019.

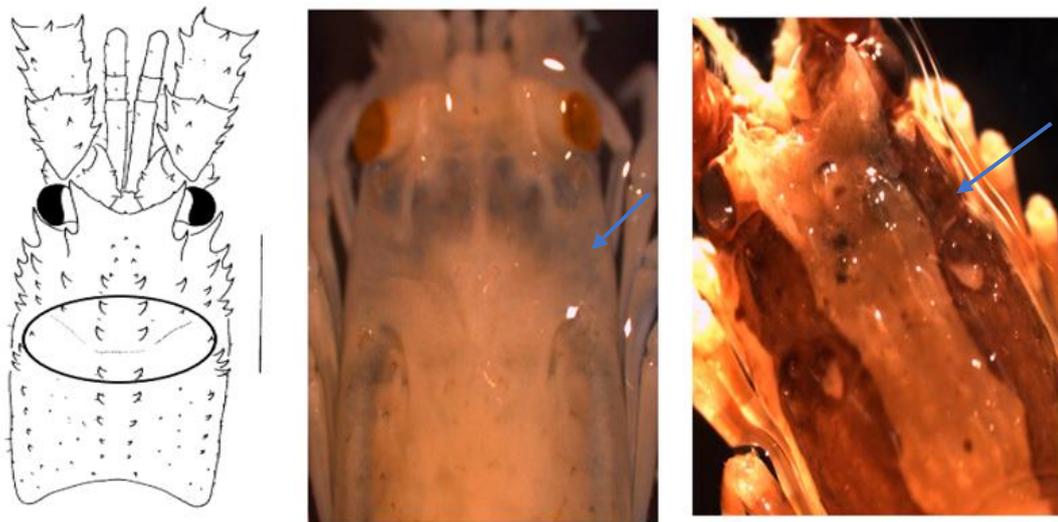
## **B. Região distal do cefalotórax**

### **1. Sulco cervical**

Na região mais posterior do cefalotórax não foi perceptível a observação do sulco cervical nas amostras em fase transparente. À medida que se inicia o processo de calcificação no corpo da larva, se torna mais evidente a formação do sulco, estando

localizado entre os pares de espinhos branquiais e os pares de espinhos posteriores aos anterolaterais (Figura 18). Em *Palinurus mauritanicus*, uma lagosta de espinho mediterrânea, Guerao et al. (2006) observaram o sulco cervical já visível no estágio de *puerulus*, e no estágio de *pós-puerulus* já se encontra semelhante ao sulco do animal.

Figura 18 – Comparação entre a região do sulco cervical das larvas *pueruli* com o trabalho de Guerao et al (2006), um *puerulus* em fase sem calcificação e outro já na fase de calcificação avançada, as setas azuis indicam a região do sulco cervical.



Fonte: Cedecam (2019) e Guerao et al. (2006).

### C. Região lateral do cefalotórax

#### 1. Brânquias

A região branquial é bem visível nas amostras em fase sem calcificação, sendo mais transparente que os arredores, sendo que estão localizadas dos lados esquerdo e direito do cefalotórax, abaixo dos pares de espinhos branquiais (Figura 19).

Figura 19 – *Puerulus* anterior a fase de calcificação, em destaque a região branquial localizada dos lados esquerdo e direito do cefalotórax



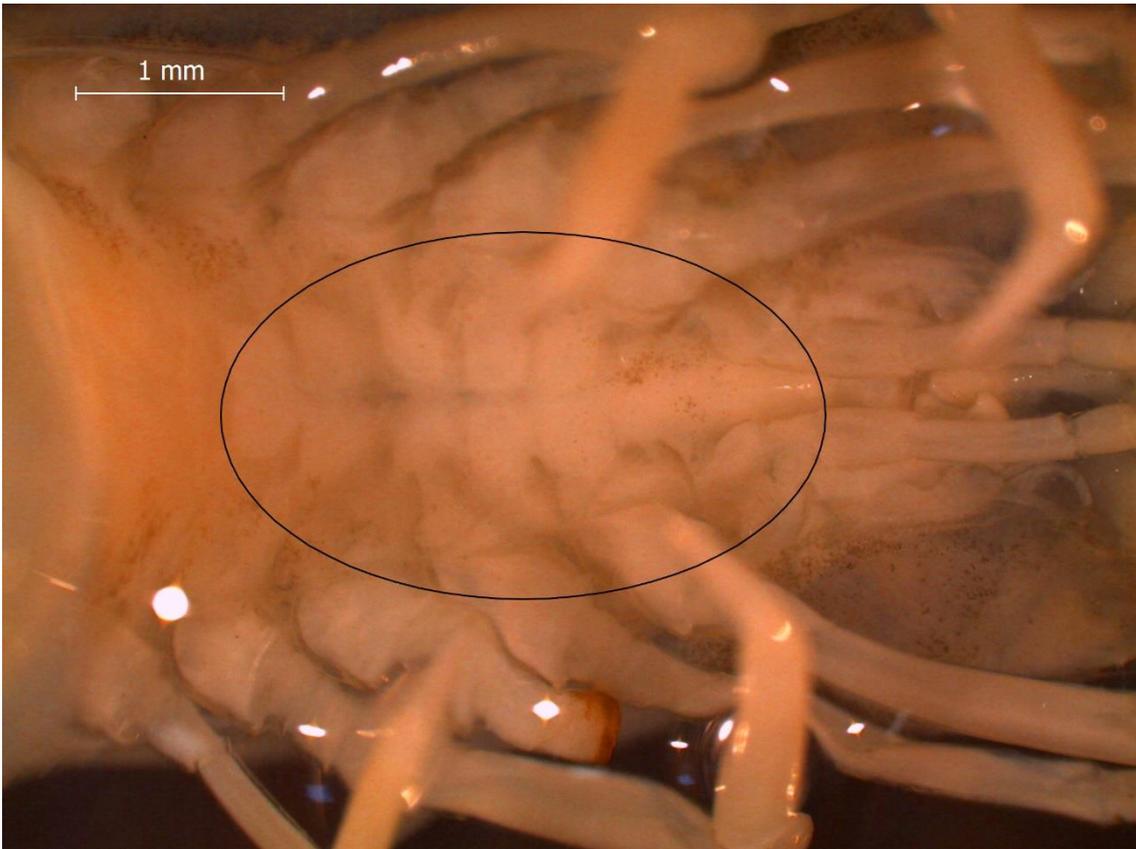
Fonte: Cedecam, 2019.

## D) Região Ventral do Cefalotórax

### 1. Esterno

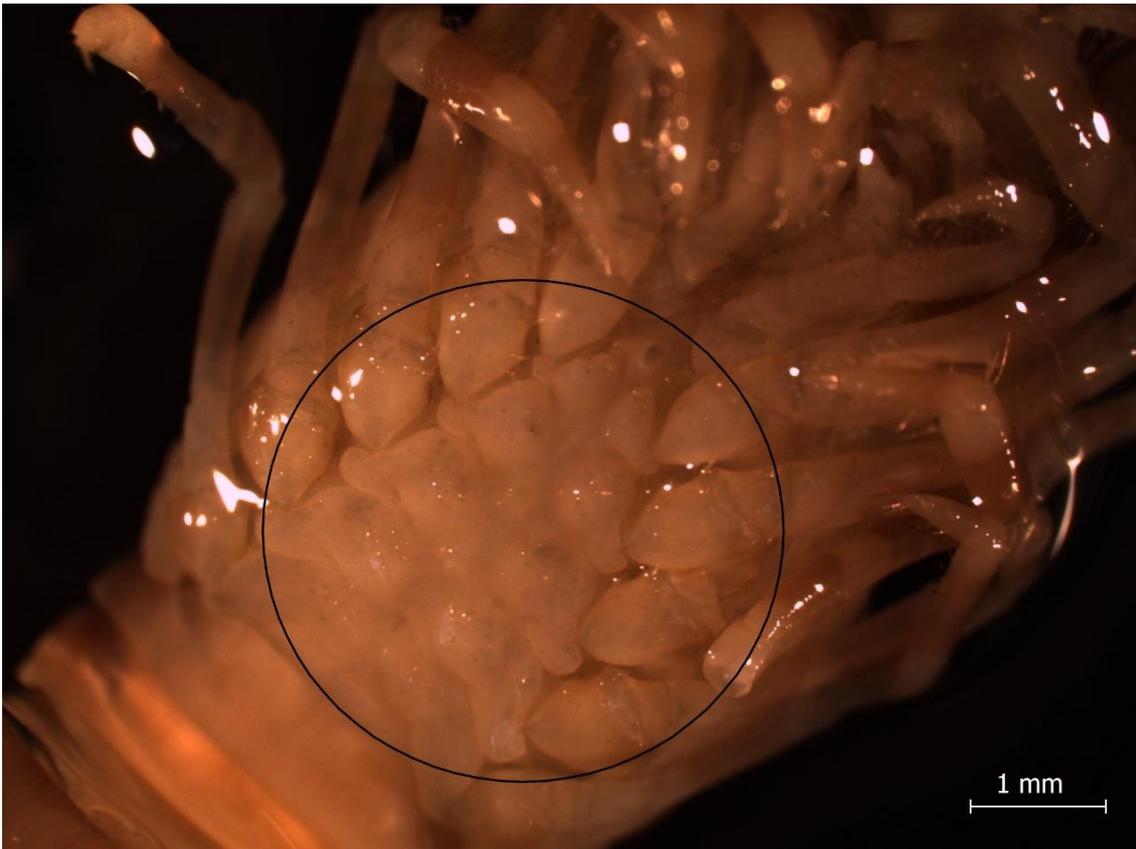
Apresenta um formato triangular, e possui uma cutícula fina na região, de coloração transparente leitosa (Figura 20). Goldstein et al. (2008) menciona a visualização de um par de pequenos espinhos esternais anterolaterais, próximas a base do 5º pereiópode, e menciona a existência de protuberâncias arredondadas próximas a base do 2º ao 5º pereiópodes, ambos não visualizados nas amostras analisadas. É perceptível a divisão cada vez mais evidente do esterno, à medida que a larva atinge o estado de *pós-puerulus*, ficando bem visível a divisão entre o esterno e os pereiópodes (Figura 21).

Figura 20 – Região ventral do cefalotórax de *puerulus* sem calcificação, com o esterno destacado na imagem



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 21 – Região ventral do cefalotórax de *puerulus* que já se iniciou a fase de calcificação, perceba a melhor divisão existente entre o esterno e os pereiópodos.



Fonte: Cedecam, 2019.

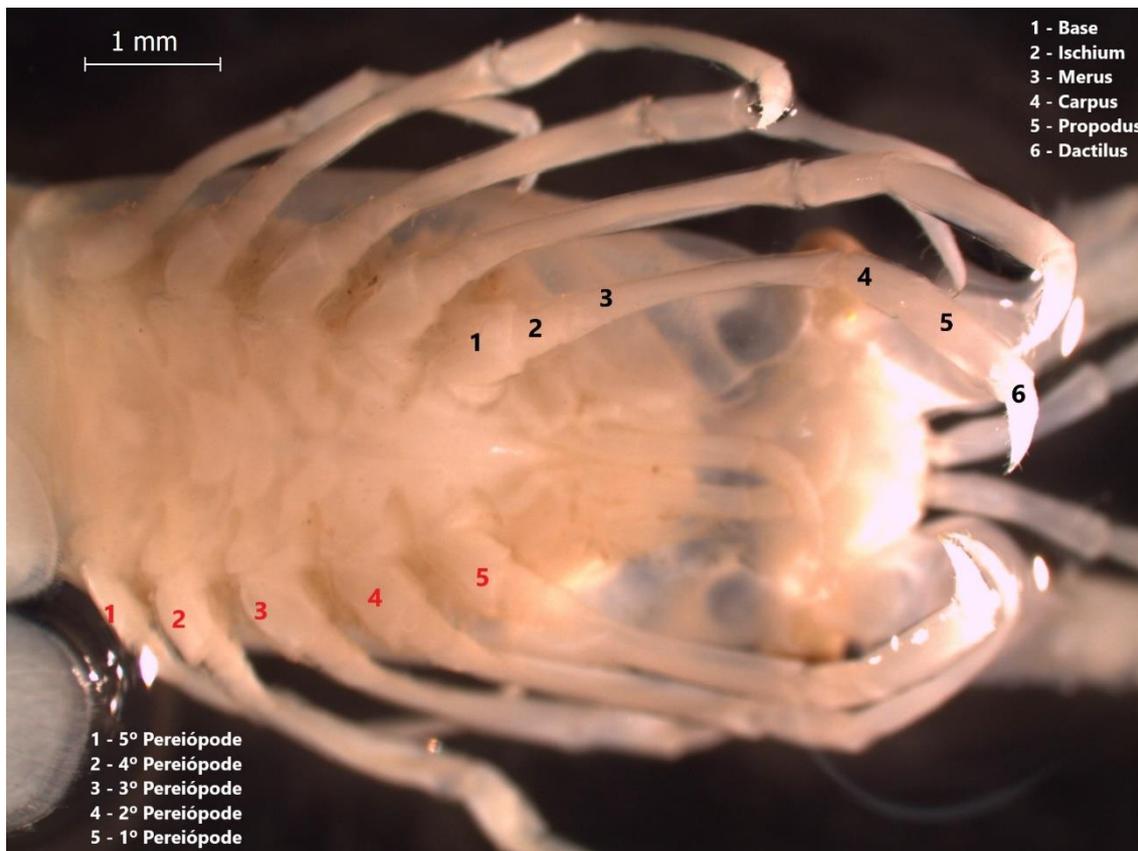
## 2. Pereiópodos

As lagostas são animais decápodes, que remete a ‘dez pés’, possuindo assim cinco pares de pereiópodes em seu corpo, sendo também observados em suas larvas no estágio de *puerulus*. Cada pereiópodo é dividido em seis segmentos, sendo os seguintes dos mais proximal para o distal: 1 - Base, 2 - Ischium, 3 - Merus, 4 - Carpus, 5 - Propodus e 6 - Dactilus, sendo possível observar a divisão dos mesmos nas amostras de *pueruli* (Figura 22). Com relação ao tamanho dos segmentos, do maior para o menor: Merus, Propodus, Carpus, Ischium, Dactilus, este apresenta uma ponta fina, como se fosse uma unha, e pôr fim a base, o segmento menor. Não foram observadas cerdas ou espinhos nessas estruturas.

Com relação a coloração, até a fase sem calcificação, todas apresentam uma coloração esbranquiçada leitosa em seus pereiópodes, porém a partir das amostras com indícios do processo de calcificação e coloração, uma coloração vermelho-amarronzada começa a se tornar cada vez mais evidente, se destacando em bandas horizontais pelos

pereiópodos, apresentando intensidades diferentes, aumentando de acordo com o grau de desenvolvimento da larva para o estágio de pós-larva (Figura 23).

Figura 22 - Região ventral do cefalotórax do *puerulus* anterior a fase de calcificação, representando os pereiópodos, a numeração em preto representa os segmentos dos pereiópodos 1 - Base, 2 - Ischium, 3 - Merus, 4 - Carpus, 5 - Propodus e 6 - Dactilus. E a numeração em vermelho indica os cinco pares de pereiópodos, a legenda está representada na imagem em branco



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 23 – Região ventral do cefalotórax do *puerulus* na fase de calcificação representando os pereiópodos, percebe a modificação das cores com um padrão intercalado de coloração amarronzada e branca que ocorre ao longo dos pereiópodos



Fonte: Cedecam, 2019.

### 5.1.3 Abdômen

#### A) Região Dorsal do abdômen

##### 1. Somitos abdominais

A região é dividida em seis somitos abdominais e o télson. As placas pleurais terminam no formato de um dente alongado (Figura 24), com exceção da amostra 19 que já se apresentava mais avançada no processo de desenvolvimento para *pós puerulus*, e que as placas pleurais terminavam no formato de dois dentes alongados (Figura 25), porém as amostras 14 e 21 também se encontravam avançadas nesse processo, e possuíam as placas pleurais semelhantes as outras.

No 6º somito abdominal, dois espinhos laterais robustos se fazem presentes (Figura 25), direcionadas posterolateralmente, também de acordo com o que foi observado por Goldstein et al. (2008). Com relação a presença de sulcos ou ranhuras nos somitos, um fator chave para a diferenciação entre *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*, na qual a primeira espécie apresenta ranhuras nos somitos e a segunda possui

somitos lisos (WILLIAMS, 1986), foram observadas ranhuras nos somitos das larvas mais desenvolvidas, com destaque para as que já estavam iniciando o estágio de *pós puerulus*, na qual era bem perceptível os sulcos presentes nesses segmentos (Figura 26). Portanto, as *pós pueruli* com a presença de ranhuras foram identificadas morfologicamente como pertencentes à espécie *P. argus*.

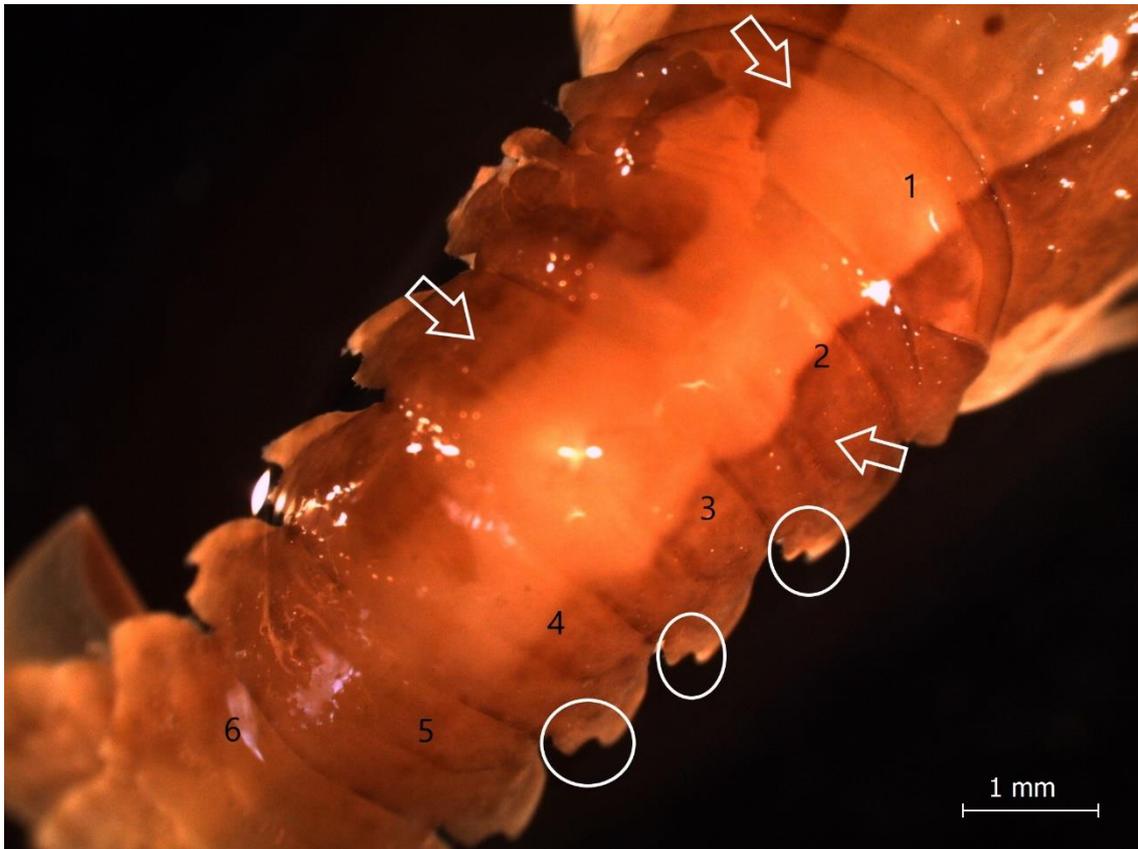
Com relação a coloração, as amostras em estágios iniciais de *puerulus*, não apresentaram nenhum tipo de pigmentação no abdômen, sendo esse de cor esbranquiçada. Porém à medida que vão avançando para o estágio de *pós-puerulus*, bandas amarronzadas começam a aparecer nas laterais opostas do abdômen, se estendendo e cobrindo inteiramente as placas pleurais, seguindo o mesmo padrão de coloração observado no cefalotórax, em um padrão vertical.

Figura 24 – Região dorsal do abdômen do *puerulus*, representando em destaque as placas pleurais terminadas no formato de um dente alongado.



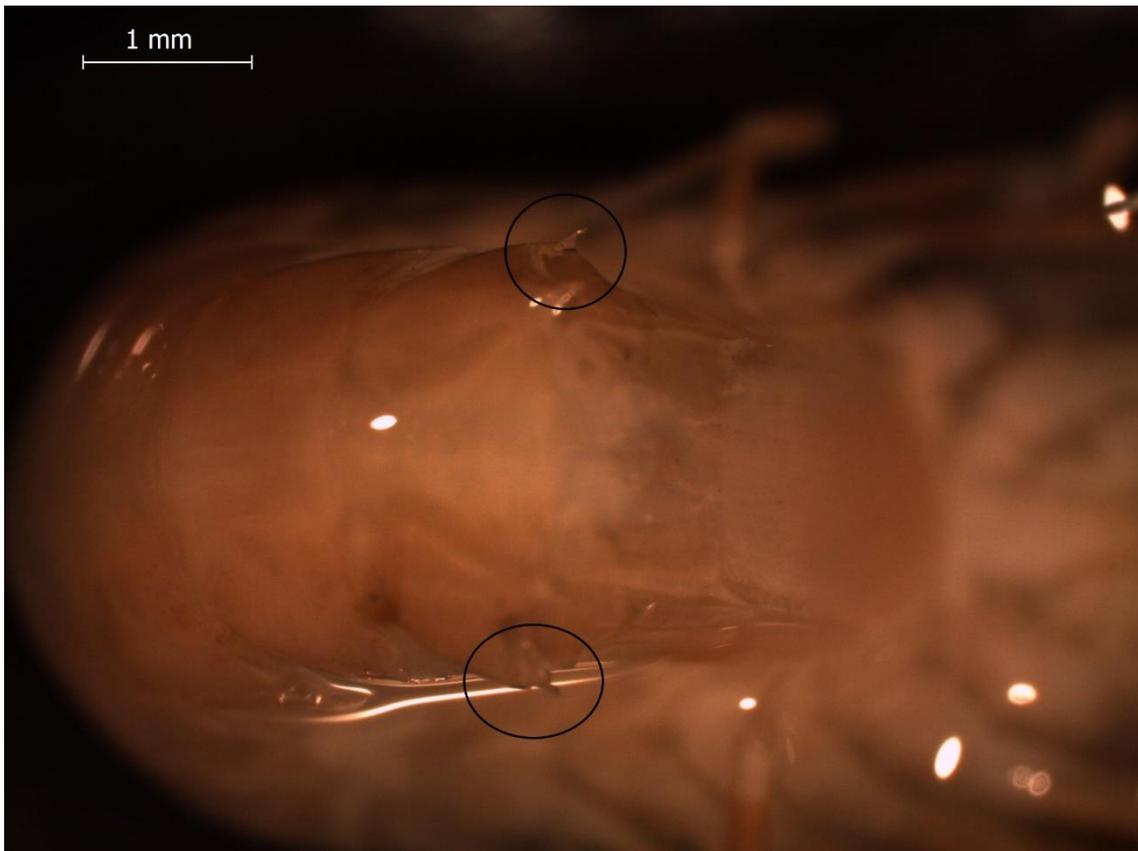
Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 25 – Região dorsal do abdômen do *puerulus*, as setas apontam para os sulcos nos somitos abdominais e as regiões circuladas mostram as placas pleurais terminando em dois dentes alongados, a numeração de 1 a 6 representa cada somito.



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 26 – Região dorsal do abdômen de *puerulus*, destacando o par de espinhos presentes no 6º segmento abdominal.



Fonte: Cedecam, 2019.

## 2. Urópodes

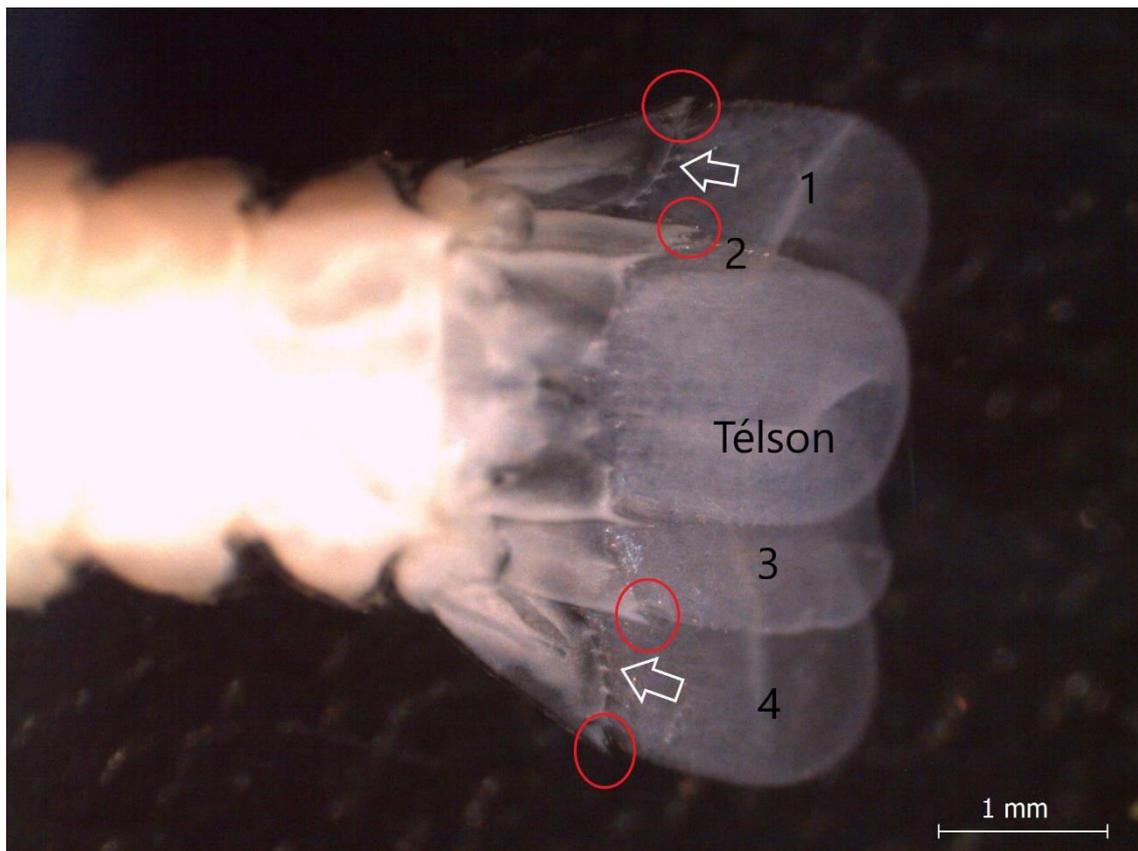
Os *pueruli* apresentam 2 pares de urópodes separados pelo télson (Figura 27). Essa estrutura possui um espinho robusto posterolateral em cada urópode na margem calcificada, e na divisão entre a margem exterior e interior dos urópodes, há a presença de pequenos espinhos, havendo seis em cada uma. Cerdas não são visíveis nas amostras que não se desenvolveram para o estágio de *pós-puerulus*, sendo bem visíveis nas amostras 14, 19 e 21, com cerdas bem desenvolvidas na margem posterior da parte não calcificada (Figura 28).

Apresenta tons semelhantes ao télson, de coloração transparente na parte calcificada e mais esbranquiçada na parte não calcificada, e ao ocorrer o desenvolvimento para a fase de *pós-puerulus* a inversão de coloração ocorre, sendo a margem interior mais esbranquiçada e com leve pigmentação avermelhada, e a exterior mais transparente com também uma leve pigmentação vermelha.

Em Goldstein et al. (2008), as cerdas e espinhas observadas estão de acordo com o que foi descrito nesse trabalho, porém em relação ao de Guerao et al. (2006), que analisa

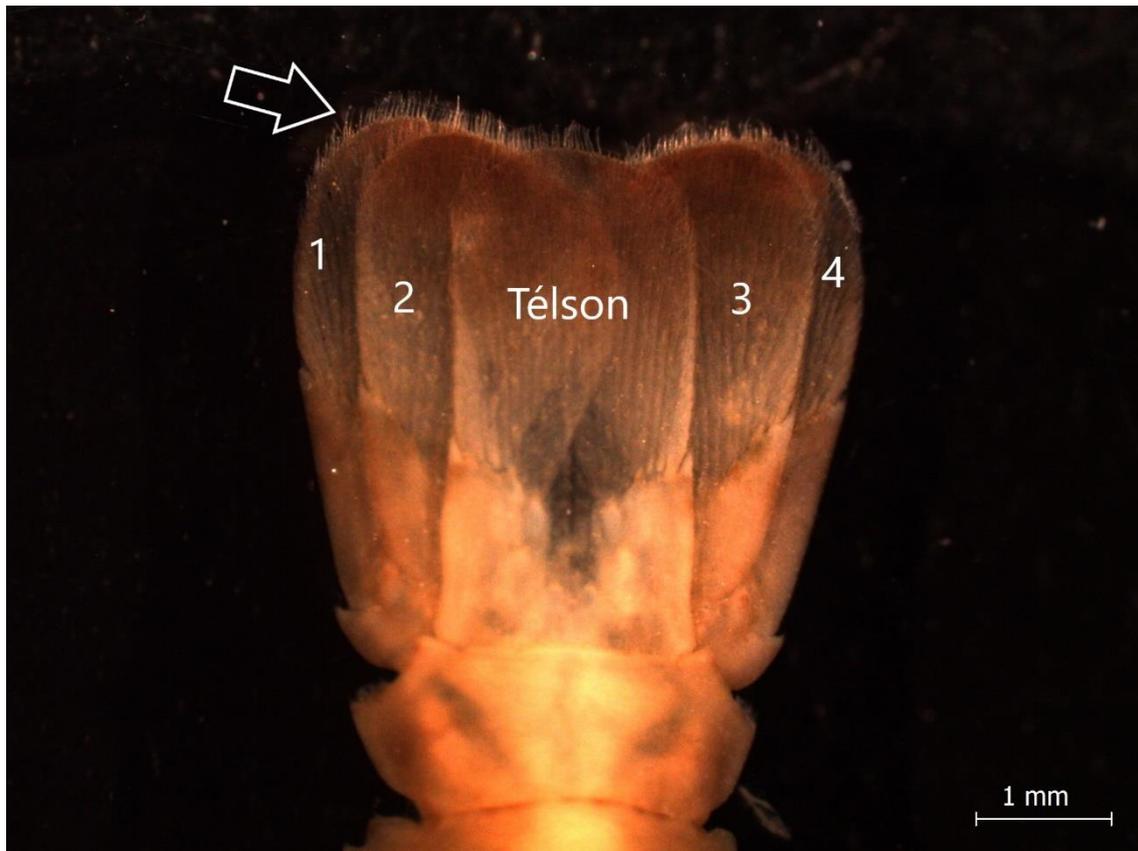
morfologia de *puerulus* de *Palinurus mauritanicus*, apenas as cerdas observadas nas margens posteriores do ramo externo são semelhantes ao observado.

Figura 27 – Região dorsal do abdômen de *puerulus*, representando os urópodes, as numerações 1 – 4 indicam os 4 urópodes, o 2º está quase totalmente coberto pelo télson. A zonas em destaque de vermelho representam os espinhos robustos na margem calcificada dos urópodes, e as setas brancas os espinhos entre a divisão da margem calcificada e não calcificada.



Fonte: Cedecam, 2019.

Figura 28 – Representação da zona dorsal do abdômen do *puerulus* na fase de calcificação, em destaque os urópodes apresentando cerdas desenvolvidas em suas extremidades posteriores, a numeração representa a quantidade de urópodes, com o télson entre eles.



Fonte: Cedecam, 2019.

### 3. Telson

Apresenta um par de espinhos na parte lateral da margem calcificada do telson, com alguns espinhos distribuídos diagonalmente a partir desses, na divisão entre a margem exterior e interior. Na parte não calcificada do telson não há espinhos, não apresentando cerdas na sua margem posterior, sendo que essas se tornam bem mais evidentes nas amostras que apresentam um desenvolvimento mais avançado para a fase de *pós-puerulus* (Figura 28).

De coloração transparente na parte calcificada, e mais esbranquiçada na parte não calcificada (Figura 27), o que se observa com o desenvolvimento para a fase de *pós-puerulus* é uma inversão da coloração, se tornando mais esbranquiçada a parte calcificada, e mais transparente a parte não calcificada, somado a isso, uma pigmentação mais avermelhada é observada em ambas as partes (Figura 28), podendo ser um efeito do processo de calcificação dessas larvas.

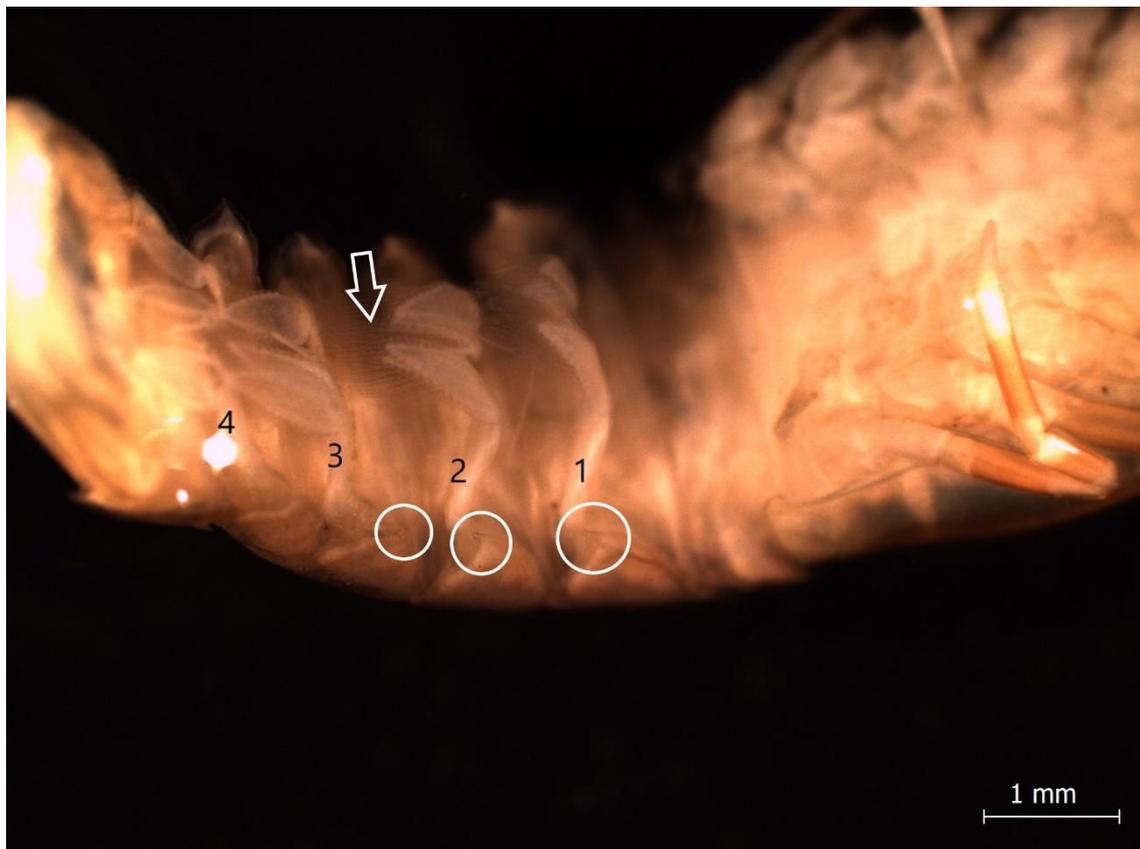
## B) Região Ventral do abdômen

### 1. Pleópodes

Os pleópodes estão presentes somente entre o 2º e 5º somitos abdominais, havendo um total de 4 pares. Há presença de cerdas longas e aplumadas no ramo interior e exterior (Figura 29). Em relação ao tamanho o exópode é bem mais robusto que o endópode.

A coloração é esbranquiçada em todas as amostras, não adquirindo uma pigmentação característica, mesmo nas amostras em etapas iniciais de pós-larval, não foi observado uma mudança significativa na coloração dessas estruturas.

Figura 29 – Região ventral do abdômen, representando os pleópodes, a numeração representa a quantidade de pares, e a seta branca destaca as cerdas presentes nos endópodes e exópodes. Somitos abdominais em formato de um dente alongado circulado em branco.



Fonte: Cedecam, 2019.

### 5.1.4 Identificação das amostras

Não existem chaves de identificação para os *pueruli* de lagostas, existindo somente trabalhos que fazem uma descrição morfológica desse estágio (GOLDSTEIN et al., 2008; GUERAO et al., 2006). Com isso, na tentativa de identificar as amostras de *puerulus* descritas acima, foram utilizadas chaves de identificação de lagostas adultas como guia (WILLIAMS, 1986).

Não é possível ser realizada uma diferenciação em espécies das amostras de *puerulus* que não apresentaram início do processo de calcificação, ou seja, de coloração transparente a esbranquiçada, devido à falta de diferenças entre as amostras pelo estágio de desenvolvimento em que se encontravam. Porém sabe-se que todas pertencem ao gênero *Panulirus*, devido a presença de pequenos espinhos distribuídos pelo cefalotórax e nas antenas (HOLTHUIS, 1991) e de acordo com a morfologia geral descrita para as larvas desse gênero, e entre as espécies pertencentes ao gênero. *Panulirus argus*, *Panulirus laevicauda* e *Panulirus echinatus* são as espécies mais encontradas no litoral cearense (CRUZ et al., 2021; HOLTHUIS, 1991), indicando uma maior probabilidade das larvas pertencerem a essas espécies.

Para indivíduos adultos, as principais diferenças observadas entre *P. argus* e *P. laevicauda* são os padrões de coloração, que não é possível observar nos *pueruli* devido a sua coloração transparente. Portanto, a presença de ranhuras nos somitos abdominais indicativos da espécie *P. argus*, ou ausência de ranhuras nos somitos indicando a possibilidade de pertencer a espécie *P. laevicauda* ou *P. echinatus* (WILLIAMS, 1986).

Até o início da fase de *pós-puerulus* não são perceptíveis a presença de ranhuras nos somitos abdominais, porém em todas as amostras de *pós-puerulus* é perceptível a presença dessas ranhuras, como foi descrito anteriormente, logo, conclui-se que essas pós-larvas (amostras 14, 19 e 21) após análises morfológicas pertencem a espécie *Panulirus argus*.

## 5.2 Variabilidade genética de lagostas do gênero *Panulirus*

### 5.2.1 – Tabelas de distâncias genéticas entre os genes mitocondriais

Após as análises realizadas no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018), foram obtidas as distâncias genéticas médias para os genes da região controle, COXI, COXII,

COXIII, tRNA12s e tRNA16s, Citocromo b, ATP 6 e ATP 8, NADH 1, NADH 2, NADH 3, NADH 4, NADH 4L, NADH 5 e NADH 6, de cada uma das sequências do DNA mitocondrial completo das lagostas do gênero *Panulirus* que estavam disponíveis no GenBank.

Duas tabelas foram criadas, uma representa as distâncias sem a inclusão do grupo externo (Tabela 1), representado pela espécie *Homarus americanus*, e a outra tabela representa as distâncias médias com a inclusão no grupo externo na análise filogenética (Tabela 2). Dois métodos foram empregados para analisar as distâncias, o *p-distance* e o kimura-2-parameter.

Tabela 1 – Distâncias genéticas entre os genes sem o grupo externo, *Homarus americanus*, incluído na análise filogenética.  $p$  é distancia percentual, e K2P se refere ao modelo de Kimura (1980) e e.p. representa o erro padrão.

Gene	$p$ (e.p.)	K2P (e.p.)
COXI	0,189 (0,007)	0,223 (0,010)
COXII	0,207 (0,011)	0,250 (0,015)
ATP 8	0,247 (0,021)	0,318 (0,039)
ATP 6	0,220 (0,010)	0,270 (0,016)
COXIII	0,178 (0,009)	0,210 (0,012)
NADH 3	0,236 (0,014)	0,318 (0,024)
NADH 5	0,230 (0,007)	0,285 (0,010)
NADH 4	0,215 (0,007)	0,262 (0,011)
NADH 4L	0,221 (0,016)	0,277 (0,025)
NADH 6	0,269 (0,012)	0,351 (0,021)
CYT B	0,206 (0,008)	0,248 (0,012)
NADH 1	0,215 (0,009)	0,263 (0,013)
16S	0,229 (0,007)	0,311 (0,013)
12S	0,206 (0,008)	0,278 (0,015)
Região controle	0,390 (0,013)	0,577 (0,030)
NADH 2	0,291 (0,009)	0,386 (0,017)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 2 – Distâncias genéticas entre os genes com o grupo externo, *Homarus americanus*, incluído na análise filogenética.  $p$  é distancia percentual, e K2P se refere ao modelo de Kimura (1980) e e.p. representa o erro padrão.

Gene	$p$ (e.p.)	K2P (e.p.)
COXI	0,239 (0,009)	0,290 (0,014)
COXII	0,299 (0,010)	0,386 (0,017)
ATP 8	0,368 (0,013)	0,507 (0,027)
ATP 6	0,331 (0,015)	0,438 (0,028)
COXIII	0,253 (0,003)	0,311 (0,004)
NADH 3	0,319 (0,013)	0,419 (0,024)
NADH 5	0,348 (0,012)	0,470 (0,024)
NADH 4	0,330 (0,012)	0,440 (0,023)
NADH 4L	0,370 (0,021)	0,518 (0,043)
NADH 6	0,440 (0,013)	0,674 (0,035)
CYT B	0,276 (0,008)	0,348 (0,014)
NADH1	0,289 (0,009)	0,371 (0,016)
16S	0,287 (0,069)	0,379 (0,150)
12S	0,323 (0,062)	0,439 (0,142)
Região controle	0,434 (0,043)	0,670 (0,108)
NADH 2	0,404 (0,011)	0,587 (0,026)

Fonte: Autor, 2021.

Dentre todos os genes analisados, o que apresentou maior variabilidade entre os genomas foi a região controle, uma região não codificante do DNA mitocondrial, que apresentou o tamanho variando entre 576 pb para *P. argus*, a até 1487 pb para *H. americanus*, com os valores registrados pelo método K2P sempre maiores que os obtidos por *p-distance*.

A região dos genes COXI, COXII e COXIII, e da Citocromo oxidase b, foram os que apresentaram menor variabilidade nas análises, sendo consideradas regiões mais conservadas geneticamente, e são regiões codificantes de proteínas no genoma. O COXIII foi a região menos variável, apresentando uma distância genética entre o gênero *Panulirus* de 0,178 com 0,009 de erro percentual para *p-distance*, e 0,210 com 0,012 de erro percentual para K2P.

Já entre as análises que foram realizadas em comparação com o grupo externo *Homarus americanus*, a região controle e o gene da desidrogenase 6 (NADH 6), foram os que apresentaram os maiores índices de variabilidade, sendo o da desidrogenase, uma região codificante de proteínas, ainda maior que o da região controle, que não é codificante.

Com relação ao grupo externo, os genes que apresentaram menor variabilidade foram os genes COXI, COXIII e a Citocromo oxidase b. Nessa análise o gene 16S e o desidrogenase 1 (NADH 1) apresentaram valores de variação mais reduzidos que o COXII, um gene que normalmente apresentou valores mais conservados de diferenças genéticas.

A ordem dos principais genes que compõem o genoma mitocondrial das lagostas analisadas nesse estudo, não sofreram nenhum rearranjo entre si, sendo normalmente iniciado pelo COXI, COXII, ATP 8, ATP 6, COXIII, NADH 3, NADH 5, NADH 4, NADH 4L, NADH 6, Citocromo b, NADH 1, 16S, 12S e por fim a região controle, também conhecida como d-loop.

Realizando uma comparação com a ordem do genoma mitocondrial da *Drosophila melanogaster* (GARESSE, 1988; WOLSTENHOLME; CLARY, 1985) (Figura 31), a mosca da fruta, é perceptível que segue a mesma organização do mtDNA das *Panulirus* mencionada no parágrafo anterior, não existindo um rearranjo com o genoma da *Drosophila*.

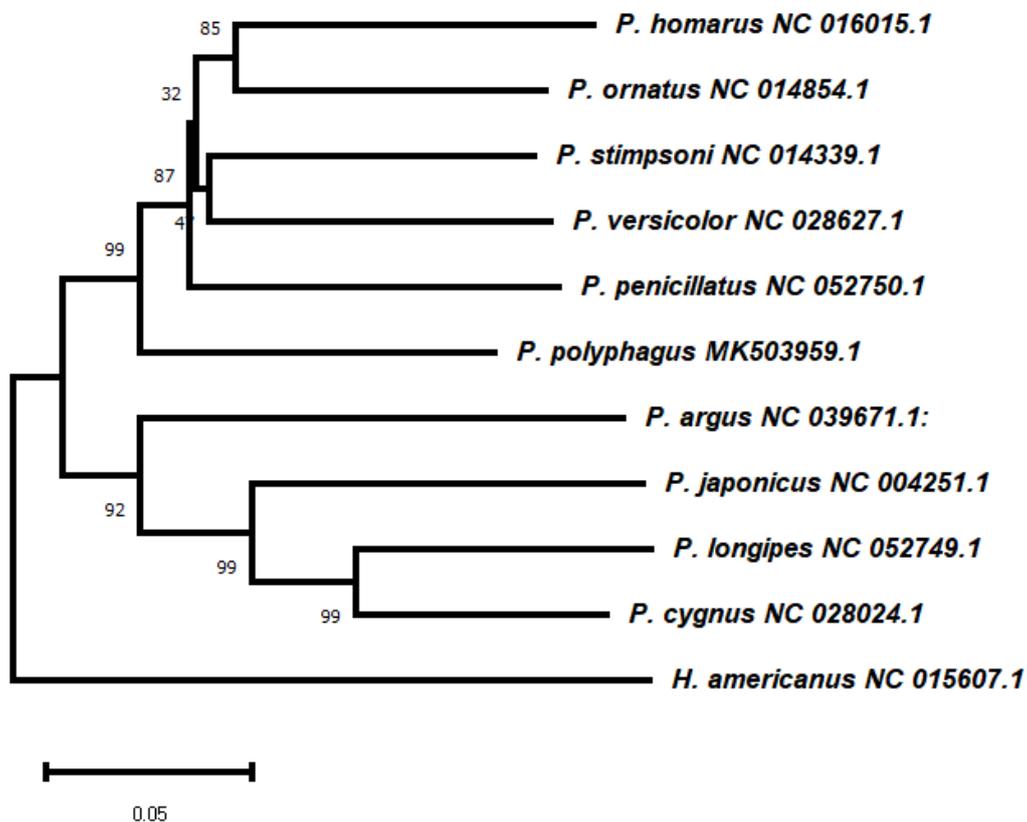
Figura 30 – Genoma mitocondrial da espécie *Drosophila melanogaster*.





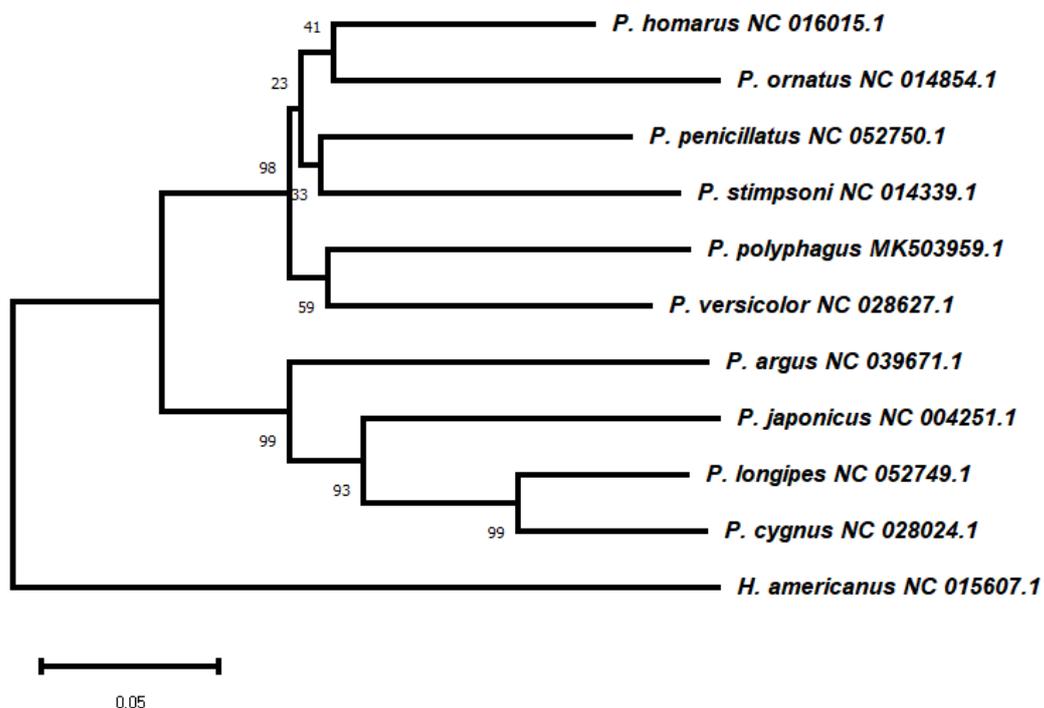
Nas figuras abaixo, pode-se observar as árvores para os diferentes genes do genoma mitocondrial das lagostas analisadas, e é perceptível a presença de dois grupos monofiléticos, o primeiro composto por *Panulirus homarus*, *P. ornatus*, *P. stimpsoni*, *P. versicolor*, *P. penicillatus* e o mais distante mas ainda incluído no grupo, *P. polyphagus*. O segundo é composto por *P. argus*, o mais distante, seguido de *P. japonicus*, *P. longipes* e *P. cygnus*. Por fim, a espécie *H. americanus*, fica de fora dos grupos monofiléticos, por pertencer a um gênero diferente.

Figura 32 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXI para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore.



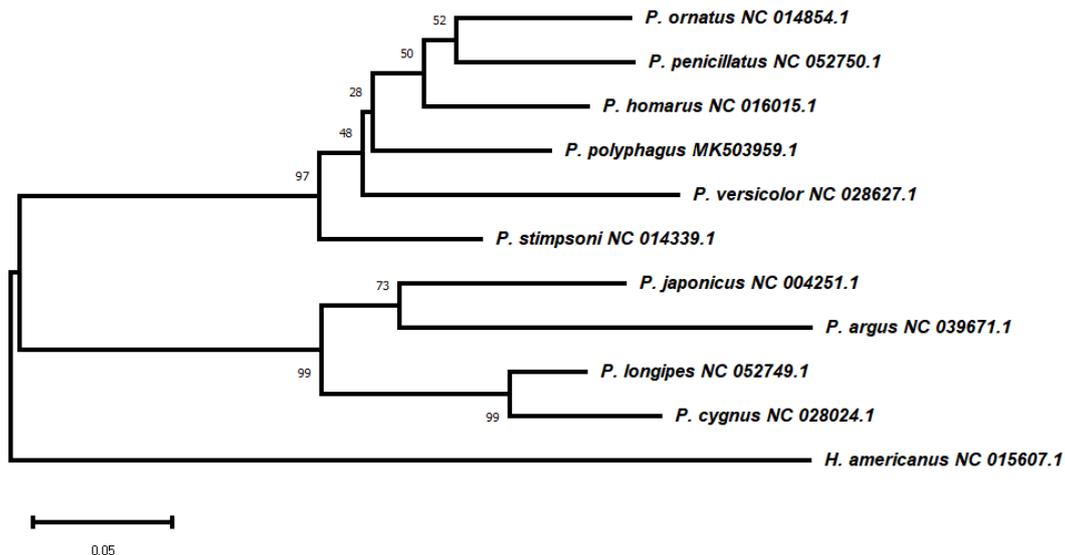
Fonte: Autor, 2021.

Figura 33 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXII para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



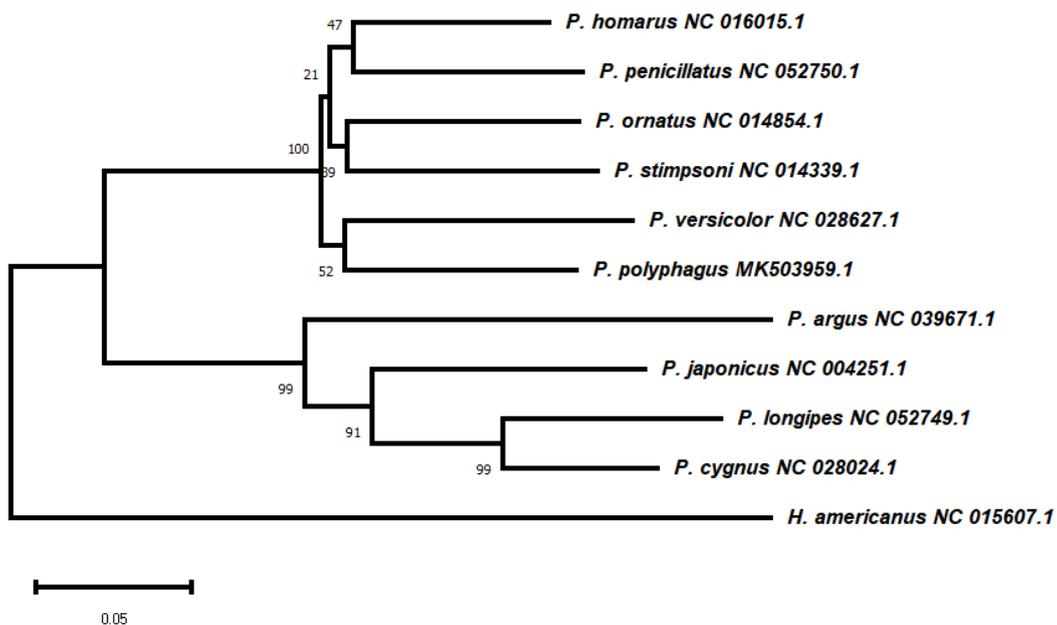
Fonte: Autor, 2021.

Figura 34 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial ATP 8 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



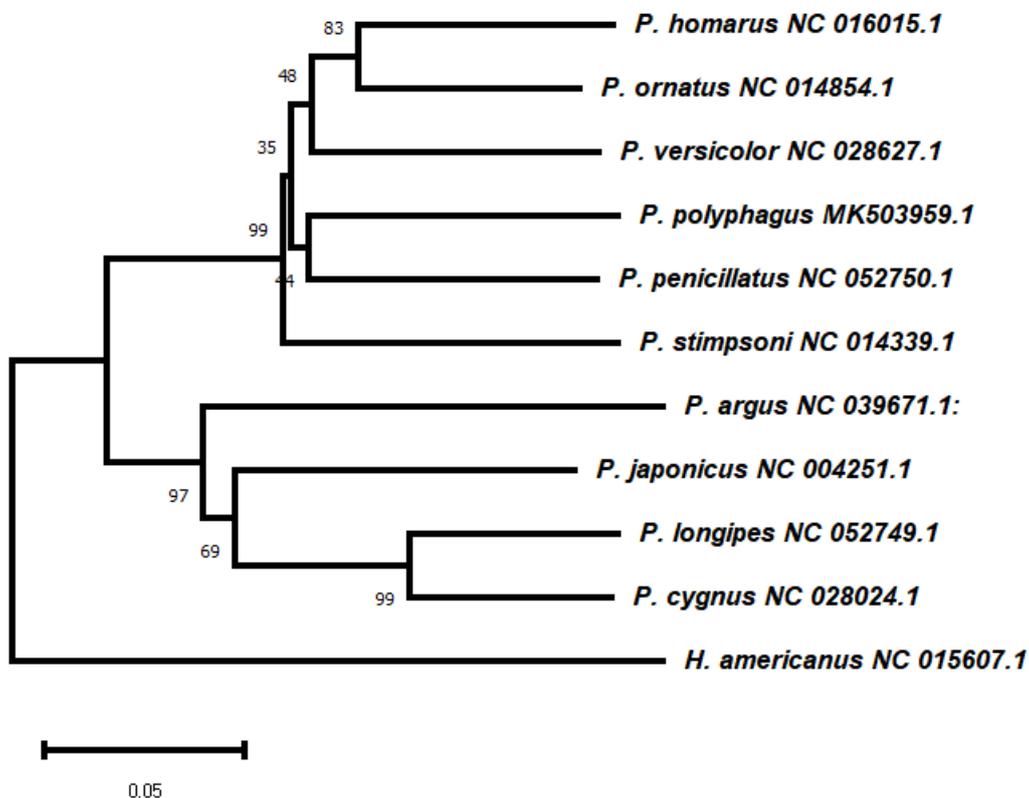
Fonte: Autor, 2021.

Figura 35 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial ATP 6 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



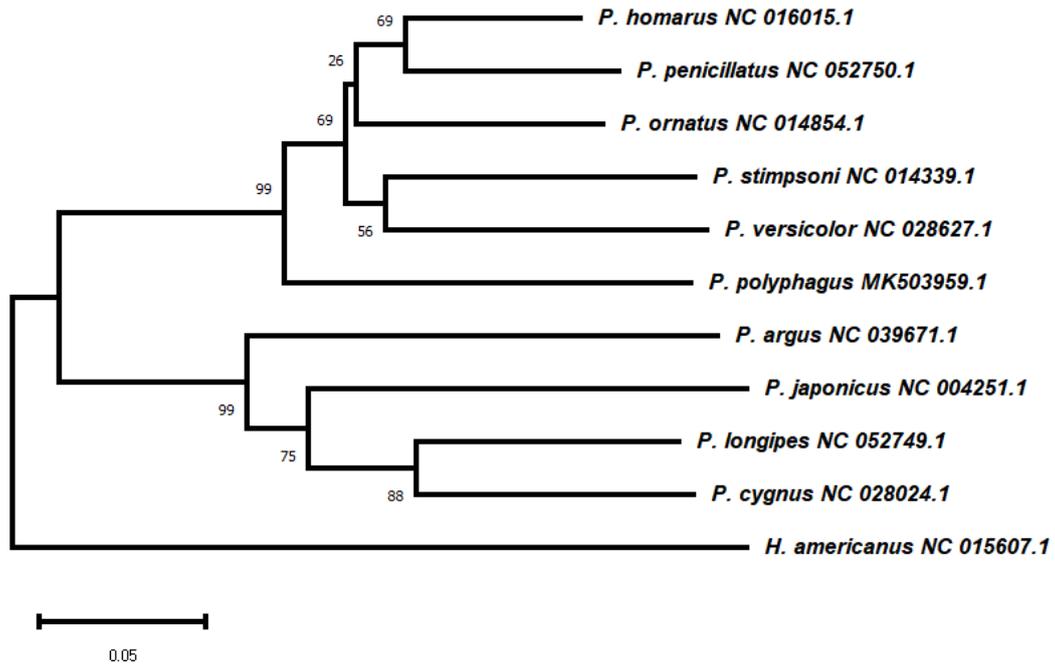
Fonte: Autor, 2021.

Figura 36 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial COXIII para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



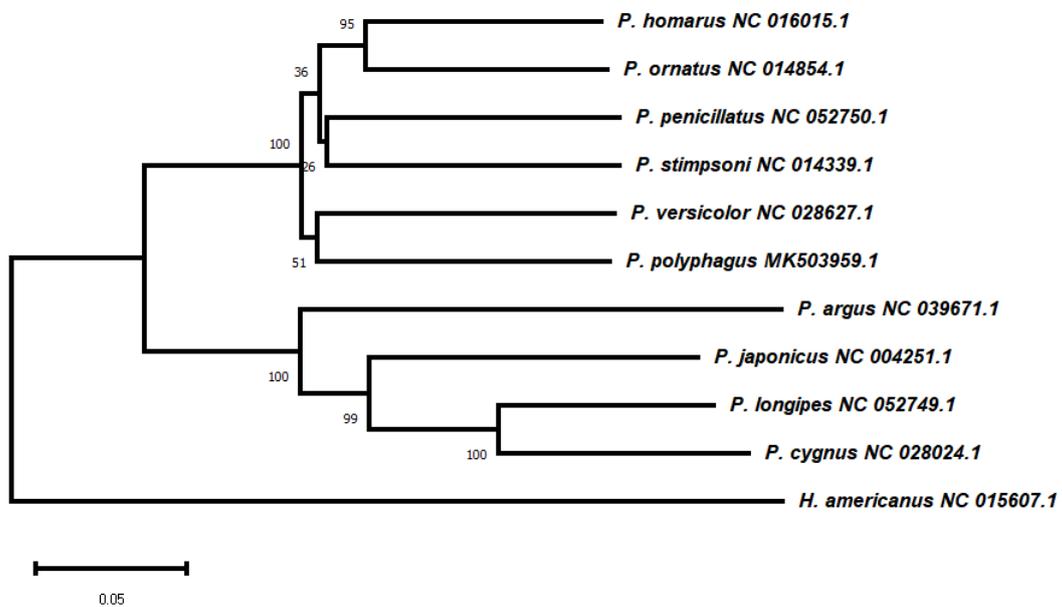
Fonte: Autor, 2021.

Figura 37 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 3 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore:



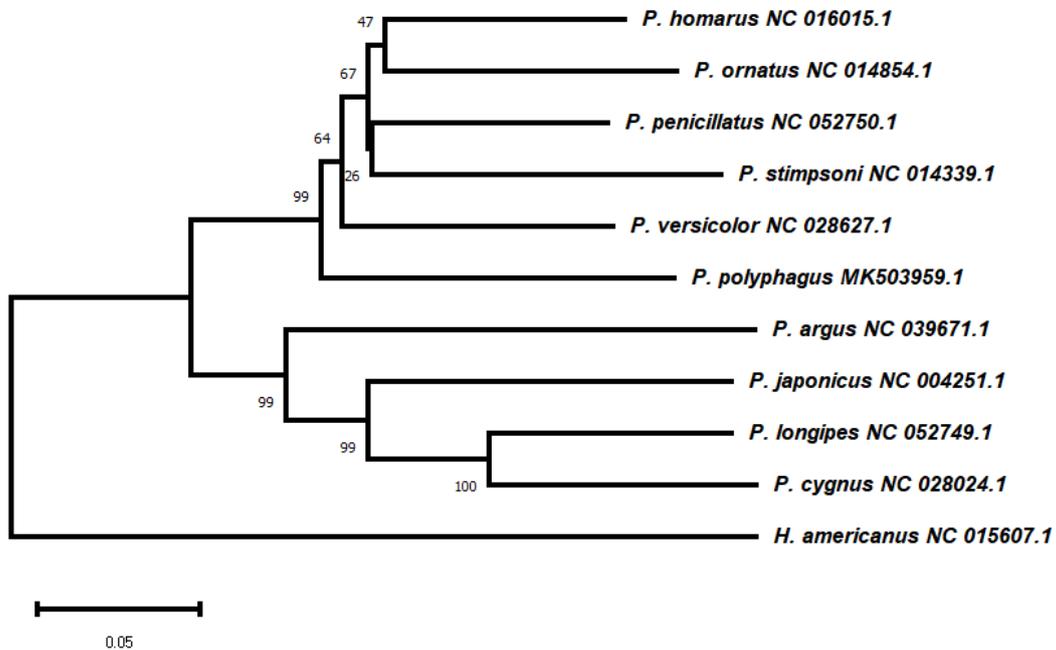
Fonte: Autor, 2021.

Figura 38 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 5 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



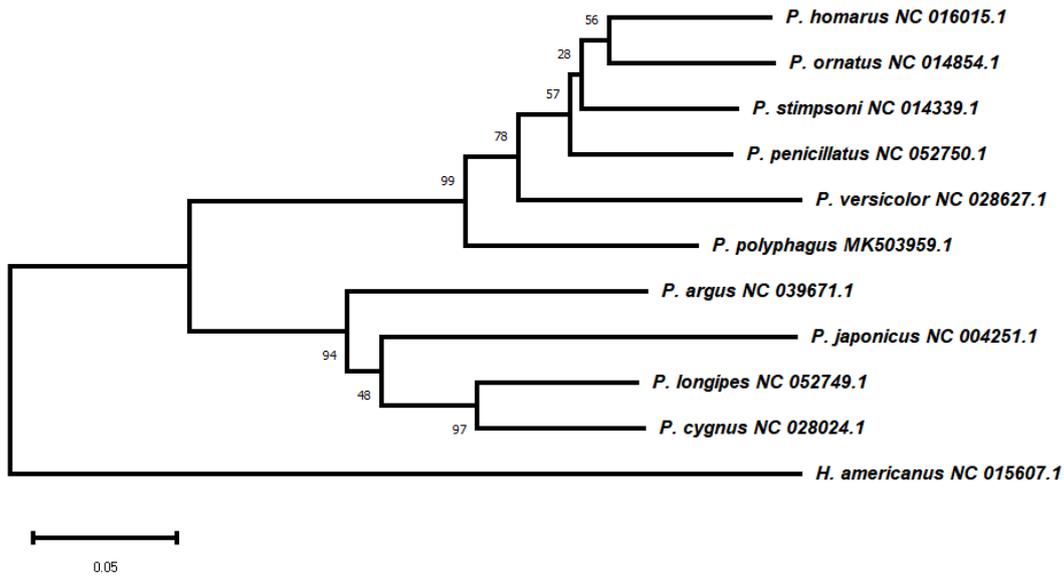
Fonte: Autor, 2021.

Figura 39 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 4 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



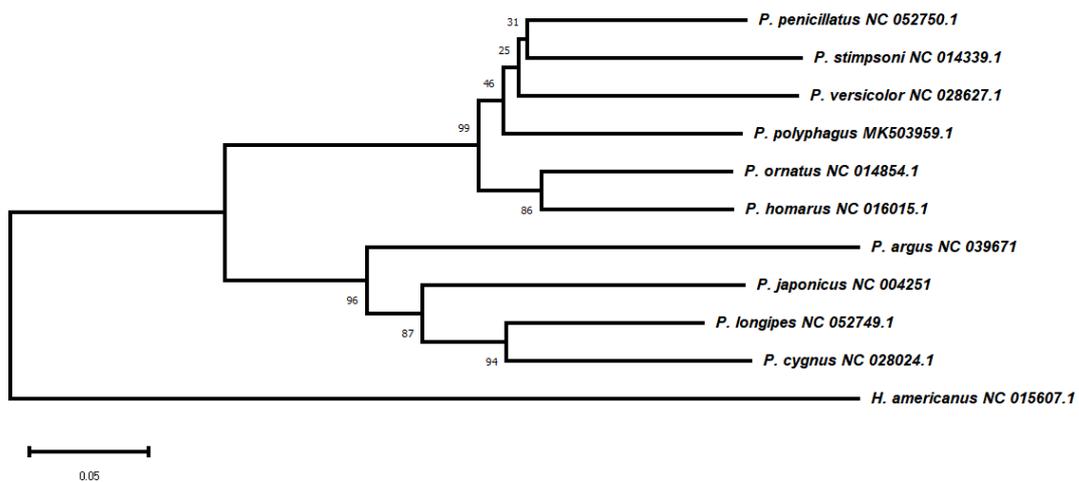
Fonte: Autor, 2021.

Figura 40 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 4L para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



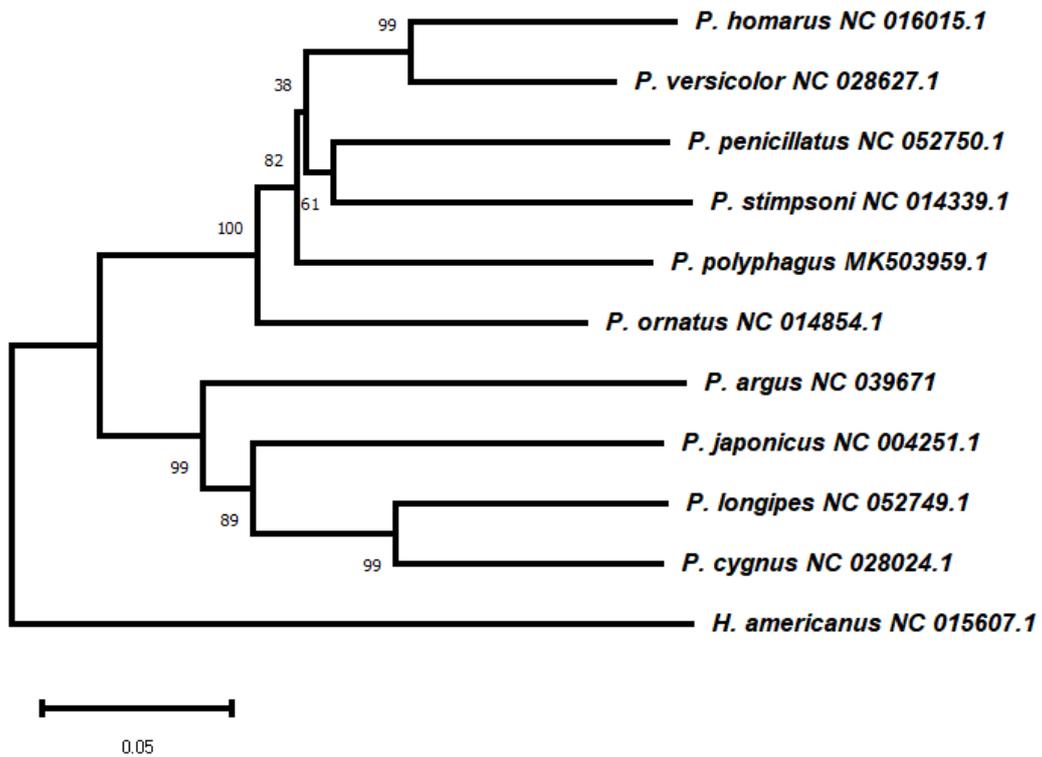
Fonte: Autor, 2021.

Figura 41 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 6 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



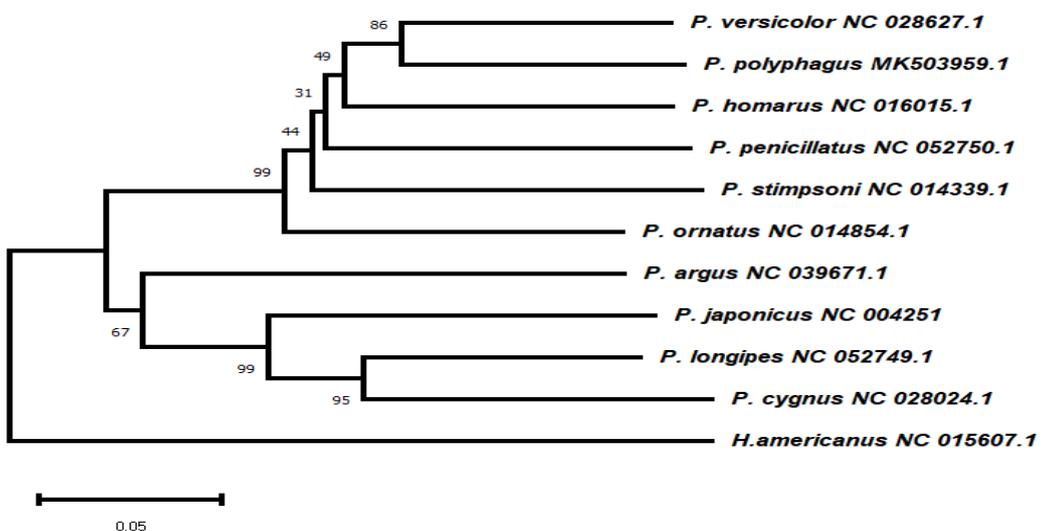
Fonte: Autor, 2021.

Figura 42 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial Citocromo b para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



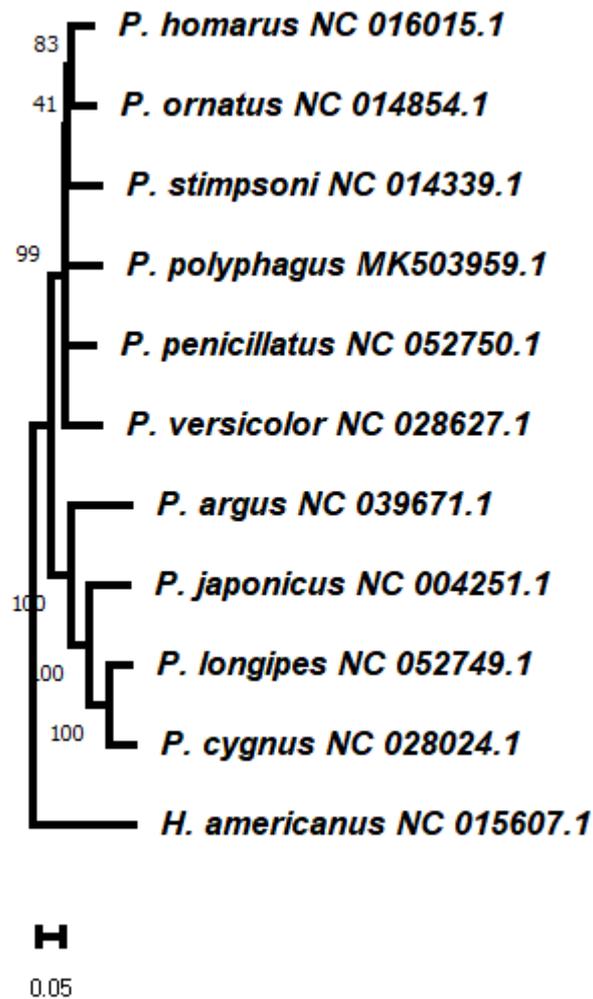
Fonte: Autor, 2021.

Figura 43 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 1 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



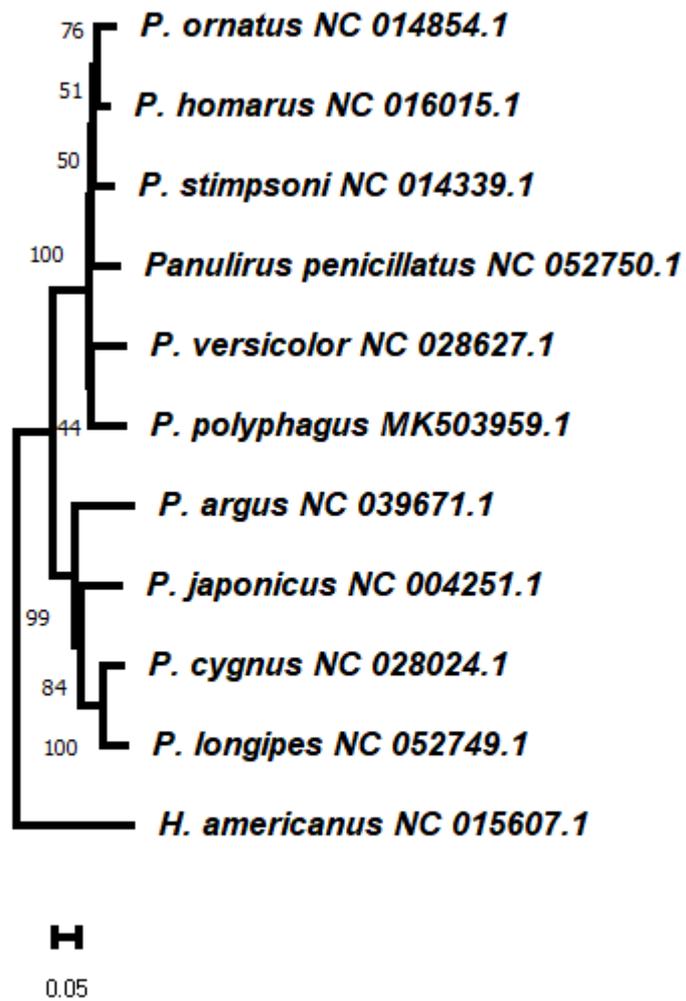
Fonte: Autor, 2021.

Figura 44 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 16S para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



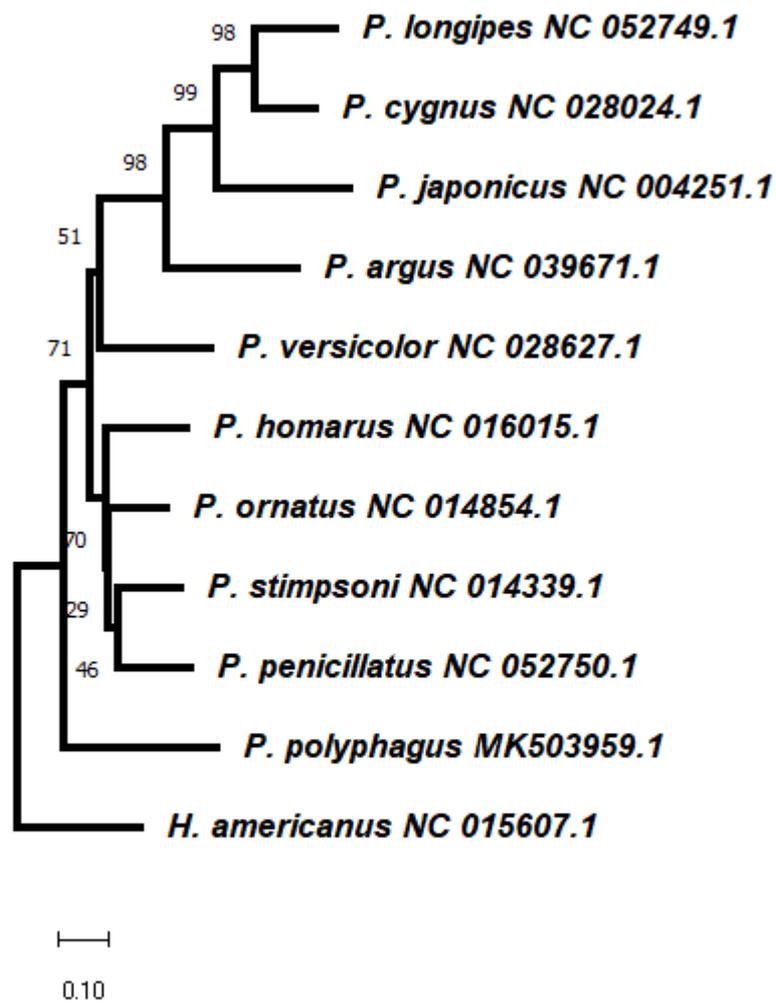
Fonte: Autor, 2021.

Figura 45 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 12S para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



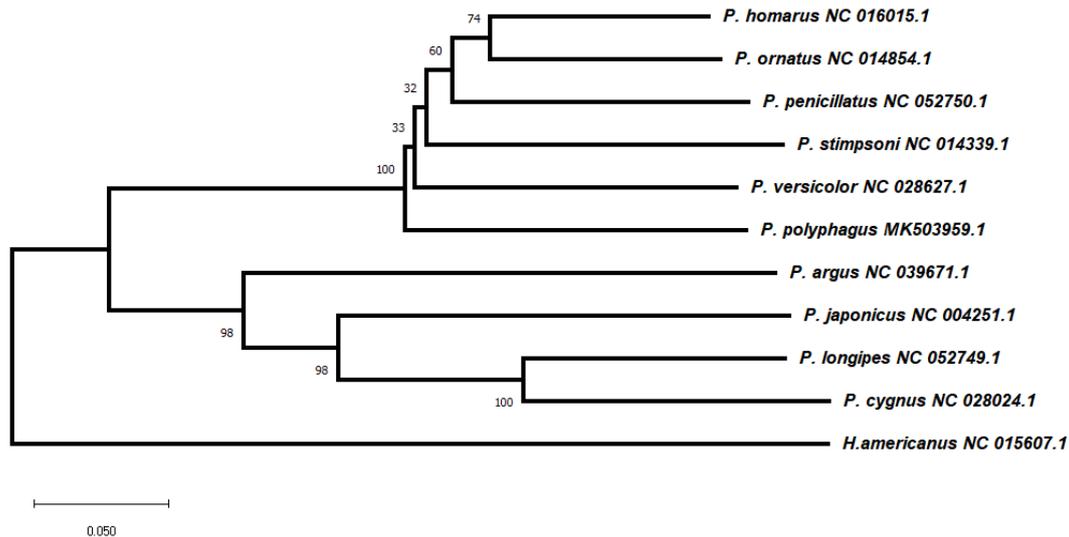
Fonte: Autor, 2021.

Figura 46 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial Região controle para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



Fonte: Autor, 2021.

Figura 47 - Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial NADH 2 para as sequências analisadas, o número ao lado do nome das espécies representa o código de identificação da sequência no GenBank. A barra abaixo marca a escala da árvore



Fonte: Autor, 2021.

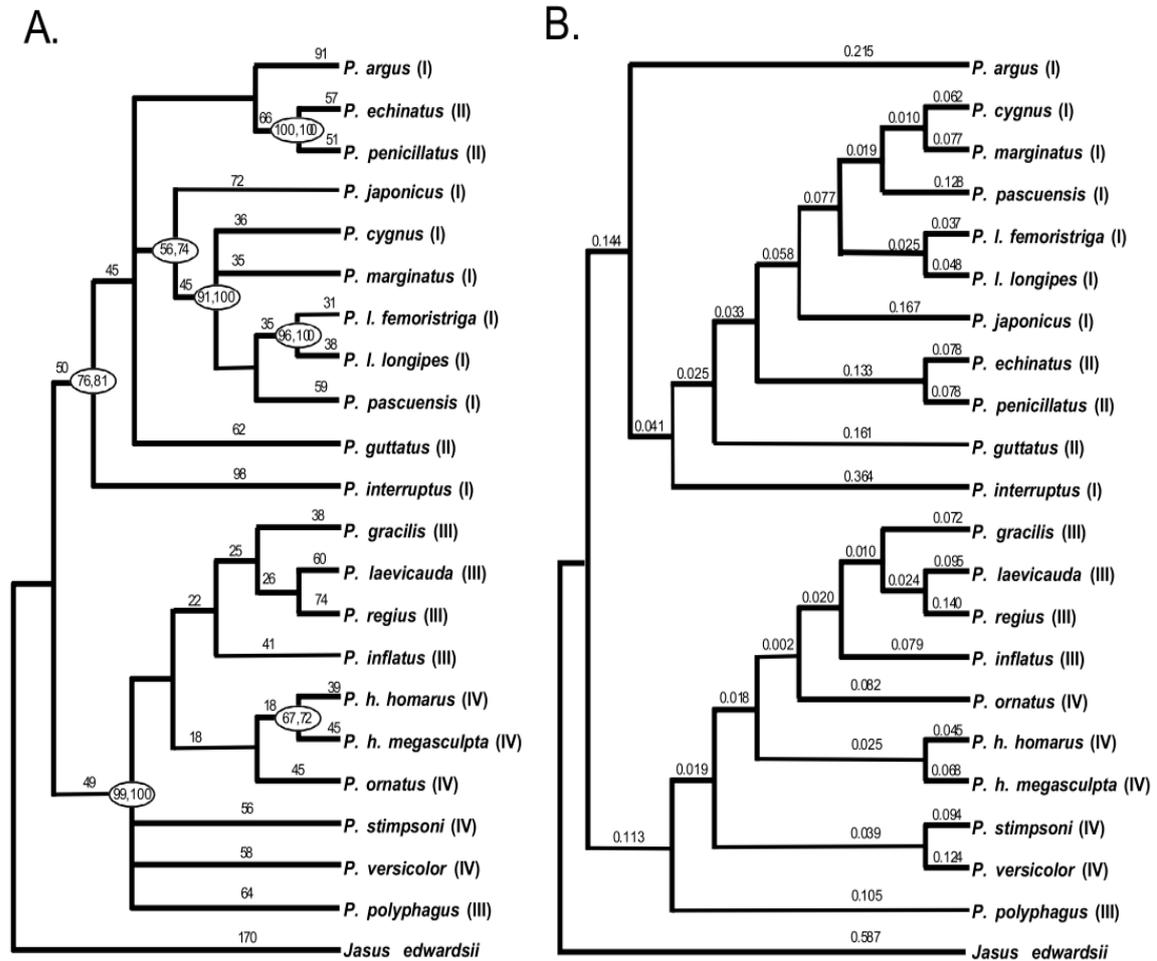
Observando os resultados obtidos com as tabelas, é perceptível que os genes NADH 1, 6 e 4L, e o ATP 8, foram os que apresentaram os ramos mais alongados entre os filogramas, indicando que esses teriam acumulado maiores diferenças genéticas a partir da evolução do último ancestral em comum das espécies analisadas.

Já as regiões não codificantes, como 12S, 16S e Região controle, apresentaram ramos bem curtos, indicando poucas alterações genéticas nesses genes, ao longo da evolução dos organismos. Porém, ainda é perceptível a formação de dois grupos monofiléticos, com exceção da região controle, como foi abordado anteriormente, mas a espécie *Panulirus longipes*, se manteve fora dos grupos, indicando um grau de evolução diferente das outras espécies, ou erros no processo de alinhamento das sequências.

Ptacek et al. (2001) traz dados muito interessantes com relação a todas as espécies do gênero *Panulirus*, realizando análises de variações nos genes 16S e COI, e montando uma árvore filogenética (Figura 48), abordando a análise de máxima parcimônia dos conjuntos de dados para 16S e COI combinados para o 22 táxons analisados no estudo, e também utilizando a análise de máxima verossimilhança para a montagem de outra árvore filogenética na mesma figura.

Figura 48 – Árvore filogenética dividida em duas análises: A - Consenso estrito de sete árvores de comprimento mínimo com base na análise de máxima parcimônia dos conjuntos de dados 16S e COI combinados para os 22 táxons examinados. B: Topologia de árvore ideal da análise de máxima verossimilhança com os comprimentos dos ramos

indicados. No estudo de Ptacek et al. (2001) a espécie *Jasus edwardsii* foi utilizada como grupo externo nas análises.

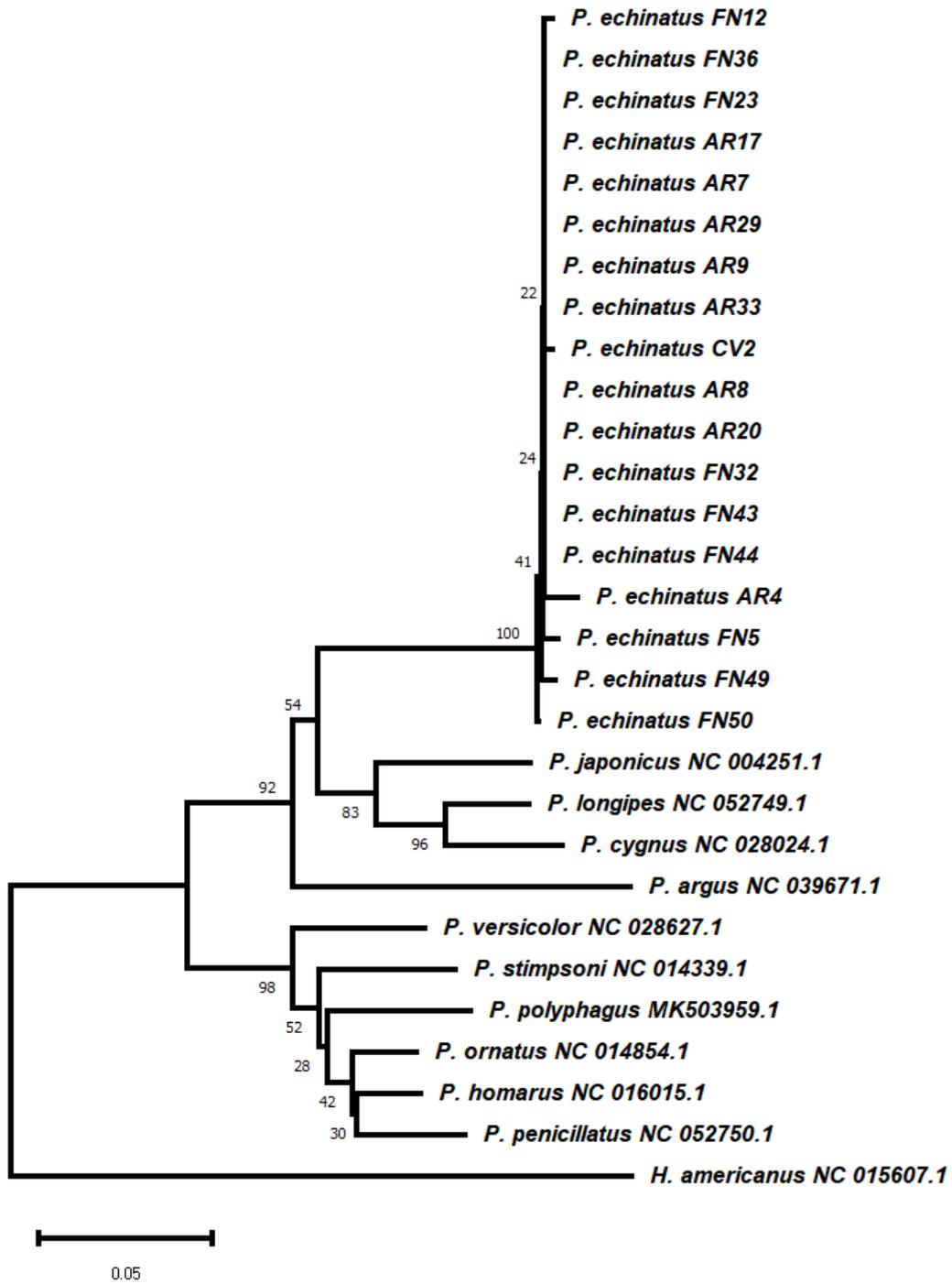


Fonte: Ptacek et al. (2001).

Em relação as árvores montadas no atual estudo, é possível observar uma grande semelhança das espécies analisadas separadas em dois maiores grupos como Ptacek et al. (2001) observou, na qual *P. argus*, *P. japonicus*, *P. cygnus* e *P. longipes* se mantém no grupo 1, uma radiação evolutiva mais antiga do gênero *Panulirus*, se comparada as espécies do grupo dois, que no atual estudo seriam *P. homarus*, *P. ornatus*, *P. stimpsoni*, *P. versicolor* e *P. polyphagus*, divergindo mais recentemente. *P. penicillatus* foi a que se diferenciou nesse estudo, se mantendo no grupo dois.

A árvore para o gene 16S incluindo as sequências de DNA inéditas (Figura 49), nos mostra uma divisão semelhante a observada nas outras árvores, sendo que com a adição de *P. echinatus* no grupo 1, mais próxima geneticamente de *P. argus*, *P. japonicus*, *P. cygnus* e *P. longipes*, sendo de acordo com Ptacek et al. (2001) considerada parte de uma divergência evolutiva mais antiga do gênero *Panulirus*, que engloba essas espécies.

Figura 49 – Árvore genética em filograma representando as relações de evolução entre o gene mitocondrial 16S para as sequências analisadas com sequências do banco de dados em que os números ao lado do nome das espécies representam o código de identificação da sequência no GenBank e com a adição das sequências inéditas com códigos em que as siglas utilizadas representam a localidade de coleta sendo AR (Atol das Rocas), FN (Fernando de Noronha) e CV (Cabo Verde) e os números indicam diferentes espécimes da espécie *P. echinatus*



Fonte: Autor, 2021.

## 6. CONCLUSÃO

A descrição morfológica foi realizada para as amostras de pueruli. Todas que estavam no mesmo nível de desenvolvimento apresentaram um padrão de estruturas e coloração semelhantes entre si, sendo todas pertencentes ao gênero *Panulirus*, devido a localização e presença de espinhos pelo corpo. Foi possível classificar três amostras mais avançadas no processo de desenvolvimento e calcificação, como pertencentes a espécie *P. argus*, devido a presença de ranhuras nos somitos abdominais, o que a difere das outras duas espécies que ocorrem na costa cearense, *P. echinatus* e *P. laevicauda*, que não apresentam essa característica.

Os genes mitocondriais apresentaram pouca variabilidade entre as análises realizadas para distancia percentual, k2p e nas árvores filogenéticas. A variabilidade se tornou mais acentuada nas tabelas quando foi incluído o grupo externo, *H. americanus* entre as espécies de *Panulirus*, por pertencer a outro gênero de lagostas. A região controle foi a que apresentou maiores níveis de divergência genética, se comparada as regiões codificantes e os genes 16S e 12S, já o gene COXI foi o mais conservado entre os genomas analisados. Nas árvores filogramas, as espécies se comportaram de maneira semelhante entre os diferentes genes, sendo os mesmos grupos de espécies observados.

A região do gene 16S analisado nas sequências inéditas que estavam disponíveis para *P. echinatus*, nos mostra que essa espécie está mais próxima geneticamente da lagosta *P. japonicus*, estando também no mesmo grupo evolutivo de *P. argus*, *P. cygnus* e *P. longipes*. Quase nenhuma variabilidade foi observada entre as sequências, sendo um gene mitocondrial eficaz para a identificação de espécies diferentes de puerulus que sejam encontrados coexistindo em uma localidade.

Uma pesquisa abordando tais questões tem grande importância, pois revisa dados acerca da genética desses organismos, que é pouco conhecida, assim como características morfológicas desta fase pós-larval. As informações novas trazidas pelo estudo podem ser utilizadas por trabalhos futuros, ou até mesmo para elaborar um melhor plano de manejo, baseado nas localidades de assentamento de *pueruli*, visando uma redução dos impactos nestas regiões a fim de preservá-las, para que esses organismos possam se reproduzir e dessa forma evitar que as atividades pesqueiras desenfreadas e as mudanças climáticas

(DINIZ, 2001; PUTTEN et al., 2016) causem impactos negativos nas populações de lagostas espinhosas do nosso litoral.

**REFERÊNCIAS**

- ANGER, K. (1989). Growth and exuvial loss during larval and early juvenile development of the hermit crab *Pagurus bernhardus* reared in the laboratory. **Marine Biology**, 103(4), 503–511. <https://doi.org/10.1007/BF00399582>
- ARAGÃO, J. A. N., & CINTRA, I. H. A. (2019). AVALIAÇÃO DO ESTOQUE DE LAGOSTA VERMELHA *Panulirus argus* NA COSTA BRASILEIRA. **Arquivos de Ciências Do Mar**, 51(2), 7. <https://doi.org/10.32360/acmar.v51i2.30919>
- AVISE, J. (1992). Molecular Population Structure and the Biogeographic History of a Regional Fauna: A Case History with Lessons for Conservation Biology. **Oikos**, 63(1), 62-76. doi:10.2307/3545516
- BAEZA, J. A. (2020). Yes, we can use it: a formal test on the accuracy of low-pass nanopore long-read sequencing for mitophylogenomics and barcoding research using the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. **BMC Genomics**, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07292-5>
- BOOTH, John D, & PHILLIPS, B. F. (1993). Early life history of spiny lobster. **Proceedings of the Fourth International Workshop on Lobster Biology and Management**, 1993
- BOOTH, J. D., BRADFORD, E., RENWICK, J. 2000. *Jasus edwardsii* puerulus settlement levels examined in relation to the ocean environment and to subsequent juvenile and recruitmen abundance.
- BUTLER, M J, & HERRNKIND, W. F. (2000). Chapter 15 Puerulus and Juvenile Ecology. *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, 276– 301.
- BUTLER, Mark J., & HERRNKIND, W. F. (1991). Effect of benthic microhabitat cues on the metamorphosis of pueruli of the spiny lobster *panulirus argus*. **Angewandte Chemie International Edition**, 6(11), 951–952., 1971.
- CAMPER JD, BARBER RC, RICHARDSON LR, GOLD JR (1993) Mitochondrial DNA variation among red snapper (*Lutjanus camperchanus*) from the Gulf of Mexico. **Molec mar Biol Biotechnol** 2:154-161 75

- C. A., & CARVALHO, M. (2005). Análise da distribuição de larvas de lagostas (CRUSTACEA: DECAPODA: PALINURIDAE) na costa do Nordeste do Brasil utilizando Sistema de Informações Geográficas. **Anais XII Simpósio de Sensoriamento Remoto**, May, 2195–2202.
- CHILDRESS, M.J. and W.F. HERRNKIND. 1997. Den sharing by juvenile Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*) in nursery habitat: cooperation or coincidence? **Marine and Freshwater Research** 48:751–758
- CRUZ, R., BORDA, C. A., SANTANA, J. V. M., BARRETO, C. G., PAIVA, B. P., GAETA, J. C., TORRES, M. T., DA SILVA, J. L. S., & CINTRA, I. H. A. (2021). Life cycle and connectivity of the spiny lobster, *Panulirus* spp.: case studies from Brazil and the Wider Caribbean (Decapoda, Achelata), **Crustaceana**, 94(5), 603-645. doi: <https://doi.org/10.1163/15685403-bja10116>
- CRUZ, Raul, & BERTELSEN, R. D. (2008). The Spiny Lobster ( *Panulirus argus* ) in the Wider Caribbean : A Review of Life Cycle Dynamics and Implications for Responsible Fisheries. **Proceedings of the 61st Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 433–446.
- CRUZ, Raúl, Teixeira, C. E. P., MENEZES, M. O. B., SANTANA, J. V. M., NETO, T. M., GAETA, J. C., DE FREITAS, P. P., SILVA, K. C. A., & CINTRA, I. H. A. (2015). Large-scale oceanic circulation and larval recruitment of the spiny lobster *panulirus Argus* (Latreille, 1804). **Crustaceana**, 88(3), 298–323. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003411>
- CRUZ., R. 1980. Fecundidad y madurez sexual en la langosta comercial *Panulirus argus* (Latreille, 1804) Crustácea: Palinuridae en Cuba. **Revista Cuba Investigaciones Pesqueras** 5(1):27 pp.
- CRUZ, R. Manuel de métodos de muestreo para la evaluación de poblaciones de langosta espinosa. **FAO Fisheries Technical Paper**, 43 p. 2002
- CRUZ,R., R. N. L. CONCEIÇÃO, R. A. MARINHO,J. C. BARROSO,J.S.HOLANDA, C.S.FÉLIX, M. E. O. MARTINS, F.S.SANTOS, K.C.A.SILVA & M.A.A.FURTADO-NETO, 2011. Metodologias de amostragem para avaliação das populações de lagosta: Plataforma Continental do Brasil. Edição bilíngüe português/espanhol. Fortaleza: UFC/labomar/nave; uh/cim, **Coleção Habitat**

- CRUZ, R., E. DÍAZ, M. BÁEZ, and R. ADRIANO. 2001a. Variability in recruitment of multiple life stages of the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, in the Gulf of Batabanó, Cuba. **Marine and Freshwater Research** 52:1263 –1270
- DINIZ, F. M., MACLEAN, N., OGAWA, M., CINTRA, I. H. A., & BENTZEN, P. (2005). The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. **Marine biotechnology**, 7(5), 462–473. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-4062-5>
- DINIZ, Marcelo Bentes e ARRAES, Ronaldo de Albuquerque (2001). “Tragédia dos Comuns e o Exemplo da Pesca da Lagosta: Abordagens Teóricas”, 8 páginas, Mimeo ,**Universidade Federal do Ceará**
- DOS SANTOS, M. F. (2016). **Sequenciamento do dna, desenvolvimento de marcadores moleculares e montagem do genoma mitocondrial da lagosta *Panulirus echinatus* (Smith, 1869). Tese (Doutorado em biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016**
- FAUSTO-FILHO, J. & A. F. COSTA, (1969). Notas sobre a família Palinuridae no Nordeste Brasileiro (Crustacea, Decapoda, Macrura). **Arq. Ciên. Mar.** Fortaleza, 9(2): 103-110.
- FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791.
- GAETA, J., ACEVEDO, I., LÓPEZ-MÁRQUEZ, V., FREITAS, R., CRUZ, R., MAGGIONI, R., HERRERA, R., & MACHORDOM, A. (2020). Genetic differentiation among Atlantic island populations of the brown spiny lobster *Panulirus echinatus* (Decapoda: Palinuridae). **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, 30(5), 868–881. <https://doi.org/10.1002/aqc.3297>
- GARESSE, R. (1988). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: Gene organization and evolutionary considerations. **Genetics**, 118(4), 649–663. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.649>

- GEORGE, R. W., and MAIN, A. R. (1967). The evolution of spiny lobsters (Palinuridae): a study of evolution in the marine environment. *Evolution* 21, 803–20.
- GEORGE, R. W. (1997). Tectonic plate movements and the evolution of *Jasus* and *Panulirus* spiny lobsters (Palinuridae). **Marine and Freshwater Research** 48, 1121–30
- GIRALDES, B. W., & SMYTH, D. M. (2016). Recognizing Brazil-Systematic, Recognizing *Panulirus meripurpuratus* sp. npv. (Decapoda: Palinuridae) in the Atlantic Ocean. **Zootaxa**, 4107(3), 353–366.  
<https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/viewFile/zootaxa.4107.3.4/20335> GÓES,
- GOLDSTEIN, J. S., MATSUDA, H., TAKENOUCI, T., IV, M. J. B., & WILLIAMS, B. (2008). The complete development of larval caribbean spiny lobster *panulirus argus* ( Latreille , 1804 ) in culture. **Journal of crustacean biology**, 28(02): 306–327
- GOPAL K, TOLLEY KA, GROENEVELD JC, MATTHEE CA (2006) Mitochondrial 77 DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the south-western Indian Ocean. **Mar Ecol Prog Ser** 319:191– 198p
- GUERAO, G., DÍAZ, D., & ABELLÓ, P. (2006). Morphology of puerulus and early juvenile stages of the spiny lobster *Palinurus mauritanicus* (Decapoda: Palinuridae). **Journal of Crustacean Biology**, 26(4), 480–484.  
<https://doi.org/10.1651/C-2615.1>
- HERRNKIND, W.F. & BUTLER, M.J. IV (1986) Factors regulating postlarval settlement and juvenile microhabitat use by spiny lobsters, *Panulirus argus*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 34, 23-30
- 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**. No. 125, Vol. 13. Rome, FAO. 1991. 292 p.
- IGARASHI, M. A. (2010). Note on photographic register and preliminary observations from puerulus to juvenile of *Panulirus argus* after settlement in *Amansia* sp. macroalgae in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, 31(3), 767–772.  
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p767>

- IVO, C. T. C., & PEREIRA, J. A. (1996). Sinopse das principais observações sobre as lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laevicauda* (Latreille), capturadas em águas costeiras do Brasil, entre os estados do Amapá e do Espírito Santo. **Boletim Técnico Científico Do CEPENE**, 1–96p.
- JOHN B. LEWIS, MOORE, H. B., & BABIS, W. (1951). The Post-Larval Stages of the Spiny Lobster *P. Argus*. The Marine Laboratory, University of Miami
- KENNINGTON, W. J., MELVILLE-SMITH, R., & BERRY, O. (2013). Genetics of wild and captive lobster populations. *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture & Fisheries: Second Edition*, July 2013, 36–63p.  
<https://doi.org/10.1002/9781118517444.ch2>
- KIMURA M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16:111-120. 78
- KUMAR S., STECHER G., Li M., KNYAZ C., and TAMURA K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549p
- MATZEN DA SILVA J, CREER S, DOS SANTOS A, COSTA AC, CUNHA MR, COSTA FO, CARVALHO GR (2011) Systematic and evolutionary insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). **PLoS ONE** 6(5): e19449.
- MCWILLIAM, P. S. (1995). Evolution in the phyllosoma and puerulus phases of the spiny lobster genus *Panulirus* White. **Journal of Crustacean Biology** 15, 542–57
- MELO, A. S. S. D. E. A., & BARROS, A. D. D. E. (2006). Pesca predatória da lagosta no Brasil : Um modelo insustentável Ufpe Recife - pe - Brasil. **Apresentação com presença de debatedor agricultura , meio ambiente e desenvolvimento sustentável**
- NARO-MACIEL, E., REID, B., HOLMES, K. E., BRUMBAUGH, D. R., MARTIN, M., & DESALLE, R. (2011). Mitochondrial DNA sequence variation in spiny lobsters: Population expansion, panmixia, and divergence. **Marine Biology**, 158(9), 2027–2041p. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1710-y>

- OGAWA M, OLIVEIRA GM, SEZAKI K, WATABE S, HASHIMOTO K (1991)  
Genetic variations in three species of spiny lobsters, *Panulirus argus*, *Panulirus laeviscauda* and *Panulirus japonicus*. **Revta Investnes Mar**, Habana 12:39–44p
- O’RORKE, R., LAVERY, S., CHOW, S., TAKEYAMA, H., TSAI, P., BECKLEY, L. E., THOMPSON, P. A., WAITE, A. M., & JEFFS, A. G. (2012). Determining the diet of larvae of western Rock Lobster (*Panulirus cygnus*) using high-throughput DNA sequencing techniques. **PLoS ONE**, 7(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042757> 79
- OVENDEN , J.R. , BRASHER , D.J. & WHITE , R.W.G. ( 1992 ) Mitochondrial DNA analyses of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivision throughout Australasia . **Marine Biology** , 112 , 319 – 326p
- PALERO, F., CRANDALL, K. A., ABELLÓ, P., MACPHERSON, E., & PASCUAL, M. (2009). Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 50(1), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.003>
- PALERO, F., LOPES, J., ABELLAÓ, P., MACPHERSON, E., PASCUAL, M., & BEAUMONT, M. A. (2009). Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus* spp) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data. **BMC Evolutionary Biology**, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-263>
- PAULETTE S. McWilliamA and Bruce F. PHILLIPS. (1998). Metamorphosis of the final phyllosoma and secondary lecithotrophy in the puerulus of *Panulirus cygnus* George: a review **Marine Freshwater Research**. 48, 783 - 789p
- PEDRAZA-LARA C, DOADRIO I, BREINHOLT JW, CRANDALL KA (2012)  
Phylogeny and Evolutionary Patterns in the Dwarf Crayfish Subfamily (Decapoda: Cambarellinae). **Crustaceana J** (Ed.) PLoS ONE 7: e48233.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048233>
- PEIXOTO, U. I., MESQUITA, E. M. C., CINTRA, I. A. I., KLAUTAU, A. G. M., GOUVEIA, N. A., PAES, E. T., & ISAAC, V. J. (2020). Population dynamics and sustainability of the spiny lobster (*Panulirus meripurpuratus* Giraldes & Smyth, 2016) fishery on the Amazon continental shelf. **Marine and Freshwater Research**, 72(1), 99–109p. <https://doi.org/10.1071/MF19333>

- PEREIRA L, F. P., & TURRA, A. (2003). Temporal variation in Sargassum biomass, Hypnea epiphytism and associated fauna. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46(4), 665–671p. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132003000400021>
- PHILLIPS, B. F., & OLSEN, L. (1975). Swimming Behaviour of the Puerulus Larvae of the Western Rock Lobster. **Marine and Freshwater Research**, 26(3), 415–417p. <https://doi.org/10.1071/MF9750415>
- PHILLIPS, B. F., and P. S. MCWILLIAM. 1986. The pelagic phase of spiny lobster development. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 43: 2153-2463p. 80
- PHILLIPS, Bruce F., BOOTH, J. D., COBB, J. S., JEFFS, A. G., & MCWILLIAM, P. (2006). Larval and Postlarval Ecology. Lobsters: Biology, Management, **Aquaculture and Fisheries**, 231–262. <https://doi.org/10.1002/9780470995969.ch7>
- POLLOCK, David., 1990. Palaeoceanography and speciation in the spiny lobster genus Jasus. **Bull. mar. Sci.**, 46(2):387-405.
- POLLOCK, David., 1992. Palaeoceanography and speciation in the spiny lobster genus Panulirus in the Indo- Pacific. **Bull. mar. Sci.** Univ. Miami, 51: 135-146.
- PTACEK, M. B., SARVER, S. K., CHILDRESS, M. J., & HERRNKIND, W. F. (2001). Molecular phylogeny of the spiny lobster genus panulirus (Decapoda: Palinuridae). **Marine and Freshwater Research**, 52(8), 1037–1047. <https://doi.org/10.1071/MF01070>
- SAITOU N. and NEI M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.
- SARVER, S. K., SILBERMAN, J. D., & WALSH, P. J. (1998). Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster Panulirus argus. **Journal of Crustacean Biology**, 18(1), 177–186. <https://doi.org/10.2307/1549532>
- SILBERMAN, J. ., SARVER, S. K., & WALSH, P. J. (1994). Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster Panulirus argus. **Atlantic**, 601–608p.

- SMITH, K. N., & HERRKIND, W. F. (1992). Predation on early juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille): influence of size and shelter. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 157(1), 3–18. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90070-Q](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90070-Q)
- SUZUKI, N., MURAKAMI, K., TAKEYAMA, H., & CHOW, S. (2006). Molecular attempt to identify prey organisms of lobster phyllosoma larvae. **Fisheries science**, 72(2), 342–349. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01155.x>
- THOMPSON, A.P., HANLEY, J.R. & JOHNSON, M.S. (1996) Genetic structure of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*, with the benefit of hindsight. **Marine and Freshwater Research**, 889 – 896p 81
- TOLLEY, K.A., GROENEVELD, J.C., GOPAL, K. & MATTHEE, C.A. (2005) Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. **Marine Ecology Progress Series**, 297, 225 – 231p
- TOON, A., FINLEY, M., STAPLES, J., & CRANDALL, K. (2009). Decapod Phylogenetics and Molecular Evolution. **Crustacean Issues**, 15- 29p. doi:10.1201/9781420092592-c2
- TUBINO, R. de A., MONTEIRO-NETO, C., MORAES, L. E. de S., & PAES, E. T. (2007). Artisanal fisheries production in the coastal zone of Itaipu, Niterói, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55(3), 187–197p. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592007000300003>
- VAN PUTTEN, I. E., FARMERY, A. K., GREEN, B. S., HOBDAV, A. J., LIMCAMACHO, L., NORMAN-LÓPEZ, A., & PARKER, R. W. (2016). The Environmental Impact of Two Australian Rock Lobster Fishery Supply Chains under a Changing Climate. **Journal of Industrial Ecology**, 20(6), 1384–1398p. <https://doi.org/10.1111/jiec.12382>
- WILKIN, J. L., & JEFFS, A. G. (2011). Energetics of swimming to shore in the puerulus stage of a spiny lobster: Can a postlarval lobster afford the cost of crossing the continental shelf? **Limnology and Oceanography: Fluids and Environments**, 1(1), 163–175p. <https://doi.org/10.1215/21573698-1504363>
- WILLIAMS, A. B. (1986). Lobsters-Identification, World Distribution, and U.S. Trade. **Marine Fisheries Review**, 48(2), 1–36p.

WOLSTENHOLME, David R; CLARY, D. O. (1985). Sequence Evolution of  
Drosophila Mitochondrial DNA. **Genetics Society of America** , 725–744p.