

*Genètica evolutiva en
llagostes de
l'infraordre Achelata*

*Evolutionary
genetics of Achelata
lobsters*

**TESIS DOCTORAL
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA
PROGRAMA DOCTORAT: BIENNI 2004-2006**

Genètica evolutiva en llagostes de l'infraordre Achelata

Memòria presentada per Ferran Palero Pastor, realitzada en el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona (UB), per accedir al Grau de Doctor en el Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, sota la direcció dels doctors Marta Pascual Berniola, Pere Abelló Sala i Enrique Macpherson Mayol.

Ferran Palero Pastor
Barcelona, Agost 2008

VIST-I-PLAU
LA DIRECTORA DE TESI
Dra. Marta Pascual Berniola
Prof. Universitat de Barcelona



VIST-I-PLAU
EL DIRECTOR DE TESI
Dr. Pere Abelló Sala
Prof. ICM-CMIMA (CSIC)



VIST-I-PLAU
EL DIRECTOR DE TESI
Dr. Enrique Macpherson Mayol
Prof. CEAB (CSIC)



AGRAÏMENTS

Una llista de gent a qui agrair l'ajuda prestada? Però, per qui començar? Hi ha tanta i tanta gent que ha fet possible el meu treball que dubte si hi ha algú que poguera considerar-se prescindible en aquesta llista infinita. Tothom ha tingut un paper fonamental, però si haig de començar per algú, ho faré seguint la “història evolutiva” de la tesi. Així, els primers a aparèixer als agraïments han de ser els meus pares, Eustaquio Palero i Amparo Pastor, que van donar sempre els millors consells als seus fills i em van permetre fer la carrera de Biologia a la Universitat de València. D'aquella Universitat haig d'agrair especialment l'ajuda del Dr. Jesús Selfa, que em va “convèncer” per anar a fer una estada a Swansea com a ERASMUS. El temps lliure que em deixava el sistema educatiu anglès em va dur a trobar “on the web” un especialista en crustacis que estudiava el reclutament de la llagosta: Dr. Pere Abelló.

Un parell d'e-mails, moltes hores de treball i les beques del CSIC em van servir per a posar-me de cap en el món bibliogràfic de les llagostes i començar a copsar la gran diversitat de larves filosoma. Per cert, també em van servir per a conèixer en David Díaz, Jacopo Aguzzi, Joan Baptista Company, Toni Lombarte, Pilar Olivar, Francesc Pagés, Francesc Maynou, tot gent amb una gran vitalitat i sempre molt propera. La llibertat de treball que em va proporcionar en Pere va ser clarament el principal desencadenant d'aquesta tesi. Havia de fer la tesi amb ell! I vindre a treballar amb ell suposava fer la tesi amb un tutor de la Universitat de Barcelona.

Això em va dur a conèixer la Dra. Marta Pascual, una reconeguda especialista en genètica de poblacions i una grandíssima persona. He tingut molta sort de comptar amb la seua energia i consell en tot moment, i especialment als moments més crítics...com la discussió de les publicacions científiques. Al Departament de Genètica vaig trobar molt més que una directora de tesi i mare adoptiva, també vaig trobar el meu “guia espiritual”, el professor Lluís Serra, qui em va iniciar al món de la “matemàtica parda”, per on espere poder seguir viatjant en un futur no gaire llunyà. A ell li estic especialment agraït per la seua confiança en les noves generacions d'investigadors i pel seu exemple de constància

en el treball. No puc oblidar tampoc tota la resta del grup: Francesc, Joan, Louise, Josiane, Carles, Pep, Hèctor, Pedro “el panameño”, Pedro “el portugués” o Pedro “el argentino”. Per a Cinta, que ha sigut com una germana (i a vegades també com una mare!), no tinc paraules d’agraïment per tants viatges en cotxe, nits d’okupació indeguda, etc...Tot això no es paga amb tots els marmitakos del món. Ah! Me n’oblidava! Gràcies a Kay, Michael i companyia, ells també han fet que l’estada al Departament fóra més agradable (o seria la cervesa?). I els companys de Biologia Animal: Marc, Gemma, Isabel...molta gent que li dona sentit al que fem!

I realment calien tres directors de tesi? Doncs sí! El Dr. Enrique Macpherson ha suposat un estímul constant per a seguir el treball de recerca dins i fora de la tesi doctoral. Gràcies a Macpherson vaig poder contactar amb un altre gran especialista en crustacis i un genial investigador: Dr. Paul Clark. Tots dos, junt a Pere Abelló i Guillem Guerao, són responsables d’un seguit de publicacions sobre la taxonomia i identificació de diferents estadis larvals en espècies de llagosta Achelata. Els darrers estadis filosoma i els nistos dels *Scyllarus* de la Mediterrània, les filosoma i el puerulus de *Palinustus* capturats a Somàlia...i tants altres treballs que ens esperen. Gràcies a tots ells per potenciar la passió per la taxonomia i l’art de la descripció en el seu quefer diari. Ells fan que la flama de la història natural, que es troba a la base de tota ciència biològica, seguisca tan viva com mai.

Gràcies a tots.

“All this diversity is at first sight staggering and bewildering. The greatest achievement of biological science to date is the demonstration that the diversity is not fortuitous. It has not arisen from a whim or caprice of some deity. It is a product of evolution, an outcome of a long historical process of development...Biology can not fathom whether life may be a part of some Cosmic Design. But biology does show that the evolution of life on earth is governed by causes that can be understood by human reason.”

Theodosius Dobzhansky
Genetics and the Origin of Species

Per a Núria.

CONTINGUT

1.- INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1.- Divergències antigues: “viatge al passat llunyà”	
1.1.1.- Inferència filogenètica i seqüències d’ADN: La revolució bayesiana	4
1.1.2.- Sistemàtica dels Achelata	5
1.2.- Divergències recents: “viatge al passat no tant llunyà”	
1.2.1.- ADN mitocondrial (mtDNA) i microsatèl.lits (VNTRs)	8
1.2.2.- Processos d’especiació al medi marí i el gènere <i>Palinurus</i>	11
1.3.- Genètica de poblacions en organismes marins: “poner puertas al mar”	
1.3.1.- Marc conceptual: Filogeografia i Teoria de la coalescència	13
1.3.2.- Dispersió larval i connectivitat: Barreres actuals	16
1.3.3.- Biologia i explotació pesquera de <i>Palinurus elephas</i>	17
2.- OBJECTIUS	20
3.- PUBLICACIONS	24
3.1. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències antigues als Achelata.	
Publicació 1 Phylogenetic Inference Using Molecular Data	26
Publicació 2 Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata)	50

3.2. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències recents a *Palinurus*.

Publicació 3	Isolation and characterization of microsatellite loci in <i>Palinurus elephas</i>	63
Publicació 4	Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus <i>Palinurus</i> Weber, 1795	67
Publicació 5	Rapid radiation in spiny lobsters (<i>Palinurus spp</i>) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data	100

3.3. Diversitat genètica i diferenciació en poblacions de llagosta vermella (*Palinurus elephas*) de l'Atlàntic i la Mediterrània.

Publicació 6	Phylogeography of the European spiny lobster (<i>Palinurus elephas</i>): Influence of current oceanographical features and historical processes	131
Publicació 7	Effects of long distance larval dispersal and enhanced connectivity on the population genetics of marine organisms	142

4.- RESUM GLOBAL

4.1. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències antigues i Sistemàtica de les llagostes de l'infraordre Achelata (Scholtz and Richter, 1995).	175
--	-----

4.2. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de la variabilitat genètica i les divergències recents en espècies del gènere *Palinurus*.

4.2.1 Variabilitat genètica en espècies del gènere <i>Palinurus</i> .	183
---	-----

4.2.2 Filogènia i especiació en el gènere <i>Palinurus</i> Weber, 1795.	187
4.3. Diversitat genètica i diferenciació en poblacions de llagosta vermella (<i>Palinurus elephas</i>) de l'Atlàntic i la Mediterrània.	
4.3.1 Filogeografia en <i>Palinurus elephas</i> .	192
4.3.2 Estructuració genètica en <i>P. elephas</i> inferida amb marcadors microsatèl.lit.	197
5.- CONCLUSIONS	203
6.- BIBLIOGRAFIA	207
7.- INFORME: FACTOR D'IMPACTE DE LES PUBLICACIONS	222

1.- INTRODUCCIÓ GENERAL

Quan estudiem amb detall qualsevol grup taxonòmic, ens hi trobem molts tipus de diversitat: diversitat morfològica, ecològica, comportamental, etc. Ara sabem, gràcies al treball de síntesi d'en Charles Darwin, que tota aquesta diversitat no és deguda a l'atzar, sinó que és principalment el resultat d'un procés d'adaptació dels éssers vius a la diversitat de medis que es troben a la natura (Darwin, 1859). Si partim del fet que les característiques d'un individu tendeixen a passar als seus descendents de forma més o menys constant i que alguns individus aporten més descendents que altres a la següent generació, les característiques genètiques d'aquests individus seran més freqüents dins la població al llarg del temps i la composició genètica de la població canviarà paulatinament (Fig. 1).

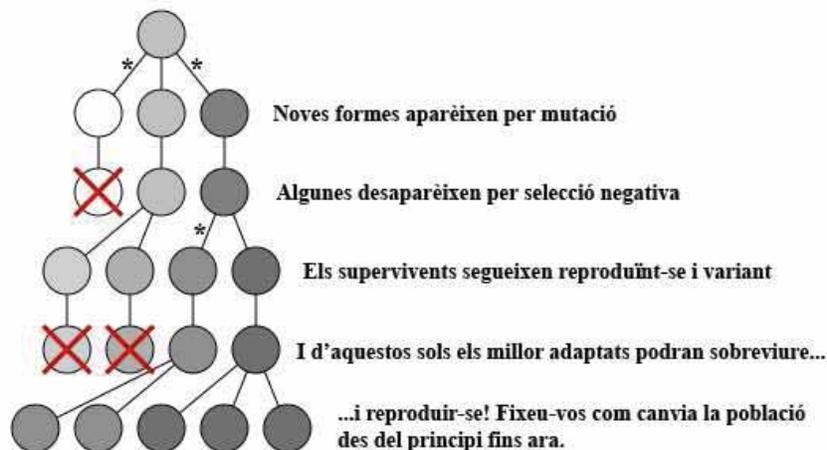


Fig. 1. Representació gràfica del concepte Darwinian d'evolució biològica. Un organisme pateix mutacions (canvis) que es poden transmetre a la descendència. Alguns d'aquests canvis seran deleteris (selecció negativa), mentre altres descendents podran sobreviure i reproduir-se. Aquells millor adaptats aportaran un nombre major de descendents a la següent generació.

A mesura que aquest procés continuï al llarg de les generacions, es produiran noves espècies (Coyne and Orr, 2004). Així, la gran varietat d'espècies actuals s'hauria generat per un procés continuu de divergència i separació de llinatges, a partir d'avantpassats comuns, com si tots els éssers vius formaren una gran família.

Una conseqüència lògica d'aquest procés de divergència al llarg del temps és l'existència d'una sèrie d'ancestres comuns per als diferents grups d'organismes analitzats, siguin phyla, famílies, espècies o poblacions d'una mateixa espècie. L'estudi, mitjançant les tècniques d'anàlisi molecular, de la variabilitat genètica present en els organismes actuals, ens permet "fer un viatge cap al passat" i reconstruir aquest procés de divergència entre grups d'organismes, reconstruir la seua filogènia (filo = fulla, branca; gènesi = origen, naixement). Així, les eines d'anàlisi molecular ens permeten estudiar la diversitat genètica a diferents nivells evolutius, des de divergències que van ocórrer fa centenars de milions d'anys fins a divergències entre les poblacions actuals d'una mateixa espècie. Per exemple, per tal d'estudiar divergències antigues, compararem les seqüències de gens que participen en el funcionament bàsic de la cèl.lula, com els que codifiquen per RNA ribosomals i histones, ja que són els més indicats per a l'estudi de l'origen dels grans grups actuals: phyla, ordres o famílies (Larson, 2004). Així, la reconstrucció filogenètica ens permetrà definir la probabilitat que les diferents hipòtesis evolutives hagen produït les seqüències observades.

En el cas concret d'aquesta tesi, es pretén resoldre les relacions evolutives a diferents nivells en llagostes del grup Achelata, des de les divergències antigues (relacions entre famílies dins de l'infraordre) fins als processos més actuals (diferenciació genètica entre poblacions d'una espècie concreta). L'elecció d'aquest grup d'organismes per a desenvolupar un treball de recerca en genètica evolutiva està clarament justificada. Els Achelata són crustacis decàpodes que es caracteritzen principalment per la presència d'una zoea molt especialitzada per a la dispersió pels oceans, la larva filosoma (Fig. 2). En algunes espècies, la filosoma pot passar fins a 24 mesos (2 anys!) en aigües oceàniques, arribant a desplaçar-se milers de kilòmetres. Així, una capacitat dispersiva tan gran i l'aparent manca de barreres a la dispersió que trobem en el medi marí, fan d'aquest grup d'organismes un cas paradigmàtic i molt interessant. En teoria, aquest mecanisme tan especialitzat de dispersió larval hauria de fer que el flux genètic entre poblacions dins d'una espècie fóra molt elevat, i per tant, la diferenciació genètica fóra molt baixa. Tanmateix, és un fet que els aquelats són molt diversos i que han sigut

capaços de colonitzar diferents ambients a gairebé tots els oceans del món, ja que es poden trobar des d'arran de costa fins a més de 900m de profunditat (Holthuis, 1991).

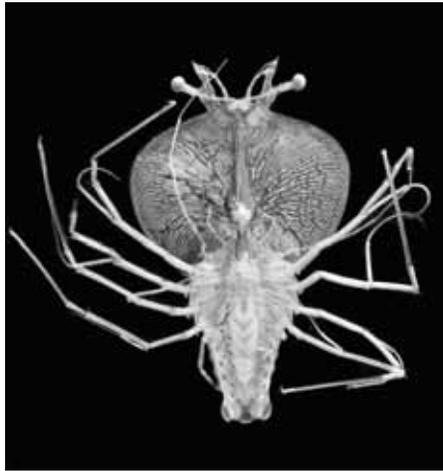


Fig. 2. Larva fillosoma de *Scyllarus pygmaeus* Bate, 1888.

1.1.- Divergències antigues: Viatge cap al passat més llunyà

Les implicacions dels estudis de sistemàtica són molt importants, ja que la reconstrucció filogenètica ens permet definir la classificació dels organismes actuals de manera que es reflectisca millor les relacions evolutives entre grups (Hennig, 1950). Així, una correcta classificació i identificació dels organismes és fonamental per tal de realitzar qualsevol tipus d'estudi biològic. Si no som capaços de discriminar entre els diferents tipus d'organismes, podríem estar realitzant inferències a partir de grups heterogenis d'espècies, i això invalidaria els resultats (Frankham et al., 2002). El principal problema amb les classificacions basades en la morfologia dels organismes és que els processos de convergència adaptativa fan que organismes amb orígens molt distants tendeixen a semblar-se, la qual cosa ens portaria a agrupar espècies que pertanyen a llinatges diferents. A més a més, un altre problema important és que moltes característiques morfològiques es poden haver perdut en un llinatge pel tipus de cicle vital, com passa sovint en espècies paràsits. Les noves eines d'anàlisi molecular i l'estudi de llargs segments d'ADN ens proporcionen milers de caràcters variables nous per a l'estudi de les relacions evolutives entre organismes. Tanmateix, per tal d'interpretar tot aquest nou maremàgnum de dades, també necessitem noves eines d'anàlisi de dades. Així, per

reconstruir la història evolutiva d'un grup taxonòmic a partir de dades moleculars, necessitem un model d'evolució que ens expliqui com canvien les molècules al llarg del temps.

1.1.1.- Inferència filogenètica i seqüències d'ADN: La revolució bayesiana.

L'estadística bayesiana ha revolucionat la genètica moderna, aportant una nova eina d'anàlisi i revifant àrees d'estudi que havien quedat estancades des de feia dècades. Gràcies als mètodes bayesians, podem treballar amb models evolutius molt més sofisticats. En el món real ens trobem amb casos complexos que no podem explicar de forma directa. Aquests tipus de casos, en els quals el valor resultant d'una gran quantitat d'interaccions no es pot predir amb certesa, s'expliquen mitjançant models probabilístics. En l'estadística clàssica, la probabilitat d'un succés s'interpreta com la proporció dels casos en què es realitza el succés; per posar l'exemple més conegut, el nombre de cares obtingudes quan llancem una moneda 'x' vegades. Aquesta probabilitat es considera un valor absolut. Tanmateix, en inferència bayesiana, les probabilitats no s'interpreten com a freqüències o proporcions, sinó més aviat com a graus de certesa (Bolstad, 2004). És evident que mai podrem arribar a la veritat absoluta sobre el món real, però conforme acumulem evidències, el nivell de credibilitat d'una hipòtesi varia. En definitiva, cal tenir en compte que un conjunt d'observacions suposa un mitjà per a canviar el nivell de credibilitat de la nostra hipòtesi, no una forma d'aconseguir la veritat absoluta. L'estadística clàssica rebutja una hipòtesi quan creu que les dades no responen a allò que calia esperar sota unes condicions determinades, mentre que la inferència bayesiana fa per proporcionar-nos el nivell de credibilitat d'una hipòtesi després d'observar les dades (Shoemaker et al., 1999). Els bayesians no creuen escaient especificar una hipòtesi i decidir simplement si rebutjar-la o no rebutjar-la. Per ells, les lleis de probabilitat han d'indicar-nos quines hipòtesis hem de creure i fins a quin nivell podem confiar-hi, sense descartar-ne cap.

Recentment, l'aplicació de l'anàlisi bayesiana ha suposat una revolució qualitativa a l'hora de reconstruir les relacions de parentiu entre espècies usant models probabilístics

d'evolució molecular. L'ús de models probabilístics d'evolució de l'ADN ens permet extreure una quantitat considerable d'informació a partir de dades de seqüències. La inferència bayesiana ens permet especificar un model evolutiu i una distribució de probabilitats a priori, i aleshores, determinar la probabilitat posterior de cada arbre filogenètic (Beaumont and Rannala, 2004). Donada la gran quantitat de paràmetres que contenen, les funcions de versemblança per als models filogenètics basats en seqüències d'ADN són massa complexes com per ser integrades analíticament, així que les aproximacions bayesianes actuals es recolzen en mètodes Markov Chain-Monte Carlo (MCMC). Mitjançant els mètodes MCMC es genera una distribució de probabilitats, seguint una sèrie de passos encadenats, de forma que el pas següent s'obté mitjançant l'alteració aleatòria d'alguns dels paràmetres del model (Rousset and Raymond, 1997). La localització en l'espai paramètric suposa una descripció de l'arbre i una especificació del model evolutiu (Huelsenbeck et al., 2001). Si el pas que hem donat ens proporciona una probabilitat posterior més elevada, acceptem el moviment, si no, normalment serà rebutjat (no sempre, ja que alguns passos enrere són acceptats). La cadena de passos creada representa un desplaçament pels diferents conjunts d'arbres i models evolutius (Gelman et al., 2003). Per definició, la proporció del temps que una cadena passa en una regió concreta de l'espai paramètric es pot fer servir com a estimació de la probabilitat posterior d'eixa regió. Si tot va bé, la cadena tendirà a romandre en regions amb una probabilitat posterior elevada. Al final de l'anàlisi, tenim una estima de la probabilitat de l'arbre filogenètic donades les dades, que és el que ens interessa. Per suposat, aquesta estima es basa en un model evolutiu concret i en què les distribucions a priori siguin raonables.

1.1.2.- Sistemàtica dels Achelata

Les llagostes Achelata (Scholtz and Richter, 1995) tenen una història evolutiva relativament llarga, ja que estan entre els primers crustacis decàpodes que apareixen al registre fòssil (Schram, 2001). Actualment, les llagostes del grup Achelata es classifiquen en tres famílies principals: Palinuridae Latreille, 1802 (llagostes o palinúrids); Scyllaridae Latreille, 1825 (castanyoles o escil·làrids) i Synaxidae Bate, 1881 (llagostes del corall o

sinàxids). Aquestes famílies es poden distingir fàcilment segons les seues característiques morfològiques (Fig. 3), encara que alguns autors i els resultats d'aquesta tesi han qüestionat recentment la validesa del grup Synaxidae (Davie, 1990; George, 2006).

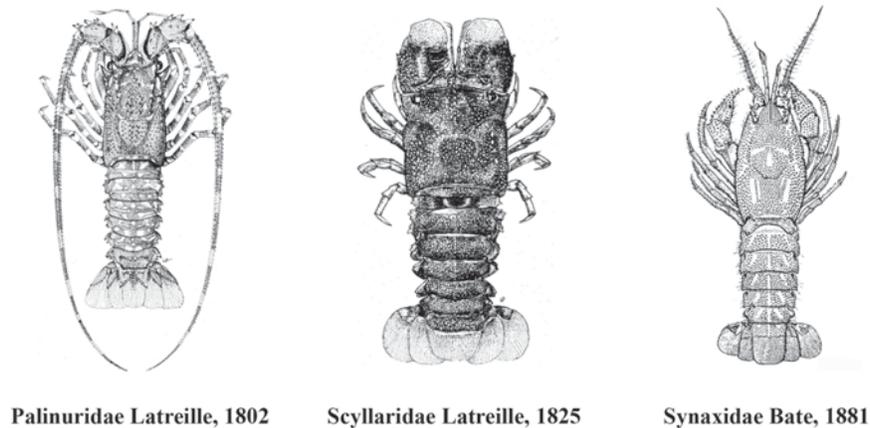


Fig. 3. Principals famílies que formen l'infraordre Achelata Scholtz and Richter, 1995.

Dins dels Palinuridae, les relacions evolutives també presenten algunes incerteses. Parker (1884), va ser el primer a dividir els gèneres de palinúrid en Stridentes (*Linuparus*, *Palinustus*, *Puerulus*, *Palinurus*, *Panulirus* i *Justitia*) i Silentes (*Jasus* i *Projasus*), segons la presència/absència d'òrgan estridulant. L'òrgan estridulant permet als Stridentes fer un soroll fort fregant una extensió de la base de cada antena (el plectre) sobre la placa antenular i representa una adaptació evolutiva per a la comunicació i defensa (Moulton, 1957; Patek and Oakley, 2003). En un dels primers estudis de l'evolució biològica en el medi marí, George and Main (1967), basant-se en la forma del pleòpode de la femella en el segon segment abdominal, consideraven el parell de gèneres *Linuparus/Puerulus* com a representants de les llagostes stridentes ancestrals. Posteriorment, Baisre (1994) va trobar suport per a algunes de les relacions filogenètiques suggerides per George and Main (1967) usant caràcters larvals, tot i que, en aquest cas, *Puerulus* s'agrupava amb *Palinurus* (Fig. 4). Així, s'han proposat diferents relacions evolutives entre les famílies d'Achelata en base a la seua morfologia i el registre fòssil, però encara no s'ha pogut concloure de forma objectiva quin és l'origen d'aquests organismes tan peculiars i interessants.

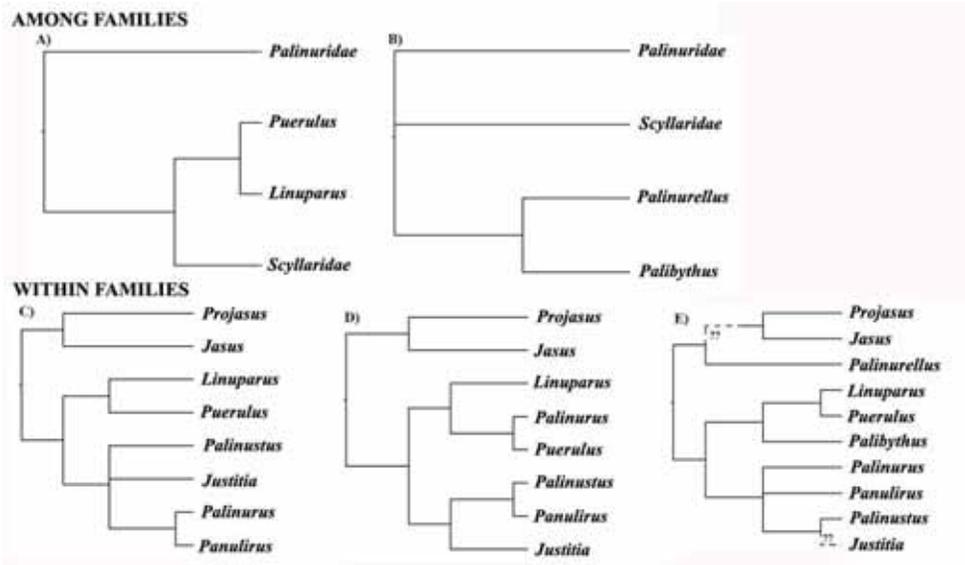


Fig. 4. Diferents hipòtesis evolutives de les relacions entre famílies d'Achelata basades en A) evidència paleontològica (Förster), i B) evidència morfològica (Holthuis). Hipòtesis d'evolució dins de Palinuridae: C) George and Main (1967), D) Baisre (1994) i E) George (2006).

Un cas especialment interessant és el de la família Synaxidae, que inclou només tres espècies bastant rares pertanyents a dos gèneres diferents (*Palybithus* i *Palinurellus*) (Fig. 5).

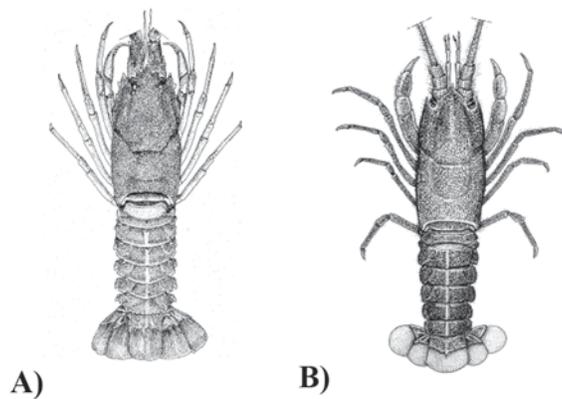


Fig. 5. La família Synaxidae està formada per 2 gèneres: A) *Palybithus* i B) *Palinurellus*.

Tot i que agrupades a partir de caràcters compartits i únics dins dels Achelata com ara la presència de rostre, una closca sense espines frontals i un tòrax estret, Patek i Oakley (2003) indicaven en un estudi molecular recent que potser tant *Palybithus* com

Palinurellus s'haurien de col·locar entre els Palinuridae, tot i que els seus resultats no eren concloents. Sota l'esquema de classificació tradicional, la presència d'òrgan estridulant a *Palybithus* i l'absència a *Palinurellus* implicarien que: o aquesta estructura especialitzada ha aparegut dues vegades (una vegada en el llinatge Synaxidae i una altra vegada als Stridentes) o que ha desaparegut dues vegades (una vegada en el llinatge Synaxidae i una altra vegada als Silentes) (Holthuis, 1991). Tanmateix, si *Palybithus* i *Palinurellus* pertanyen a llinatges independents, ens trobariem front a un cas de convergència morfològica. Així, resoldre les relacions entre els diferents llinatges actuals implica un canvi radical en la nostra interpretació del procés evolutiu dins dels Achelata.

1.2.- Divergències recents: Viatge cap a un passat no tant llunyà

Tot i l'ús generalitzat de les seqüències d'ADN codificant per tal d'inferir relacions evolutives entre diferents grups d'espècies, aquestes seqüències sols ens serveixen per a estudiar les divergències que han ocorregut en una escala temporal molt llarga. Així, es pot considerar que un gen nuclear presenta un canvi per mutació cada milió d'anys com a mitjana (més o menys!) i això fa que, entre espècies que han divergit fa menys de 5 milions d'anys, no trobem gairebé cap diferència amb els marcadors genètics típics (p.e. gens ribosomals o codificant per histones). Per exemple, la seqüència de la proteïna histona H3 no ens permet discriminar entre un humà i un ximpanzé, i sols trobem dos canvis d'aminoàcid en comparar un humà i una rata (temps de divergència: 25-80 milions d'anys). Quan volem estudiar les relacions evolutives entre espècies que fa relativament poc de temps que han divergit, necessitem marcadors genètics específics i que tinguen una taxa de mutació especialment elevada.

1.2.1.- ADN mitocondrial (mtDNA) i Microsatèl.lits (VNTRs)

Els marcadors genètics amb una taxa de mutació especialment elevada més utilitzats són l'ADN mitocondrial (mtDNA) i els microsatèl.lits (VNTRs). Per una banda, les taxes de mutació de mtDNA són generalment més altes que els de les seqüències d'ADN nuclear codificant per gens. Brown et al. (1982) va demostrar que la taxa

d'evolució de seqüència de mtDNA en primats està al voltant d'un 2% per milió d'anys i que la taxa d'evolució del genoma mitocondrial sol ser unes 10 vegades més elevada que la taxa de mutació del genoma nuclear. Gràcies a l'obtenció d'estimes directes de les taxes de mutació de mtDNA en ocells (Lambert et al. 2002), nematodes (Denver et al. 2000), i humans (Howell et al. 2003), ara sabem que la selecció juga un paper molt important en l'evolució del mtDNA. Això, i el fet que l'ADN mitocondrial s'herete solament per via materna en la majoria d'animals, fa que aquest genoma ens presente una visió molt peculiar de la història evolutiva de les espècies. L'ADN mitocondrial s'ha fet servir principalment per a estudis de filogeografia, ja que permet integrar distribució geogràfica i relacions filogenètiques entre al·lels d'una forma directa (vegeu més endavant).

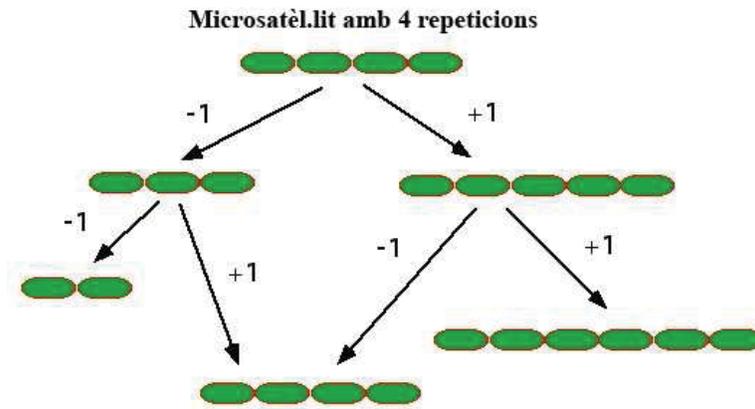


Fig. 6. El model mutacional 'stepwise' intenta explicar el procés mutacional dels marcadors microsatèl·lits. Per això, com ens mostra la imatge superior, dues mutacions, una pèrdua d'una repetició (-1) seguida per un guany (+1) retorna el marcador a la seva llargada original.

Per altra banda, fa escassament 30 anys que es van descobrir els microsatèl·lits (VNTR: Repeticions en Tàndem de Nombre Variable; Tautz, 1989). Els microsatèl·lits són seqüències d'ADN consistents en repeticions en tàndem de 1 a 5 parells de bases (mono-, di-, tri-, tetra- o pentanucleòtids) (Queller et al, 1993). Aquestes seqüències estan distribuïdes al genoma de tots els eucariotes analitzats fins ara i també en el genoma cloroplàstic de plantes (Jarne and Lagoda, 1996), però gairebé sempre situades en regions no codificants, ja que el guany o la pèrdua de les repeticions pot provocar canvis en la pauta de lectura del gen per a tots els tipus de repeticions a excepció dels trinucleòtids

(Hancock, 1999). La seva densitat depèn de l'espècie i solen presentar elevats nivells de polimorfisme, ja que tenen una taxa de mutació molt elevada (Féral, 2002). Aquesta elevada taxa de mutació és deguda al fet que el nombre de repeticions varia fàcilment per les dificultats de l'ADN polimerasa per a replicar un fragment amb seqüències repetitives. El procés de mutació de seqüències repetitives per l'ADN polimerasa sol ser 'stepwise', és a dir, que el canvi normalment suposa un augment o disminució en 1 unitat de repetició (Fig. 6). Per altra banda, en espècies en què s'ha pogut estimar la taxa de mutació directament, s'ha descrit que també es poden produir al·lels nous a partir de guanys de més d'una unitat de repetició (Vázquez et al., 2000; Seyfert et al., 2008).

En els darrers anys, trobem els microsatèl·lits entre els marcadors moleculars més utilitzats en estudis poblacionals (DeWoody and Avise, 2000; Hutchinson et al, 2001). Açò és perquè presenten elevats nivells de polimorfisme, són codominants, són generalment neutres, només es necessita una petita quantitat de teixit per realitzar les anàlisis i es poden analitzar un gran nombre de marcadors de forma simultània (Jarne and Lagoda, 1996). Totes aquestes qualitats fan que els microsatèl·lits siguin els marcadors moleculars més indicats per estudiar variabilitat inter- i intra- poblacional, ja que la seva gran diversitat permet diferenciar poblacions i estimar el flux gènic entre aquestes d'una forma molt més clara que amb qualsevol altre marcador molecular (Estoup et al. 1998). El principal problema que presenta l'ús de loci microsatèl·lits és que s'han d'aïllar *de novo* per a la majoria d'espècies que s'han d'estudiar per primer cop, ja que, en trobar-se en regions no codificadores, les seves regions flanquejants estan generalment poc conservades. A causa d'aquestes complicacions per tal d'amplificar un mateix set de microsatèl·lits en diferents espècies, només un nombre molt limitat d'estudis experimentals s'han dut a terme per provar l'aplicabilitat de microsatèl·lits per a la inferència filogenètica sobre processos d'especiació recent (Guo et al., 2005).

1.2.2.- Processos d'especiació al medi marí i el gènere *Palinurus*

L'existència de marcadors amb una taxa de mutació relativament elevada ens permet dur a terme l'anàlisi de processos d'especiació recent. Alhora, l'estudi de la variabilitat i les relacions filogenètiques entre espècies que han divergit fa poc ens permet definir quins processos històrics han tingut un major impacte sobre els organismes marins i, més concretament, definir quin és el model d'especiació més adequat per a organismes que evolucionen en un medi, el medi marí, sense barreres a la dispersió tan aparents. La major part de biòlegs evolutius accepten el concepte biològic d'espècie proposat per Mayr: l'espècie està formada per grups de poblacions d'organismes que poden encreuar-se i donar descendència fèrtil, aïllats reproductivament d'altres grups (Mayr, 2001). L'aïllament reproductor, conjuntament amb la selecció i la deriva genètica han contribuït a crear i estendre les diferències morfològiques que existeixen entre les espècies. Per tant, entendre l'origen d'aquest aïllament és entendre l'origen de les espècies (Heads, 2005). Segons els neodarwinistes, el model més important d'aïllament és degut a l'existència de barreres entre les poblacions. Aquest aïllament físic o allopatria, portaria inevitablament a la divergència evolutiva mitjançant la selecció natural i/o la deriva genètica (Kimura, 1983). Després d'un temps suficient, l'aïllament reproductor es desenvoluparia com una conseqüència més d'aquesta diferenciació genètica.

El gènere *Palinurus* representa un cas especialment interessant per tal d'estudiar el procés d'especiació en el medi marí, ja que només es troba a l'Atlàntic Central i Nord-oriental, Mar Mediterrània, i a l'Índic Sud-occidental i compta amb sis espècies actuals (Groeneveld, 2007). Tres espècies viuen a l'hemisferi nord (*P. elephas* Fabricius, 1787, *P. mauritanicus* Gruvel, 1911 i *P. charlestoni* Forest & Postel, 1964) i tres més a l'hemisferi sud (*P. gilchristi* Stebbing, 1900, *P. delagoae* Barnard, 1926 i *P. barbarae* Groeneveld et al., 2006). *P. elephas* i *P. mauritanicus* es troben a l'Atlàntic nord-oriental i Mediterrània mentre *P. charlestoni* és una espècie endèmica de les Illes de Cabo Verde, a l'Atlàntic Central Oriental (Zariquiey-Álvarez, 1968; d'Udekem d'Acoz, 1999). La distribució batimètrica de *P. elephas* està compresa entre 5 i 200 m de profunditat en substrat rocós; *P. mauritanicus* es troba preferentment entre 150 i 400 m, en esculls coral·lins i substrats

fangosos prop d'afloraments de roca i *P. charlestoni* es troba en fons rocosos de marcat pendent, a profunditat de 50-350 m i probablement aigües més profundes (Abelló et al., 1988; Groeneveld et al., 2007). Pel que fa a les espècies de l'hemisferi sud, *P. gilchristi* és endèmica de la costa sud de Sud-Àfrica, al voltant de 50 i 200 m de profunditat i *P. delagoae* és una espècie d'aigua més profunda (150-600 m) distribuïda entre les latituds 17° S (Moçambic) a 32° S (Sud-Àfrica oriental). Finalment, *P. barbarae* és una espècie recentment descoberta que es troba en roques trencades i costerudes a més de 100 m de profunditat a Walters Shoals, Madagascar Ridge (Groeneveld et al., 2006).

Les relacions evolutives entre les sis espècies incloses en el gènere *Palinurus* s'han estudiat recentment mitjançant els gens mitocondrials COI i 16S (Groeneveld et al., 2007). Groeneveld et al. (2007) han suggerit que la distribució geogràfica actual indica una divergència pre-Miocènica (14-23 milions d'anys), amb dos llinatges separant-se amb el tancament de la connexió marina que unia Mar Mediterrània amb oceà Índic (Rögl, 1999). Els resultats obtinguts per aquests autors també donaven suport a la monofília del gènere i indicaven que *P. charlestoni* podria, de fet, haver estat originat d'un avantpassat Sudafricà que hagués colonitzat les illes de Cap Verd. Nogensmenys, hi ha una certa controvèrsia sobre els modes de filogeografia i especiació en diferents grups d'espècies presents a l'Atlàntic i l'Oceà Índic oriental (p.e. algues: Verbruggen et al., 2005; garotes: Lessios et al., 2001; peixos: Rocha et al., 2005). Aquests estudis suggereixen que tant esdeveniments més vells (p.e. obertura de l'Atlàntic central durant el Juràssic) com processos oceanogràfics més recents (p.e. afloraments africans i glaciacions) podrien haver influït en els processos d'especiació de molts organismes marins. Per això, la utilització conjunta de gens nuclears i mitocondrials ens pot proporcionar una millor comprensió de les relacions filogenètiques entre aquestes espècies i ens pot permetre contestar a preguntes importants pel que fa als processos d'especiació i radiació en organismes marins.

1.3.- Genètica de poblacions en organismes marins: “poner puertas al mar”

Finalment, l'estudi de la variabilitat genètica dins d'una mateixa espècie ens apropa de forma directa al món de la genètica de poblacions i a l'àmbit més actual de l'evolució. Definir els patrons filogeogràfics de distribució de variabilitat genètica i estudiar els patrons d'estructuració d'aquesta variabilitat ens ajuda a entendre quin ha estat l'origen i quin pot ser l'impacte de diferents factors sobre la variabilitat genètica d'una espècie. Des d'un punt de vist econòmic, tota aquesta informació té un pes molt més important quan tractem de gestionar els stocks d'espècies sotmeses a explotació pesquera, com és el cas de la llagosta vermella (*Palinurus elephas*).

1.3.1.- Marc conceptual: Filogeografia i Teoria de la coalescència.

La filogeografia és un camp de coneixement molt recent i que ha experimentat un creixement ràpid durant els darrers anys (Beheregaray, 2008). S'origina a partir de les tècniques moleculars aparegudes al voltant dels anys 1980 que permeten determinar, de forma sistemàtica, la variació en seqüències d'ADN a nivell poblacional i per tant reconstruir genealogies de gens. Així, la filogeografia adreça l'estudi dels processos històrics que expliquen la distribució geogràfica actual de la variabilitat genètica de les espècies. Això s'acompleix estudiant la distribució geogràfica dels individus en base a les relacions evolutives entre els al·lels que contenen. Per aquesta raó, la filogeografia es troba a mig camí entre la genètica de poblacions clàssica i la filogenètica. Com que es posa un èmfasi explícit en el passat biogeogràfic, es tracten principalment esdeveniments que han ocorregut en el passat més recent d'una espècie, com ara expansions poblacionals, reduccions dràstiques en les grandàries poblacionals (colls d'ampolla), processos de vicariança (és a dir, que la població ha quedat dividida per l'aparició d'una barrera determinada o l'extinció de poblacions intermèdies) i migració. La filogeografia integra conceptes de la teoria de la coalescència (veure més endavant) i la informació geogràfica per a poder inferir la importància relativa de cadascuna d'aquestes forces històriques en la formació dels patrons actuals.

Tot i això, cal tenir en compte que cada seqüència d'ADN té la seva pròpia genealogia, i la història evolutiva de l'espècie és la suma de moltes genealogies de gens diferents. L'ús de marcadors diversos, tant mitocondrials com nuclears, indica que les conclusions obtingudes a partir d'un únic marcador molecular poden ser enganyoses. A més, els diversos mètodes d'anàlisi investiguen aspectes diferents de la història evolutiva. En conseqüència, per tal de reconstruir la història filogeogràfica d'una espècie, hom hauria d'usar idealment una àmplia gamma de seqüències, incloent-hi marcadors nuclears, autosomals, relacionats al sexe, marcadors neutres, i sempre incloent-hi marcadors que cobrisquen un ampli espectre de taxes de mutació (Avise, 1998). Una filogeografia basada en l'estudi d'uns quants loci independents ens proporcionarà una visió de la història molt més completa i més fiable, però necessitem un marc conceptual que ens permeti integrar aquesta informació.

La teoria de la coalescència proporciona els fonaments teòrics de la genètica molecular de poblacions i la genòmica actuals. És el marc conceptual per a estudis de variabilitat molecular dins i entre espècies, i és la font d'eines essencials per a realitzar inferències sobre el procés evolutiu (Wakeley, 2005).

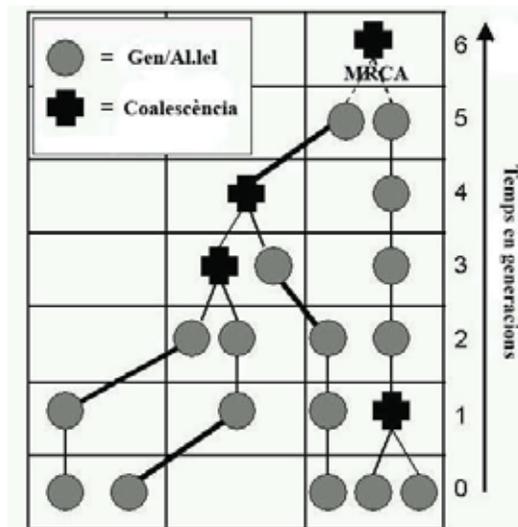


Fig. 7. Genealogia de les variants al·lèliques presents en una població. S'assenyalen els esdeveniments de coalescència i l'ancestre comú més recent (MRCA).

La teoria de la coalescència és un model retrospectiu que localitza tots els al·lels d'un gen en una mostra, des d'una població determinada fins a una còpia ancestral única compartida per tots els membres de la població (Kingman, 1982a). Aquest és l'anomenat ancestre comú més recent (MRCA) (Fig. 7). Les relacions d'herència entre al·lels es representen típicament com a genealogia de gens, similar en forma a un arbre genealògic. La teoria de la coalescència pretén descriure les propietats estadístiques d'aquesta genealogia de gens. En el cas més simple, la teoria de la coalescència no assumeix recombinació, selecció, ni flux gènic o estructuració de les poblacions (Hudson, 1991). Els avenços en la teoria de la coalescència, tanmateix, permeten ampliar el model bàsic, i incloure recombinació, selecció, i virtualment qualsevol model demogràfic arbitràriament complex. La teoria matemàtica de la coalescència va ser desenvolupada originalment durant els anys 1980 per John Kingman (1982b), i intenta predir la quantitat de temps passat entre la introducció d'una mutació i la distribució de l'al·lel o gen particular en una població. Sabem que la deriva genètica tendeix a fixar un dels al·lels presents a la població, de forma que resulta més probable que es fixi l'al·lel més abundant en absència d'acció d'altres forces evolutives (Kimura, 1968, 1989).

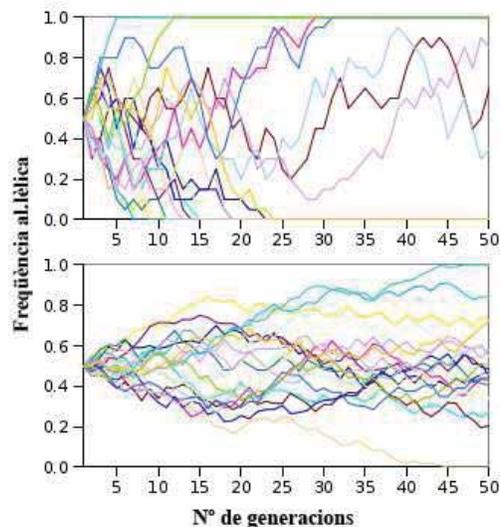


Fig. 8. Canvi en la freqüència d'un al·lel que no pateix l'efecte de la selecció, per a una població amb un tamany efectiu de $N_e = 10$ (dalt) i $N_e = 100$ (baix). Aquests al·lels evolucionaran de forma "neutra", així que alguns desapareixeran i uns altres es fixaran per atzar. La velocitat (en nombre de generacions) amb què s'arriba a la fixació o pèrdua d'un al·lel neutre depèn de la grandària efectiva de la població.

A més, la velocitat de fixació d'un al·lel guarda una relació inversa amb el nombre d'individus de la població (Fig. 8). En general, la deriva genètica és un mecanisme lent, sobretot en poblacions grans, però esdevé important quan un nombre petit d'individus funda una nova població o les poblacions estan aïllades (Gavrilets, 1999). Per tant, definir els patrons de connectivitat entre poblacions d'una espècie té una importància fonamental per tal de mantenir i gestionar la diversitat biològica de les espècies (Frankham et al., 2002). De fet, en els plans de conservació dels recursos marins, cal tenir en compte les relacions de flux gènic entre poblacions d'espècies amenaçades per tal de localitzar àrees protegides allà on l'efecte positiu siga major.

1.3.2.- Dispersió larval i connectivitat: Barreres actuals

En la pràctica, a l'hora d'establir una zona protegida, sembla més convenient preservar aquelles poblacions que tenen una capacitat reproductiva major i que són capaces d'exportar individus de forma efectiva cap a altres àrees (Palumbi, 2004). Tanmateix, els estudis de dispersió en organismes marins són generalment escassos a causa de la natura de l'ambient que ocupen (Avisé, 1998). Per tal de respondre aquestes qüestions de forma definitiva, caldria seguir els propàguls microscòpics a través de l'ambient pelàgic, des de l'eclosió de les larves fins als llocs de reclutament. Com que això no és factible en la majoria de les espècies (Moran and Marko, 2005), les dades genètiques ens presenten una oportunitat excepcional per tancar buits en el coneixement dels patrons de connectivitat i demografia de les poblacions (Avisé 2004). Els marcadors genètics poden proporcionar-nos evidències molt fortes del fet que una població és tancada perquè la diferenciació genètica és molt sensible a la migració. Així, un grau elevat de dispersió es troba habitualment associat amb un menor grau de diferenciació genètica al llarg de l'àrea de distribució de l'espècie (Palumbi et al., 2003).

Per a molta gent, no coneixedora de l'heterogènia real de la mar, pot semblar que l'ambient marí és com un espai sense barreres, continu i homogeni al llarg de grans distàncies. D'acord amb aquesta visió, generalment es troba que els organismes marins presenten uns valors de diferenciació genètica ($F_{st} < 0.005$) comparativament més baixos

que organismes terrestres ($F_{st} > 0.01$) (Waples, 1989). No obstant això, l'existència de transicions entre diferents mars o la presència d'estructures oceanogràfiques complexes, com ara girs i remolins, fa que el medi marí estiga més estructurat del que sembla a primer cop d'ull (Rocha et al., 2005). Així, barreres oceanogràfiques, aïllament per distància, limitacions comportamentals a la dispersió, selecció i història recent de les poblacions poden causar subdivisió poblacional (Palumbi, 1994). De fet, la duració de la larva pelàgica (PLD) sembla ser un factor important per a entendre els patrons de dispersió i el grau de connexió entre poblacions al medi marí (Shanks et al., 2003). Així, les espècies de crustaci amb una elevada PLD solen presentar poblacions grans i amb àrees de distribució amples (Shanks and Eckert, 2005; Teske et al., 2006). Tanmateix, encara que les larves potencialment podrien dispersar-se llargues distàncies, estudis recents apunten que pot existir estructuració poblacional en escales molt menors que el límit teòric de dispersió larval (Rocha et al., 2005), indicant que el comportament de les larves i la seua localització en les diferents masses d'aigua també poden tindre un paper important en el grau de dispersió (Naylor, 2005, 2006). El fet que l'estructuració poblacional i la diversitat genètica estiguen estretament relacionades, fa que l'estudi de la variabilitat i l'estructuració de les poblacions d'organismes marins ens permeta determinar l'efecte que els factors oceanogràfics tenen sobre la capacitat dispersiva i els patrons de connectivitat dels organismes marins sotmesos a explotació (Rice, 2004).

1.3.3.- Biologia i pesca de *Palinurus elephas*

La llagosta europea (*Palinurus elephas* Fabricius, 1787) és una espècie comercial present en la Mediterrània i la costa de l'Atlàntic Occidental entre Marroc (28°N) i Noruega (60°N). Les captures de llagosta han minvat de forma continuada durant els darrers anys, amb la mitjana de captures descendent de forma alarmant tot al llarg de la seua distribució geogràfica (Goñi and Latrouite, 2005). Tot i que la present normativa regula una talla mínima de captura i estableix un període de veda de sis mesos i un màxim per a la quantitat de xarxes per vaixell, un percentatge considerable de les captures de llagosta podrien escapar al control de les administracions (Groeneveld, 2003). Atés que sembla impossible controlar la pesca indiscriminada per tota l'àrea de

distribució, és evident que la regulació de les pesqueries de llagosta ha de passar per l'establiment d'àrees protegides que permeten d'abastir les zones sobreexplotades (Carr, 2000). La llagosta europea és una espècie candidata per als plans de protecció i conservació dels recursos marins sotmesos a explotació pesquera dins l'àmbit de la Unió Europea, inclosa en la llista d'espècies protegides en l'annex 3 de la Convenció de Berna (1979) i l'annex I de la llista d'espècies prioritàries per a la conservació de la SAC (AdriaMed, 2007). Per tal de desenvolupar programes de conservació adequats és molt important realitzar estudis previs sobre la connectivitat de les poblacions.

Les llagostes adultes no solen desplaçar-se llargues distàncies, així que les connexions entre poblacions han de ser degudes principalment a la dispersió larval (Hepper, 1977; Relini and Torchia, 1997). Les primeres fases del desenvolupament de les llagostes inclouen una fase larval planctònica adaptada a una llarga vida en l'oceà obert, on augmenten les probabilitats de dispersió via els corrents marins (Booth and Phillips 1994). Així, la durada de la fase filosoma en la llagosta europea (*P. elephas*) s'ha estimat en 9 mesos a la natura (Hunter, 1996). La fase larval és seguida per una metamorfosi a la fase de puerulus (post-larva), la qual està encarregada de l'assentament al fons marí i la transició a juvenil de llagosta (Palero et al., 2008). Els juvenils d'algunes espècies de llagosta poden migrar fins a 700 km (Goeneveld and Branch, 2002), i en el procés de migració podrien compensar l'efecte dispersiu de la fase larval (Booth, 1997). Aquest mecanisme de dispersió larval i migracions bentòniques faria pensar que el flux genètic entre poblacions és extens, i per tant, que l'estructuració genètica és molt baixa. Tot i això, els moviments de les masses d'aigua que afecten la dispersió larval són temporals i, de vegades, canvis en el patró de corrents poden fer que algunes poblacions queden aïllades. D'aquesta manera, sistemes oceanogràfics semitancats, com ara la Mediterrània, poden conduir al desenvolupament de poblacions genèticament divergents (Pollock, 1993).

Estudiar l'estructura poblacional és un pas fonamental per definir l'existència d'unitats de gestió genèticament diferenciades, especialment en *P. elephas*, donada la seua rellevància econòmica i la implicació de diferents estats de la Unió Europea i el

Nord d'Àfrica en la seua explotació comercial. A més a més, l'existència d'una fase larval de tan llarga duració ens permet utilitzar *P.elephas* com a model per tal de testar la relació entre la durada de la fase larval i l'estructuració genètica en les poblacions d'organismes marins.

2.- OBJECTIUS

1- Revisar els mètodes actuals d'inferència filogenètica posant èmfasi en la inferència a partir de dades moleculars. Assenyalar els trets més importants dels mètodes de màxima parsimònia (MP), mètodes de distàncies, màxima versemblança (ML) i inferència Bayesiana (BI).

2- Proporcionar noves perspectives sobre les relacions evolutives entre llagostes de l'infraordre Achelata utilitzant marcadors moleculars, tant d'evolució lenta com d'evolució ràpida, i calcular el temps de divergència entre taxa utilitzant el mètode del rellotge molecular relaxat.

3- Desenvolupar una genoteca per a la llagosta europea *Palinurus elephas* per tal d'obtenir un conjunt de marcadors microsatèl·lit polimòrfics.

4- Comparar les mesures de diversitat genètica i grandària efectiva obtingudes en les sis espècies descrites del gènere *Palinurus* a partir dels marcadors microsatèl·lit prèviament desenvolupats.

5- Estudiar les relacions filogenètiques entre espècies del gènere *Palinurus* i testar el suport de les dades moleculars a diferents hipòtesis evolutives, utilitzant els mètodes clàssics basats en distàncies, i mètodes recents basats en la teoria de la coalescència, com la Computació Bayesiana Aproximada (ABC).

6- Estudiar la filogeografia de la llagosta europea utilitzant una porció del gen mitocondrial COI com a marcador genètic i *P. mauritanicus* com a outgroup, i analitzar si la variabilitat genètica i l'estructura de les poblacions de *P. elephas* estan influïdes per factors actuals i/o històrics.

7- Avaluar l'estructura genètica de les poblacions de *P. elephas* dins i entre les conques atlàntica i mediterrània i estudiar l'efecte de les diferents estructures oceanogràfiques

sobre aquesta estructuració utilitzant el conjunt de marcadors microsatèl·lit prèviament desenvolupat.

OBJECTIVES

- 1- To review phylogenetic inference methods with a special emphasis on inference from molecular sequence data. To point out the most relevant traits of methods such as maximum parsimony (MP), distance methods, maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI).
- 2- To provide new insights on the evolutionary relationships among Achelata lobsters using both slow and fast-evolving molecular markers, and to date the divergence time among taxa using the relaxed molecular clock.
- 3- To develop a genomic library from a specimen of the European spiny lobster *Palinurus elephas* in order to obtain a set of polymorphic microsatellite markers.
- 4- To compare genetic diversity levels and estimates of effective population size for the six known species of *Palinurus* using the microsatellite markers previously developed for *P. elephas*.
- 5- To ascertain the phylogenetic relationships between species of the genus *Palinurus* and to test among conflicting evolutionary hypotheses, using both the classic distance-based and the more recently developed coalescent-based Approximate Bayesian Computation (ABC) methods.
- 6- To study the phylogeography of the European spiny lobster using a portion of the COI gene as genetic marker and to analyse whether the present genetic variability and population structure of *P. elephas* is influenced by current and/or historical factors using *P. mauritanicus* as an outgroup.
- 7- To assess the genetic structure of *P. elephas* populations between and within Atlantic and Mediterranean basins and to study the effect of the different

oceanographic events on this structuring using the previously developed set of microsatellite markers.

3.- PUBLICACIONS

3.1. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències antigues als Achelata.

Publicació 1 Phylogenetic Inference Using Molecular Data

Publicació 2 Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata)

3.2. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències recents a *Palinurus*.

Publicació 3 Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*

Publicació 4 Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795

Publicació 5 Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus spp*) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data

3.3. Diversitat genètica i diferenciació en poblacions de llagosta vermella (*Palinurus elephas*) de l'Atlàntic i la Mediterrània.

Publicació 6 Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes

Publicació 7 Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population structure and conservation strategies of European spiny lobster

3.1. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències antigues als Achelata.

Publicació 1 Phylogenetic Inference Using Molecular Data

Publicació 2 Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters
(Crustacea, Decapoda, Achelata)

Inferència filogenètica a partir de dades moleculars.

En aquest treball revisem els diferents mètodes d'inferència filogenètica disponibles actualment, posant un èmfasi especial en la inferència a partir de dades moleculars. Es comença amb un comentari general sobre la inferència filogenètica utilitzant seqüències d'ADN, seguides per una declaració directa de la importància d'una bona alineació de seqüències. Llavors proporcionem una descripció general de diferents models d'evolució de seqüència, incloent-hi models evolutius que expliquen l'heterogeneïtat en la taxa de mutació al llarg de les seqüències d'ADN o una estructura secundària complexa (gens ribosomals). Es presenta una descripció global dels mètodes d'inferència més utilitzats, centrant-nos en conceptes clau d'interès general. Assenyalem els trets més característics de mètodes com la màxima parsimònia (MP), mètodes basats en matrius de distància, màxima versemblança (ML) i inferència Bayesiana (BI). Finalment, parlem de diferents mesures de suport per als nodes d'una reconstrucció filogenètica particular.

Publicació 1 (pàg. 27-49)

Palero, F. and K.A. Crandall (2009) Phylogenetic inference using molecular data. In: Decapod Crustacean Phylogenetics. Editors: Joel W. Martin, Keith A. Crandall, Darryl L. Felder. CRC / Taylor & Francis. ISBN: 9781420092585.

Relacions filogenètiques entre llagostes, castanyoles i llagostes dels esculls de corall (Crustacea, Decapoda, Achelata).

Les dades moleculars ens poden ajudar en la resolució d'hipòtesis evolutives en conflicte generades a partir de dades morfològiques i/o un registre fòssil incomplet. A més, la reconstrucció de relacions filogenètiques a partir de dades moleculars pot ajudar a traçar l'origen d'innovacions morfològiques que poden haver tingut un impacte essencial en la radiació d'un grup taxonòmic. En aquest treball, usem diferents seqüències de gens nuclears (18S, 28S i H3) i mitocondrials (16S i COI) obtingudes en un total de 35 espècies d'Achelata per a testar hipòtesis en conflicte i per resoldre els desacords taxonòmics. El conjunt combinat de dades moleculars recolza fortament la hipòtesi que Achelata és un grup monofilètic compost de dues famílies principals: Palinuridae i Scyllaridae. Es troba que Synaxidae és un grup polifilètic, que s'hauria d'incloure dins de Palinuridae. Conseqüentment, els nostres resultats indiquen que l'origen de l'òrgan estridulant hauria ocorregut només una vegada durant l'evolució dels Achelata. Finalment, les dues clades principals trobades dins dels Scyllaridae estarien d'acord amb inferències prèvies basades en dades morfològiques d'adults. La datació de la divergència dins d'Achelata obtinguda amb un model de rellotge relaxat és compatible amb les hipòtesis prèvies d'un origen Triàssic del grup Achelata.

Publicació 2 (pàg. 51-61)

Palero, F., Crandall, K.A., Abelló, P., Macpherson, E. and M. Pascual (2009) Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, 152–162.

3.2. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències recents a *Palinurus*.

Publicació 3 Isolation and characterization of microsatellite loci in
Palinurus elephas

Publicació 4 Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters
of the genus *Palinurus* Weber, 1795

Publicació 5 Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus spp*) as revealed by classic
and ABC methods using mtDNA and microsatellite data

Aïllament i caracterització de loci microsatèl·lit en *Palinurus elephas*.

Les captures de llagosta europea (*Palinurus elephas*) han patit una caiguda alarmant durant dècades recents tot al llarg de la seva àrea de distribució a causa d'una sobre-explotació incontrolada, cosa que fa d'aquesta espècie un objectiu directe per als plans de conservació. S'han aïllat un total de 164 loci microsatèl·lit a partir d'una genoteca de *P. elephas* enriquida per a repeticions CA, GA, CAA i GATA. Un total de 15 loci polimòrfic s'han genotipat en 48 individus. S'ha detectat un elevat nombre d'al·lels per locus (mitjana de 20 ± 10.5) i una heterozigositat observada alta (mitjana de 0.789 ± 0.197). Cap dels parells de loci no mostrava desequilibri de lligament significatiu. Dos del loci (Pael1 i Pael2) mostraven un desviament significatiu de l'equilibri Hardy-Weinberg a Sagres, mentre que Pael38 mostrava desviament significatiu a Tunis. Aquests marcadors altament polimòrfics seran útils per determinar els patrons espacials de diversitat genètica entre i dins de poblacions de *Palinurus elephas*.

Publicació 3 (pàg. 64-66)

Palero, F. and M. Pascual (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. *Molecular Ecology Resources* 8, 1477–1479.

Amplificació creuada i variabilitat genètica de microsatèl·lits en espècies de llagosta del gènere *Palinurus* Weber, 1795.

La majoria de les pesqueries de les llagostes del gènere *Palinurus* s'han sobreexplotat durant les darreres dècades, la qual cosa ha alçat una preocupació creixent per tal de dissenyar espais marins protegits (MPAs) per a aquest valuós recurs. Per dissenyar reserves marines eficaces, s'haurien de definir els patrons de connectivitat entre poblacions de llagosta, de forma que marcadors altament polimòrfics són necessaris. Recentment s'han desenvolupat un total de 13 microsatèl·lits en *Palinurus elephas*. En aquest treball utilitzem aquests marcadors per avaluar els nivells de diversitat genètica en poblacions de les sis espècies conegudes del gènere *Palinurus*. Els marcadors microsatèl·lits mostren polimorfisme en totes les espècies de *Palinurus*, amb valors de diversitat que varien de 0.650 ± 0.077 (*P. barbarae*) fins a 0.792 ± 0.051 (*P. elephas*). Conseqüentment, el conjunt de marcadors microsatèl·lit proposat és adequat per avaluar la diversitat genètica i analitzar l'estructura de poblacions en totes les espècies del gènere *Palinurus*. A més a més, quan tenim en compte la distribució en profunditat, es troba que les espècies d'aigües superficials tenen grandàries efectives major que els seus homòlegs d'aigua profunda. Per aquesta raó, les espècies d'aigua profunda serien més sensibles a la sobrepesca, i per tant, la sobreexplotació tindria un efecte a llarg termini molt més gran sobre la diversitat genètica en aquestes espècies.

TITLE: Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795

F. PALERO^{*(1,2)}, P. ABELLÓ⁽²⁾, E. MACPHERSON⁽³⁾, C. A. MATTHEE⁽⁴⁾ and M. PASCUAL⁽¹⁾

(1) Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain (2) Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Spain (3) Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CSIC), Carrer d'Accés a la Cala Sant Francesc 14, 17300 Blanes, Spain (4) Evolutionary Genomics Group, Department of Botany and Zoology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Matieland, Stellenbosch, 7602, South Africa.

KEY WORDS: Palinuridae, conservation, overfishing, effective population size

Corresponding author: FERRAN PALERO Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. FAX: 0034 934034420

e-mail: ferranpalero@ub.edu

Running title: Microsatellite variability in *Palinurus*

ABSTRACT

Most *Palinurus* spiny lobster fisheries have been overexploited during the last decades, and a growing concern on management decisions for this valuable resource has been raised. In order to design efficient marine reserves, connectivity patterns among spiny lobster populations should be defined, and neutrally-evolving, highly polymorphic, markers are needed. A total of 13 microsatellite DNA loci recently developed in *Palinurus elephas* were used to assess cross-species amplification and genetic diversity levels in the six known species of the genus *Palinurus*. Microsatellite markers showed polymorphism in every species, with gene diversity values varying from 0.650 ± 0.077 (*Palinurus barbarae*) to 0.792 ± 0.051 (*P. elephas*). Therefore, the proposed set of microsatellite markers was found to be suitable for genetic diversity assessment and population structure analysis in every *Palinurus* species. Most importantly, when depth distribution was taken into account, shallow water species of *Palinurus* were consistently found to have larger historical effective population sizes than their deep-water counterparts. For this reason, deep-water species could be more sensitive to overfishing, and a larger effect on the long-term genetic diversity of the species would be caused by overexploitation.

INTRODUCTION

The family Palinuridae Latreille, 1802, commonly known as spiny or rock lobsters, is one of the most commercially important groups of decapod crustaceans worldwide (FAO 2008). Palinurid lobsters are distinguished from the Nephropidae or true lobsters by their lack of chelae and their rostrum being absent or reduced to a single spine (Holthuis 1991). Adult spiny lobsters are epibenthic animals adapted for crawling and inhabiting holes and crevices of rocky and coralline habitats (Booth and Phillips 1994). They are long-lived crustaceans, with generally one reproductive season per year and a long incubation period after which the phyllosoma, a planktonic larval phase, emerges (Pollock 1995; Palero and Abelló 2007). The phyllosoma larva is a specialized form of zoea, particularly adapted to spending a long life in the open ocean (4–12 months; even two years in some Indo-Pacific species), where wide opportunities for both dispersal and retention via ocean currents exist (Booth 1997; Palero et al. 2008a). The phyllosoma larval period of spiny lobsters is followed by metamorphosis into a puerulus (decapodid) stage, which settles on the seafloor and moults into a juvenile spiny lobster (Guerao et al. 2006; Palero et al. 2008b). Finally, juveniles of some species have been shown to migrate long distances back to adult breeding grounds, and in the process would redress dispersal of larvae by ocean currents (Groeneveld and Branch 2002).

The genus *Palinurus* has six extant species and a restricted distribution (Holthuis 1991; Groeneveld et al. 2006a; Palero et al. 2008c). Three species occur in the northern hemisphere (*Palinurus elephas* Fabricius, 1787, *Palinurus mauritanicus* Gruvel, 1911, and *Palinurus charlestoni* Forest and Postel, 1964) and another three in the southern hemisphere (*Palinurus gilchristi* Stebbing, 1900, *Palinurus delagoae* Barnard, 1926 and *Palinurus barbarae* Groeneveld et al. 2006b). *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus* are distributed in the northeastern Atlantic and Mediterranean Sea while *P. charlestoni* is an endemic species from the Cape Verde Islands in the eastern central Atlantic (Zariquiey-Álvarez 1968; d’Udekem d’Acoz 1999). *Palinurus elephas* is found between 5 and around 200 m depth on rocky substrate with caves and crevices, *P. mauritanicus* is found preferentially between 300 and 600 m, on deep coral reefs and muddy substrates near

rocky outcrops, and *P. charlestoni* is found on steep rocky bottoms at 50-350 m depth (Abelló et al. 1988; Groeneveld et al. 2007). As for the southern hemisphere species, *P. gilchristi* is endemic to the south coast of South Africa, where it occurs between around 50 and 200 m, *P. delagoae* is a deeper water species (150-600 m) distributed from 17° S (Mozambique) to 32° S (eastern South Africa) and *P. barbarae* is found in steep broken rocks deeper than 100 m at Walters Shoals, Madagascar Ridge (Gopal et al. 2006; Groeneveld et al. 2006b).

All six species known in the genus are of present or potential commercial interest and most of them have been historically overexploited (Holthuis 1991; Groeneveld et al. 2006a). For example, some populations of *P. elephas* have been fished for human consumption since ancient Greek and Roman times (Apicius I AD). Most *Palinurus* species are currently targeted by trammel net and trap-fisheries (Palha de Sousa 2001) and can also be found as a minor by-catch in multi-species trawl fisheries (Fennessy and Groeneveld 1997). Increased levels of exploitation during the second half of the twentieth century had a great impact on population structure, reproductive potential and population size of exploited species of *Palinurus* (Hunter 1996; Groeneveld 2003). Therefore, a growing concern on management strategies for these valuable resources, such as designing marine protected areas (MPAs), has been raised (Follesa et al. 2007). *P. elephas* and *P. mauritanicus* have recently been included in ANNEX I of the SAC Priority species list for conservation (AdriaMed 2007). However, in order to design an efficient management policy of these species, connectivity patterns among spiny lobster populations should be defined and, therefore, neutrally-evolving, highly polymorphic markers are needed (Palumbi 2003).

About two decades ago, microsatellites were introduced as a novel molecular marker (Litt et al. 1989; Tautz 1989; Weber et al. 1989). This class of DNA evolves mostly under neutrality, and several thousand loci are typically present in eukaryotes (Schlötterer 2000). Microsatellites are also highly polymorphic nuclear loci that show great variability amongst others within marine species (DeWoody and Avise 2000). They have also been widely employed to solve population structuring on a wide range of

geographical levels (Carreras-Carbonell et al. 2006; Calderon et al. 2008). Different markers such as microsatellites and mtDNA sequence data sometimes yield different levels of genetic differentiation between populations, with microsatellites generally providing a higher power of statistical resolution due to their higher polymorphism (Estoup et al. 1998). Most importantly, their neutral behavior and the development of specific metrics to detect demographic changes makes microsatellites an appropriate molecular marker for genetic diversity assessment and past demography inference (Kimmel et al. 1998; Bos et al. 2008).

The present study aims to test the suitability of a set of microsatellite markers, recently developed from *Palinurus elephas*, for future intra-specific population structure analyses in other species of the genus *Palinurus*. This will allow for a comparison of genetic diversity estimates previously obtained using mitochondrial markers and estimates obtained using nuclear markers. Finally, estimates of historical effective population size will be compared for the six known species of *Palinurus* from the Eastern Atlantic and Western Indian Ocean.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples of *P. elephas* (n = 24; Western Mediterranean: Cullera), *P. mauritanicus* (n = 17; Atlantic waters: Morocco-Tanger), and *P. charlestoni* (n = 5; Cape Verde Islands: Ilha do Sal) were obtained directly from fisheries and fixed in ethanol. DNA was obtained from *P. gilchristi* (n = 20; South coast of South Africa; Tolley et al. 2005), *P. delagoae* (n = 20; S-KZN2 South Africa; Gopal et al. 2006) and *P. barbarae* (n = 18; Madagascar Ridge: Walters Shoals; Gopal et al. 2006). We used the polymorphic microsatellite loci isolated from *P. elephas* in Palero and Pascual (2008), with the exception of loci Pael1, Pael2 and Pael38, which were excluded because amplifications were poor and allele sizing misleading. An extra locus (Pael48) was included (EMBL Accession no. *****) that can be amplified with the forward primer 5'-ACTGGTGCAAGTCCCTTTTG-3' and the reverse primer 5'-GCTATCGGCAACAAGAACAAC-3' at 55°C annealing temperature. Multiplex PCR amplifications were carried out under conditions described in Palero and Pascual (2008). Amplified products of a total of 13 microsatellite markers were scored using an ABI 3700 automatic sequencer from the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona. Alleles were sized by PeakScanner™ software, with an internal size marker CST Rox 70–500 (BioVentures Inc.).

Genotypes were assigned for each individual based on allele size data. Mean number of alleles per locus, observed heterozygosity (Ho) and Nei's genetic diversity estimated using the average heterozygosity across all loci were computed using the Microsatellite Toolkit version 3.1 (Park 2001). Species sample size was standardized ($\hat{A}[n=5]$) before comparing allelic richness estimates among different species using rarefaction-based methods (Petit 1998). Allele distribution and frequency across species for each locus, and relationship between allelic richness and individual number in every species were also plotted using a modified version of the `allele.freq.plot()` and `allele.genotype.plot()` functions as implemented in `standArich_v1.00` (available at <http://www.ualg.pt/ccmar/maree/software.php>, F. Alberto, University of Algarve, Faro, Portugal). The software CONVERT v1.2 was employed to transform the spreadsheet-

based dataset into different formats to be run by other population genetic programs (Glaubitz 2004). F_{is} estimates according to Weir and Cockerham (1984) and probability tests of Hardy-Weinberg equilibrium based on Markov chain approaches (5000 iterations) were obtained using the GENEPOP package version 4.0.7 (Rousset 2008). Where multiple tests were involved, significance levels were adjusted according to the sequential Bonferroni procedure (Rice 1989). FreeNA was used for estimating null allele frequency at different loci (ENA method for estimating F_{ST} values; Chapuis and Estoup 2007). Pairwise F_{ST} values obtained with FreeNA were used to determine the degree of differentiation among species of *Palinurus*.

Estimating effective population size is particularly relevant for conservation studies since it interacts with selection to influence the fixation probabilities of deleterious mutations (Wright 1969). Furthermore, conservation of genetic variability is important to the health of populations because decreased genetic variability leads to increased levels of inbreeding and reduced fitness (Frankham 2003). In the present study, historical effective population size was directly estimated based on microsatellite heterozygosity using Ohta and Kimura's (1973) formula $N_e = (1/[1 - H_e]^2 - 1)/8\mu$ and assuming mutation rates (μ) from 1.16×10^{-4} to 7.11×10^{-5} mutations/locus/generation (Seyfert et al. 2008). The population parameter theta ($\theta = 4N_e\mu$) was also used to estimate historical effective size based on all 13 microsatellite loci. RoyChoudhury and Stephens (2007) have shown that the homozygosity estimator (θ_H) of Kimmel et al. (1998) is an accurate and unbiased estimator of the scaled population mutation rate. Consequently, we use this estimator of θ to calculate the historical effective population size using the above mutation rates.

The species under study may have undergone past changes in demography, such as a bottleneck, for which the genetic signature is still manifest (Tolley et al. 2005; Gopal et al. 2006). Therefore, two different microsatellite-based approaches were used to test for signatures of recent population changes in each species. First, we used the program BOTTLENECK ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1997), assuming an infinite allele model (IAM), a stepwise mutation model (SMM), or a two-phase model of mutation

(TPM, with 70% SMMs). BOTTLENECK can identify strong and very recent reductions in effective size by comparing heterozygosity from observed data to heterozygosity in a simulated population at neutral mutation–drift equilibrium (Pascual et al. 2001). The method of Luikart et al. (1998) was used to compare the distribution of allele frequencies observed in a population suspected to have undergone bottleneck to the distribution expected in a non-bottlenecked population (so-called mode-shift distortion). A Wilcoxon signed-rank test was used to determine if a statistically significant number of loci displayed a heterozygote excess compared to expectations based on the observed number of alleles.

Secondly, a metric analogous to the mismatch distribution but comparing the distribution of length differences among microsatellite alleles was also used to detect demographic changes in these species (Kimmel et al. 1998; King et al. 2000). We calculated the variance estimator (θ_v) and the homozygosity estimator (θ_H) from equations (14) and (15) of Kimmel et al. (1998). The difference in the natural logarithm of these estimators, averaged over all microsatellite loci, is the natural logarithm of the imbalance index ($\ln\beta$). This statistic relies on an imbalance between the allele size variance and heterozygosity to detect population growth (Bos et al. 2008). The imbalance index should be < 1 for expanding populations whose pre-expansion history is stable, but is characteristically > 1 in populations with a reduction in size that precedes a detectable growth phase. The $\ln\beta$ metric was chosen because of its power and ability to detect historic signals of population expansion (King et al. 2000). The analysis method of Kimmel et al. (1998) has been implemented in R and is available from the authors upon request.

RESULTS

All markers were found to be polymorphic in every tested species, with the exception of *Palinurus barbarae* (92.3%), for which no variability was found when analysed using the Pael10 locus (Fig. 1; supplementary data, S1). The mean allele number per locus varied from 4.92 ± 1.98 (*P. charlestoni*; n=5) to 11.38 ± 7.39 (*P. elephas*; n=24) (Table 1). However, even though a smaller mean number of alleles was found in *P. charlestoni* (probably due to the smaller sample size), this species presented the second largest allele richness (5.07) when sample size was standardized using rarefaction methods. Allele distribution and frequency across species for each locus indicates that allele size range is slightly larger in the northern hemisphere species (Fig. 1). The mean gene diversity over loci ($H_e = 0.721 \pm 0.010$) and the mean observed heterozygosity ($H_o = 0.601 \pm 0.009$) indicates high similar values across species (Table 1). In spite of this similarity, comparatively higher allele richness values were found in the shallow water species (*P. elephas*, *P. gilchristi* and *P. charlestoni*), than in the deeper water species (*P. mauritanicus*, *P. delagoae* and *P. barbarae*) (Table 1; Fig. 2).

Overall F_{is} value was similar for most species (mean $F_{is} = 0.179$) except for the very low value of *P. charlestoni* ($F_{is} = -0.067$) and the higher value found in *P. delagoae* ($F_{is} = 0.446$). Three loci presented high F_{is} values in all species (Pael31, Pael44 and Pael53) (supplementary data, S2). This result may be due to the presence of null alleles in these loci as indicated by the FreeNA analyses. However, genetic differentiation estimates did not vary significantly when using the raw dataset ($F_{ST} = 0.1542$) or when correcting for the presence of null alleles ($F_{ST} = 0.1451$), which indicates that presence of null alleles is not particularly high and has little effect on global differentiation estimates. The lowest F_{ST} values were found in pairwise comparisons between the Southern Hemisphere species (Table 2). Significant F_{ST} values were found in comparisons between all species pairs.

Historical effective population sizes estimated using Ohta and Kimura's (1973) formula ranged from 8,000 to 59,000 depending on the species (Table 3). Larger historical effective population sizes were found in *P. elephas*, *P. gilchristi* and *P.*

charlestoni, while smaller sizes were consistently found in *P. mauritanicus*, *P. delagoae* and *P. barbarae*. The same pattern and almost identical values were found when effective population sizes were estimated using the homozygosity estimator (θ_H) of Kimmel et al. (1998) (Table 3). In all species but *P. charlestoni*, observed heterozygosity values were lower than heterozygosity values expected under the different mutation models (Fig. 3).

Wilcoxon signed-rank one-tail tests did not identify any recent demographic changes for *Palinurus* species when the TPM model was assumed. However, significant heterozygote excess, indicating a recent bottleneck, was found in *P. elephas* (P=0.013) and *P. gilchristi* (P=0.001) when the IAM model was assumed, and heterozygote deficiency, indicating a recent population expansion, was found in all deep-water species *P. mauritanicus* (P=0.040), *P. delagoae* (P=0.047) and *P. barbarae* (P=0.032), when the SMM model was assumed. When the full dataset (13 microsatellites) was used, the observed values for the variance estimator (θ_V) were particularly high for *P. gilchristi* and *P. barbarae* (data not shown). A detailed examination of the variance estimator (θ_V) values obtained for each locus indicated a large effect of the locus Pael44, which is the only imperfect microsatellite analysed and which therefore had a repeat mutation step of just 1bp. When locus Pael44 was excluded from the analysis, the variance estimator (θ_V) presented similar values for every species of *Palinurus* (Table 4). In all cases, the imbalance index (β) was > 1 , which is typical in populations with a reduction in size that precedes a detectable growth phase.

DISCUSSION

The present study indicates that microsatellites developed for *Palinurus elephas* give successful amplification in every known *Palinurus* species, with all of them being polymorphic in every tested species with the exception of *P. barbarae*. Previous studies in marine fish had indicated a significant negative relationship between phylogenetic distance and microsatellite amplification success, estimated as proportion of amplified loci (Carreras-Carbonell et al. 2008). Interestingly, Groeneveld et al. (2007) recently found that the largest mtDNA sequence divergence between two *Palinurus* species (8.24%) was between *P. elephas* in the Atlantic and *P. barbarae* in the Indian Ocean. This pattern of lower amplification success with larger phylogenetic distance could also explain the higher number of null alleles found in the southern hemisphere species for some *Palinurus elephas* microsatellite loci. Interspecific comparisons of microsatellite loci have previously shown that loci are more variable in the species from which they are derived (focal species) than are homologous loci in other (non-focal) species (Forbes et al. 1995; Rubinsztein et al. 1995). Analysing two *Drosophila* species using microsatellite data, Hutter et al. (1998) showed that this can be due to an ascertainment bias during the cloning and locus selection processes, with heterozygosity and number of alleles being significantly higher in the focal species than in the nonfocal species (but see also Amos et al. 2003).

The amount of variability, gene diversity measures and F_{is} values found in *Palinurus* species using microsatellite markers are similar to those found in other marine decapod crustaceans (Robainas et al. 2002; Urbani et al. 1998; Yap et al. 2002). Despite the differences in sample size for the species included in the present study, rarefaction-based methods allowed the comparison of allelic richness values among *Palinurus* species (Fig. 2). Generally, widespread species tend to have higher levels of genetic diversity than rare, endemic, and otherwise geographically restricted species (Avisé and Hamrick 1996; Cole 2003). Contradicting this trend, *P. charlestoni* showed the second highest genetic diversity values (Table 1). In fact, the trend found in the present study was for allelic richness and heterozygosity to be consistently higher in shallow water

species than in their deep water counterparts regardless of the number of genotypes analysed (Fig. 2). Estimated historical effective population size values for shallow water species generally double those of deep water congeners (Table 3), and therefore, lower genetic diversity in *P. mauritanicus*, *P. delagoae* or *P. barbarae* could be due to populations being smaller in deep water than in shallower water species. However, ascertainment bias causing this pattern cannot be excluded and it should be pointed out that genetic distances were smaller between *P. elephas* and both *P. charlestoni* and *P. gilchristi* when analysed using mtDNA data (Groeneveld et al. 2007).

Population genetics theory suggests that only very small populations suffer significant loss of genetic diversity, with minimum effective population sizes (N_e) required to maintain genetic diversity being about 50-500 individuals (Ellstrand and Elam 1993). For marine fisheries, even “collapsed” stocks usually have census sizes (N) of several million individuals so that there is generally little concern about the genetic diversity of exploited species, even though the effects of overfishing on species diversity and abundance are well documented (Hutchings 2000; Law 2007). Nevertheless, most marine organisms are characterized by type III survivorship curves, with a combination of high fecundity and high juvenile mortality, and such life-history traits generate a very high variance in reproductive success, which can depress N_e substantially and cause extremely low N_e/N ratios (Hedgecock 1994). For example, N_e can be several orders of magnitude smaller than census size in marine fishes, producing N_e/N ratios varying from 10^{-5} to 10^{-3} (Hauser et al. 2002; Turner et al. 2002). Therefore, many exploited marine stocks may be in danger of losing genetic variability, despite their large spawning stock biomasses.

The phylogeography of several species included in the genus *Palimurus* has been recently addressed using mitochondrial genes such as CR and COI (Tolley et al. 2005; Gopal et al. 2006; Palero et al. 2008c). In all cases, mtDNA presented fairly high haplotype diversity levels with the presence of one or a few abundant haplotypes and a large number of closely related haplotypes (Tolley et al. 2005; Gopal et al. 2006; Palero et al. 2008c). Such a pattern of haplotype distribution could indicate the presence of a

genetic bottleneck caused by demographic fluctuations shaping genetic variation (Harpending 1994). However, selection acting on the mtDNA molecule would also cause the present day haplotypes to coalesce at a recent time (Stephens 2007). If mtDNA genetic diversity patterns are shaped by selection, a more complete understanding of the genetic diversity distribution found in these species will be gained using neutral nuclear markers. As for the inference of recent changes in demography for which the genetic signature is still manifesting, the program BOTTLENECK did not provide conclusive results for any of the species analysed. Nevertheless, all *Palinurus* species showed some sign of bottleneck when using Kimmel et al. (1998) method, in agreement with the mtDNA studies. It is not surprising to get this bottleneck signal in all species analysed, since computer simulations indicate that if the population experiences a bottleneck preceding expansion, there will be a long (e.g., several thousand generations) time period during which $b(t) > 1$ before showing the signature of expansion alone [$b(t) < 1$]. Therefore, this signal of demographic change does not mean that the effect of selection on mtDNA should be discarded.

The comparison between shallow and deep water congeners using mtDNA showed deep water species to have higher haplotype diversity levels than their shallower water counterparts (Table 1). If only demographic factors were shaping the distribution of genetic diversity of a species, we would expect the same effect on different markers, either mitochondrial or nuclear loci. However, species with higher gene diversity for microsatellite markers (shallow water species) were the ones that showed a lower haplotype diversity value when using mtDNA sequence data. A likely cause for the observed pattern would be that selection on mtDNA has been stronger in shallower water species, since deep-water environments tend to be more stable regarding temperature variation. Thus, selective sweeps would make mtDNA diversity values to be smaller in shallow water species in spite of their larger historical effective population sizes as indicated by nuclear markers (Bazin et al. 2006).

In conclusion, it has been confirmed that microsatellite markers developed for *Palinurus elephas* give successful amplification and show polymorphism for every

known *Palinurus* species and thus can be used in future studies inferring the population structure of all these species. Most importantly, it was found that deep-water species present lower historical effective population sizes compared to their shallow water counterparts. Therefore, deep-water species could be more sensitive to overexploitation and, consequently, overfishing would have a much larger long-term effect on the genetic diversity of these species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study could not have been carried out without the willing help of those listed below in collecting spiny lobster specimens and providing helpful information and discussions: J Gironès, E Palero, N Pascual and D Díaz. This work was supported by a pre-doctoral fellowship awarded by the Autonomous Government of Catalonia to FP (2006FIC-00082). Research was funded by projects CGL2006-13423, CTM2004-05625 and CTM2007-66635 from the Ministerio de Educación y Ciencia and 119/2003 from the Spanish Ministerio de Medio Ambiente. The authors are part of the research groups 2005SGR-00191, 2005SGR-00277 and 2005SGR-00995 of the Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAPHY

Abelló P, Valladares FJ, Castellon A (1988) Analysis of the structure of decapod crustacean assemblages off the Catalan coast (North-West Mediterranean). *Mar Biol* 98: 39-49.

AdriaMed (2007) Some considerations on the concept and on criteria for defining "priority species" for fishery assessment and management purposes in the GFCM area. FAO-AdriaMed Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea.

Amos W, Hutter C, Schug M, Aquadro CF (2003) Directional evolution of size coupled with ascertainment bias for variation in *Drosophila* microsatellites. *MBE* 20: 660-662.

Apicius (1936) *Cookery and Dining in Imperial Rome*.

Avise JC (2004) *Molecular Markers. Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.

Avise JC, Hamrick JL (1996) *Conservation genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York.

Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312: 570-572.

Booth JD (1997) Long-distance movements in *Jasus spp.* and their role in larval recruitment. *Bull Mar Sci* 61: 111-128.

Booth JD, Phillips BF (1994) Early life history of spiny lobster. *Crustaceana* 66: 271-294.

Bos DH, Gopurenko D, Williams RN, DeWoody A (2008) Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution* 62: 1458-1468.

Calderón I, Ortega N, Duran S, Becerro M, Pascual M, Turon X (2007) Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Mol Ecol* 16: 1799-1810.

Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2006) Population structure within and between subspecies of the Mediterranean triplefin fish *Tripterygion delaisi* revealed by highly polymorphic microsatellite loci. *Mol Ecol* 15: 3527-3539.

Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2008) Utility of pairwise mtDNA genetic distances for predicting cross-species amplification and polymorphism success in fishes. *Conserv Genet* 9: 181-190.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *MBE* 24: 621-631.

Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 213-237.

Cornuet JM, Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* 56: 461-473.

Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 24: 217-242.

Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriamanga M, Guyomard R (1998) Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol Ecol* 7: 339-353.

FAO (2008) Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series (version 2.32) with the dataset "Capture production 1950-2006": Web-site at <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp>.

Fennessy ST, Groeneveld JC (1997) A review of the offshore trawl fishery for crustaceans on the east coast of South Africa. *Fisheries Manag Ecol* 4: 135-147.

Follesa MC, Cuccu D, Cannas R, Sabatini A, Cau A (2007) Emigration and retention of *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) in a central western Mediterranean marine protected area. *Sci Mar* 71: 279-285.

Frankham R (2003) Genetics and Conservation Biology. *CR Biol* 326: S22-S29.

Glaubitz J (2004) CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol* 4: 309-310.

Gopal K, Tolley K, Groeneveld J, Matthee C (2006) Mitochondrial DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the southwestern Indian Ocean. *MEPS* 319: 191-198.

Groeneveld J, Gopal K, George R, Matthee C (2007) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (Decapoda : Palinuridae) with hypotheses on speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean. *MPE* 45: 102-110.

Groeneveld JC (2003) Under-reporting of catches of South Coast rock lobster *Palinurus gilchristi*, with implications for the assessment and management of the fishery. *Afr J Mar Sci* 25: 407-411.

Groeneveld JC, Branch GM (2002) Long-distance migration of South African deep-water rock lobster *Palinurus gilchristi*. *MEPS* 232: 225-238.

Groeneveld JC, Goni R, Latrouite D (2006) Lobsters of commercial importance: *Palinurus* species. In: Phillips BF (ed) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. Blackwell, Scientific Publications, Oxford.

Groeneveld JC, Griffiths CL, van Dalsen AP (2006) A new species of spiny lobster, *Palinurus barbarae* (Decapoda, Palinuridae) from Walters Shoals on the Madagascar Ridge. *Crustaceana* 79: 821-833.

Guerao G, Díaz D, Abelló P (2006) Morphology of puerulus and post-puerulus stages of the spiny lobster *Palinurus mauritanicus* (Decapoda: Palinuridae). *JCB* 26: 480-494.

Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol*: 591–600.

Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *PNAS* 99: 11742-11747.

Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: Beaumont AR (ed) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman & Hall, London.

Holthuis LB (1991) FAO species catalogue. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date. FAO Fisheries Synopsis: 125.

Hunter E, Shackley SE, Bennett DB (1996) Recent studies on the crawfish *Palinurus elephas* in South Wales and Cornwall. JMBA 76: 963-983.

Hutchings JA (2000) Collapse and recovery of marine fishes. Nature 406: 882-885.

Hutter C, Schug M, Aquadro C (1998) Molecular variation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: a reciprocal test of the ascertainment bias hypothesis. MBE 15: 1620-1636.

Kimmel M, Chakraborty R, King JP, Bamshad M, Watkins WS, Jorde LB (1998) Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. Genetics 148: 1921-1930.

King JP, Kimmel M, Chakraborty R (2000) A power analysis of microsatellite-based statistics for inferring past population growth. MBE 17: 1859-1868.

Langergraber KE, Siedel H, Mitani JC, Wrangham RW, Reynolds V, Hunt K, Vigilant L (2007) The Genetic Signature of Sex-Biased Migration in Patrilocality in Chimpanzees and Humans. PLoS ONE 2: e973.

Law R (2007) Fisheries-induced evolution: present status and future directions. MEPS 335: 271-277.

Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44: 397-401.

Luikart G, Allendorf F, Cornuet J, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. J Heredity 89: 238-247.

Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genet Res 22: 201-204.

Palero F, Abelló P (2007) The first phyllosoma stage of *Palinurus mauritanicus* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). Zootaxa 1508: 49-59.

Palero F, Guerao G, Abello P (2008a) Morphology of the final stage phyllosoma larva of *Scyllarus pygmaeus* (Crustacea: Decapoda: Scyllaridae), identified by DNA analysis. JPR 30: 483-488.

Palero F, Guerao G, Clark PF (2008b) *Palinustus mossambicus* Barnard 1926 (Crustacea: Decapoda: Achelata: Palinuridae); morphology of the puerulus stage. *Zootaxa* 1857: 44-54.

Palero F, Abelló P, Macpherson E, Gristina M, Pascual M (2008c) Phylogeography of the european spiny lobster (*Palinurus elephas*): influence of current oceanographical features and historical processes. *MPE* 48: 708-717.

Palero F, Pascual M (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. *Mol Ecol Resources* 8: 1477-1479.

Palha de Sousa B (2001) Fishery for the deep-water spiny lobster *Palinurus delagoae* in Mozambique, 1980 to 1999. *Mar Fresh Res* 52: 1535-1540.

Palumbi S (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S146-S158.

Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin, Dublin.

Pascual M, Aquadro CF, Soto V, Serra L (2001) Microsatellite variation in colonizing and Palearctic populations of *Drosophila subobscura*. *MBE* 18: 731-740.

Petit RJ, El mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12: 844-855.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.

Robainas A, Monnerot M, Solignac M, Dennenbouy N, Espinosa G, Machado EG (2002) Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). *Mol Ecol Notes* 2: 344-345.

Robertson A, Hill WG (1984) Deviations from hardy-weinberg proportions: Sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources* 8: 103-106.

Roychoudhury A, Stephens M (2007) Fast and accurate estimation of the population-scaled mutation rate, from microsatellite genotype data. *Genetics* 176: 1363-1366.

Rubinsztein D, Leggo J, Amos W (1995) Microsatellites evolve more rapidly in humans than in chimpanzees. *Genomics* 30: 610-612.

Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.

Seyfert AL, Cristescu MEA, Frisse L, Schaack S, Thomas WK, Lynch M (2008) The Rate and Spectrum of Microsatellite Mutation in *Caenorhabditis elegans* and *Daphnia pulex*. *Genetics* 178: 2113-2121.

Stephens M (2001) Inference under the coalescent theory. In: Balding DJ, Bishop M, Cannings C (eds) *Handbook of statistical genetics*. John Wiley and Sons, West Sussex, UK.

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *NAR* 17: 6463-6471.

Tolley K, Groeneveld J, Gopal K, Mathee C (2005) Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. *MEPS* 297: 225-231.

Turner TF, Wares JP, Gold JR (2002) Genetic effective size is three order of magnitude smaller than adults census size in an abundant, estuarine-dependant marine fish (*Scianops ocellatus*). *Genetics* 162: 1329-1339.

Udekem d'Acoz C (1999) Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. *Patrimoines naturels (M.N.H.N./S.P.N.)*.

Urbani N, Sevigny JM, Sainte-Marie B, Zadworny D, Kuhnlein U (1998) Identification of microsatellite markers in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Mol Ecol* 7: 357-358.

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.

Weir BS, Cockerham A (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wright s (1969) *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 2: The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.

Yap ES, Sezmis E, Chapin JA, Potter IC, Spencer PBS (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae). Mol Ecol Notes 2: 30-32.

Zariquiey Alvarez R (1968) Crustaceos decapodos ibèricos. ICM-CSIC, Barcelona.

Figure Legends.

Fig 1 Allele frequency distributions across species and locus.

Fig 2 Relationship between allelic richness (\hat{A}) and number of genotypes in a sample. Each line represents a different species. Each point in the line is the mean of all replicates for sub-samples of size x obtained using rarefaction methods.

Fig 3 Expected heterozygosity values under an infinite allele model (IAM), a stepwise mutation model (SMM), or a two-phase model of mutation (TPM, with 70% SMMs). In all species but for *P. charlestoni*, observed heterozygosity values were lower than expected heterozygosity values under the different mutation models.

Fig 1

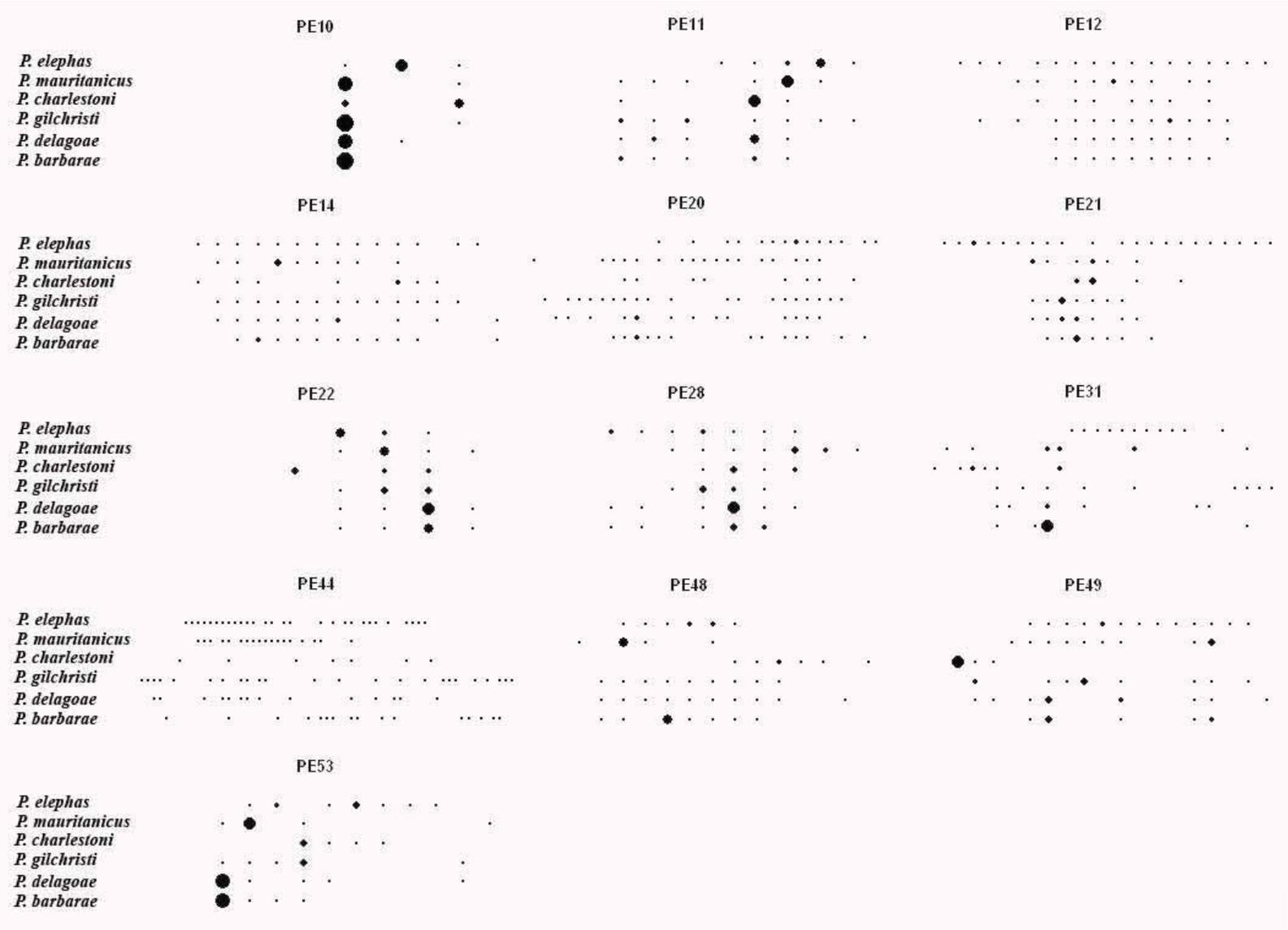


Fig 2

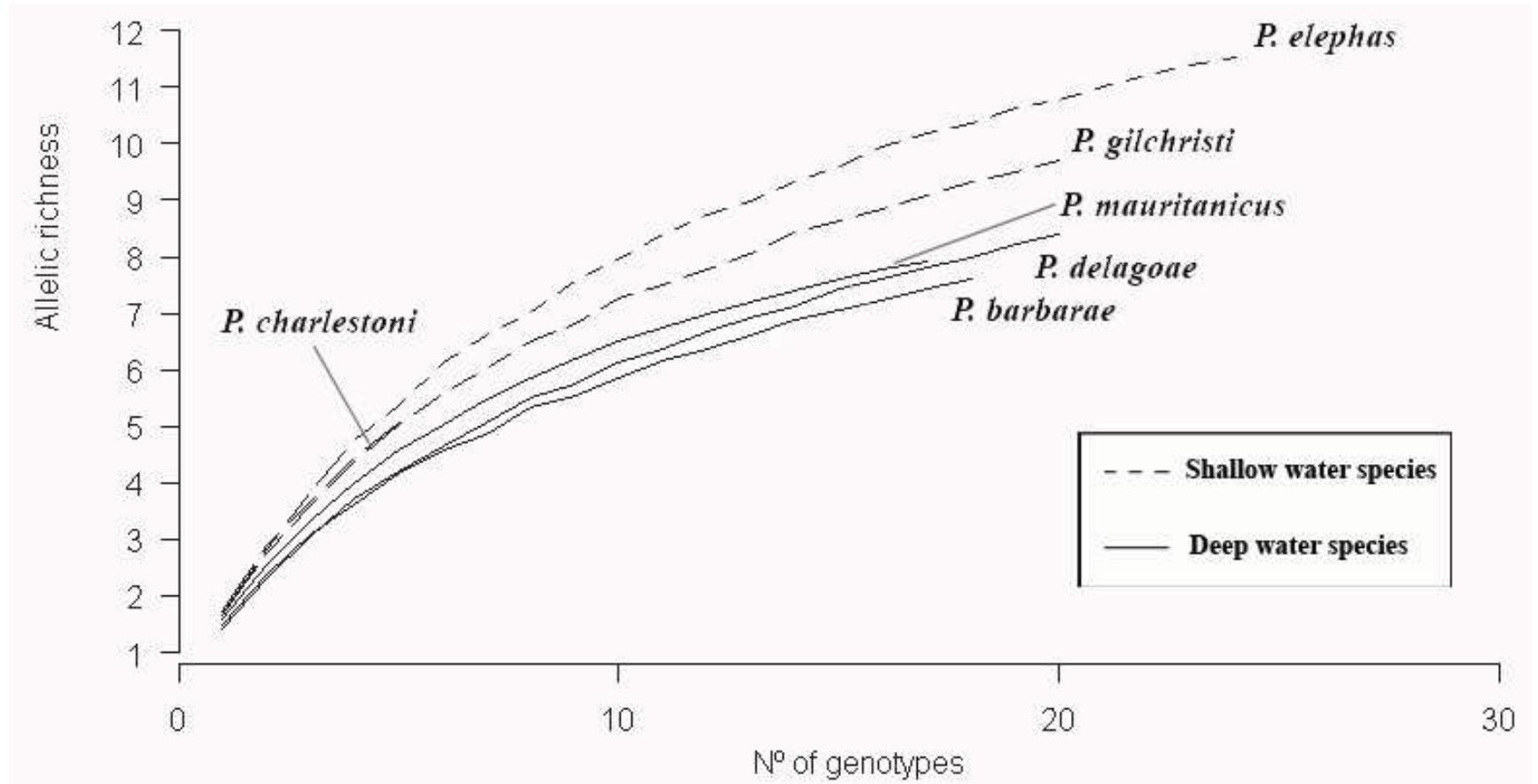


Fig 3

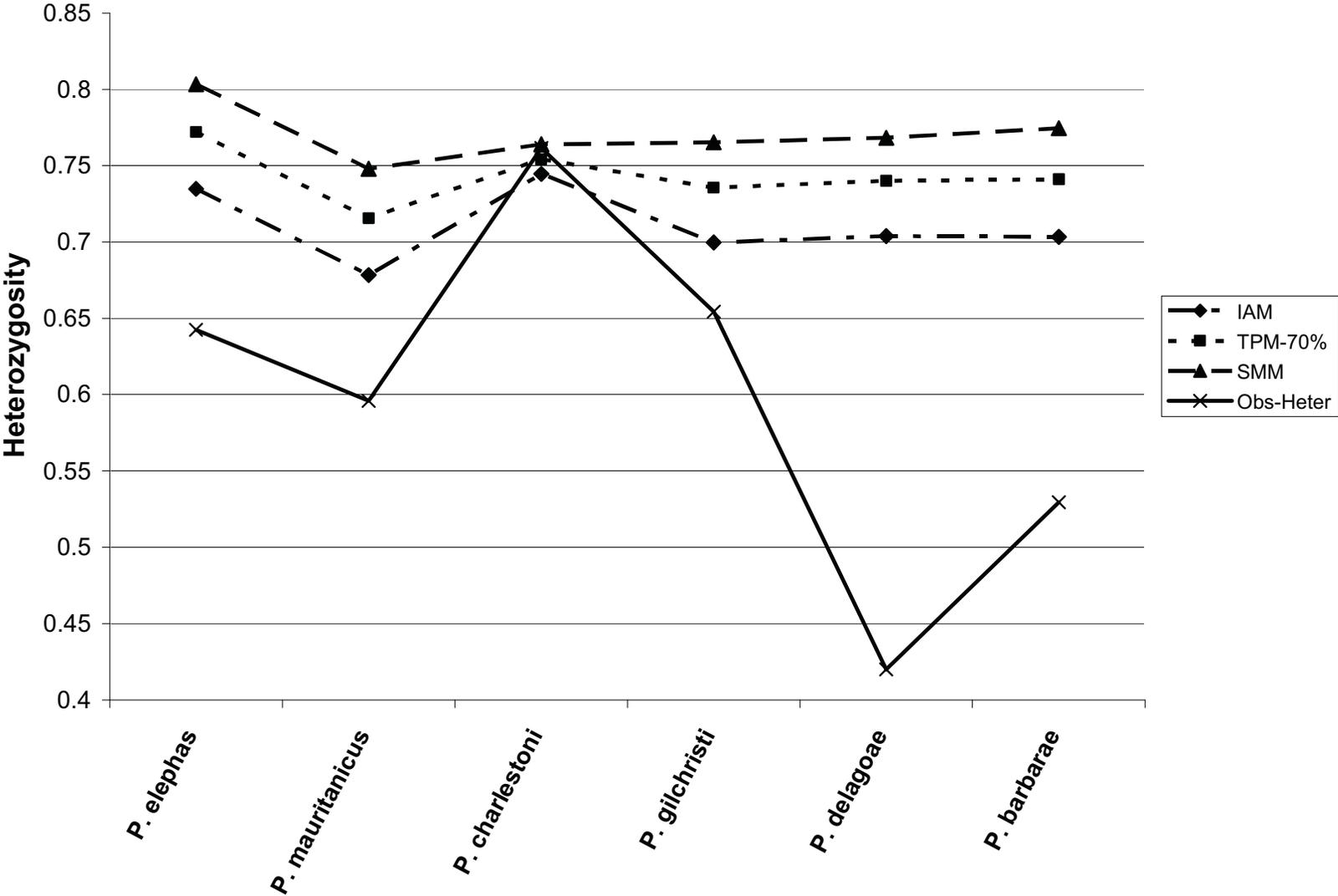


Table 1 Diversity measures for each species of *Palinurus*.

Species	Sample size (individuals)	MNA \pm sd	Ho \pm sd	Gene diversity \pm sd	Allelic richness \pm sd	mtDNA diversity (source)
<i>P. elephas</i>	24	11.38 \pm 7.39	0.642 \pm 0.027	0.792 \pm 0.05	5.40 \pm 0.28	0.603 Palero et al., 2008
<i>P. mauritanicus</i>	17	7.69 \pm 4.82	0.596 \pm 0.034	0.682 \pm 0.06	4.56 \pm 0.27	0.905 Palero et al., 2008
<i>P. charlestoni</i>	5	4.92 \pm 1.98	0.762 \pm 0.054	0.762 \pm 0.05	5.08 \pm 0.00	0.800 Groeneveld et al., 2007
<i>P. gilchristi</i>	20	9.38 \pm 6.34	0.654 \pm 0.030	0.759 \pm 0.07	5.00 \pm 0.26	0.858 Tolley et al., 2005
<i>P. delagoae</i>	20	7.62 \pm 3.50	0.420 \pm 0.033	0.683 \pm 0.07	4.18 \pm 0.24	0.977 Gopal et al., 2006
<i>P. barbarae</i>	18	7.00 \pm 4.20	0.529 \pm 0.035	0.650 \pm 0.08	4.09 \pm 0.30	0.960 Gopal et al., 2006

MNA: Mean number of alleles; Ho: Observed heterozygosity.

Table 2 Fst values among species pairs before (below diagonal) and after (above diagonal) correcting for the presence of null alleles using the ENA method (Chapuis and Estoup, 2007).

	<i>P. elephas</i>	<i>P. mauritanicus</i>	<i>P. charlestoni</i>	<i>P. gilchristi</i>	<i>P. delagoae</i>	<i>P. barbarae</i>
<i>P. elephas</i>	-	0.165	0.165	0.143	0.170	0.211
<i>P. mauritanicus</i>	0.179	-	0.184	0.125	0.163	0.182
<i>P. charlestoni</i>	0.166	0.191	-	0.138	0.138	0.197
<i>P. gilchristi</i>	0.151	0.128	0.129	-	0.074	0.096
<i>P. delagoae</i>	0.197	0.182	0.135	0.085	-	0.028
<i>P. barbarae</i>	0.221	0.191	0.188	0.094	0.023	-

Table 3 Historical effective population sizes in *Palinurus* species as estimated both from Ohta and Kimura's (1973) formula and from the homozygosity estimator (θ_H) of Kimmel et al. (1998).

	Range Ne (Ohta and Kimura, 1973)	Range Ne (θ_H)
<i>P. elephas</i>	35,011 - 57,121	36,220 - 59,094
<i>P. mauritanicus</i>	12,876 - 21,007	10,028 - 16,361
<i>P. charlestoni</i>	25,033 - 40,842	13,539 - 22,088
<i>P. gilchristi</i>	28,105 - 45,854	20,977 - 34,223
<i>P. delagoae</i>	13,819 - 22,546	9,973 - 16,271
<i>P. barbarae</i>	11,011 - 17,964	7,696 - 12,555

Table 4 Estimates of the imbalance index for *Palinurus* species. The imbalance index relies on an imbalance between the allele size variance and heterozygosity to detect population growth (Bos et al. 2008) and is characteristically > 1 in populations with a reduction in size that precedes a detectable growth phase. Estimates obtained using 12 microsatellite markers (excluding Pael44).

	<i>P. elephas</i>	<i>P. mauritanicus</i>	<i>P. charlestoni</i>	<i>P. gilchristi</i>	<i>P. delagoae</i>	<i>P. barbarae</i>
theta.variance (θ_V)	23.654	23.350	27.459	33.130	25.662	21.900
mean.homozigosity (P_o)	0.164	0.303	0.257	0.215	0.305	0.343
theta.homozigosity (θ_H)	18.031	4.951	7.087	10.318	4.879	3.739
imbalance index (β)	1.312	4.716	3.875	3.211	5.259	5.857
ln.imbalance ($\ln\beta$)	0.271	1.551	1.354	1.167	1.660	1.768

Supplementary data.

S1 Gene diversity values obtained for each locus using the program BOTTLENECK ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996).

	<i>P. elephas</i>	<i>P. mauritanicus</i>	<i>P. charlestoni</i>	<i>P. gilchristi</i>	<i>P. delagoae</i>	<i>P. barbarae</i>
PE10	0.351	0.166	0.533	0.050	0.097	-
PE11	0.634	0.494	0.378	0.789	0.645	0.733
PE12	0.937	0.882	0.933	0.867	0.883	0.870
PE14	0.926	0.757	0.911	0.918	0.869	0.902
PE20	0.865	0.954	0.956	0.959	0.883	0.918
PE21	0.918	0.765	0.711	0.722	0.774	0.743
PE22	0.520	0.568	0.714	0.603	0.520	0.542
PE28	0.821	0.770	0.778	0.701	0.500	0.703
PE31	0.899	0.803	0.929	0.868	0.864	0.517
PE44	0.964	0.938	0.933	0.969	0.956	0.960
PE48	0.794	0.570	0.889	0.879	0.881	0.694
PE49	0.882	0.775	0.511	0.776	0.709	0.661
PE53	0.782	0.405	0.733	0.765	0.323	0.223

S2 Fis estimates according to Weir and Cockerham (1984) and probability tests of Hardy-Weinberg equilibrium based on Markov chain iterations. Significant Fis values are indicated in bold characters.

	<i>P. elephas</i>	<i>P. mauritanicus</i>	<i>P. charlestoni</i>	<i>P. gilchristi</i>	<i>P. delagoae</i>	<i>P. barbarae</i>
PE10	0.172	0.652	-0.600	-	1.000	-
PE11	0.414	0.292	-0.067	0.444	0.664	0.644
PE12	-0.023	-0.069	-0.081	-0.040	-0.075	-0.023
PE14	0.148	-0.103	0.135	-0.092	0.091	0.064
PE20	0.250	0.077	0.180	0.222	0.433	0.127
PE21	0.095	0.079	-0.143	-0.112	0.257	-0.126
PE22	0.605	0.422	-0.500	-0.139	0.214	0.081
PE28	-0.016	-0.072	-0.333	0.075	0.406	0.134
PE31	0.132	0.241	0.500	0.267	0.821	0.533
PE44	0.313	0.317	0.385	0.299	0.590	0.529
PE48	0.164	-0.032	-0.143	-0.083	0.210	0.204
PE49	0.056	0.170	-0.200	0.034	0.544	0.022
PE53	0.419	0.279	0.200	0.744	0.643	-0.058
All Loci	0.210	0.173	-0.067	0.135	0.446	0.178

Radiació ràpida en llagostes (*Palinurus spp.*) revelada mitjançant metodologia clàssica i mètodes ABC a partir de dades de loci mitocondrials i microsatèl·lits.

Les eines moleculars poden ajudar a descobrir processos d'especiació recents i fins i tot encara en marxa en una àmplia varietat de taxa, de forma que ens proporcionen pistes sobre els mecanismes, ritme i geografia dels processos d'especiació en organismes marins. El gènere de llagostes *Palinurus* té una distribució particular amb dos grups de tres espècies cadascun presents en el Nord-Est Atlàntic (*P. elephas*, *P. mauritanicus* i *P. charlestoni*) i el Sud-Oest de l'Índic i el Sud-Est de l'Atlàntic (*P. gilchristi*, *P. delagoae* i *P. barbarae*). En aquest estudi, obtenim una comprensió més completa de les relacions filogenètiques entre aquestes espècies, testant entre hipòtesis en conflicte, tant pel que fa a la taxa de mutació, com a la topologia dels arbres utilitzant els mètodes d'ABC i analitzant un conjunt de dades combinant marcadors nuclears (microsatèl·lits) i mitocondrials. Les nostres anàlisis donen suport a un patró d'especiació Nord-Sud a *Palinurus*, amb totes les espècies sudafricanes formant una clada monofilètica. Curiosament, els temps de divergència obtinguts per a les espècies de *Palinurus* amb les taxes de mutació estàndards, concorden bé amb els processos relacionats amb glaciacions ocorreguts durant els darrers 2 My.

TITLE: Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus* spp) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data.

F. PALERO^{*(1,2,4)}, J. LOPES⁽⁴⁾, P. ABELLÓ⁽²⁾, E. MACPHERSON⁽³⁾, M. PASCUAL⁽¹⁾ and M. BEAUMONT⁽⁴⁾

(1) Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain (2) Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Spain (3) Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CSIC), Carrer d'Accés a la Cala Sant Francesc 14, 17300 Blanes, Spain (4) School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 228, Reading RG6 6AJ, United Kingdom

KEY WORDS: Palinuridae, vicariance, coalescence time, marine speciation

Corresponding author: FERRAN PALERO Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. FAX: 0034 934034420

e-mail: ferranpalero@ub.edu

Running title: ABC and speciation in *Palinurus* lobsters

ABSTRACT

Molecular tools may help to uncover closely related and still diverging species from a wide variety of taxa and provide insight into the mechanisms, pace and geography of marine speciation. The spiny lobster genus *Palinurus* has a particular distribution with two groups of three species each present in the Northeastern Atlantic (*P. elephas*, *P. mauritanicus* and *P. charlestoni*) and Southeastern Atlantic and Southwestern Indian Oceans (*P. gilchristi*, *P. delagoae* and *P. barbarae*). In the present study, we obtain a more complete understanding of the phylogenetic relationships among these species, by testing among conflicting hypotheses on both the mutation rate and tree topology by using the recently developed ABC methods and analyzing a combined dataset with both nuclear and mitochondrial markers. Our analyses support a North-to-South pattern of speciation in *Palinurus* with all the South-African species forming a monophyletic clade. Interestingly, divergence times obtained for *Palinurus* species using the combined mtDNA-microsatellites dataset and standard mutation rates for mtDNA agree with known glaciation-related processes during the last 2My.

INTRODUCTION

The high dispersal potential of planktonic larvae usually results in genetic homogeneity over large distances in marine species, unless local adaptation or oceanographic barriers counteract this dispersal (Lessios et al., 2006). Because of such dispersal potential, ranges of marine organisms have frequently been considered to be vast, even though marine species can also exhibit cryptic speciation and fine-scale endemism (Knowlton 1993; Meyer et al., 2005). In fact, despite a supposed random mixing of larvae, large contact zones in apparently continuous sea regions have been found to sustain genetic differences (Gardner 1997). In most cases it is not clear if such differences are due to an ongoing process of sympatric speciation or correspond to secondary contact after allopatric divergence (Butlin et al., 2008). Allopatric speciation in marine organisms is mainly thought of a vicariance process, where a species' geographic range becomes fragmented following changes in oceanographic conditions or the disconnection of populations by lower sea levels, with a consequently divergence due to genetic drift (Barber et al., 2002). However, allopatric speciation could be also result from a founder effect, where a new population is established by a small number of individuals, often by long-distance dispersal, with subsequent restricted gene flow leading to speciation (Ridley, 1993).

Spiny lobsters (Palinuridae Latreille, 1802) are one of the most commercially significant groups of decapod crustaceans, with large and important fisheries worldwide (Holthuis, 1991; FAO, 2008). Palinurid lobsters are long-lived benthic scavengers generally found near rocky habitats, even though they are considered key predators in a variety of habitats (Phillips et al., 1980). The most striking feature of these lobsters is their flat-bodied crystalline larval phase, the phyllosoma larva, which is specially adapted for dispersal in oceanic waters (Booth, 1994; Palero and Abelló, 2007). The phyllosoma larva has a long planktonic life (up to 24 months) before metamorphosing into the puerulus stage, which is the transitional stage from planktonic to a benthic existence (Diaz et al., 2001; Palero et al. 2008a). Since it is generally assumed that such a long planktonic larval duration (PLD) should promote high levels of gene flow and effectively

counterbalance the speciation process (Avice, 2000; Coyne and Orr, 2004), life history traits make spiny lobsters a suitable model for better understanding the speciation process in marine organisms with large dispersal capabilities.

The genus *Palinurus*, a typically cold-water genus within the Palinuridae (George and Main, 1967), is particularly indicated for such studies, since it has a well-defined distribution with two groups of three species each present in the Mediterranean and Northeastern Atlantic (*P. elephas* Fabricius, 1787, *P. mauritanicus* Gruvel, 1911, and *P. charlestoni* Forest and Postel, 1964) and Southeastern Atlantic and Southwestern Indian Oceans (*P. gilchristi* Stebbing, 1900, *P. delagoae* Barnard, 1926 and *P. barbarae* Groeneveld et al. 2006) (Groeneveld et al., 2007). In fact, the phylogeny of the *Palinurus* species has been recently addressed using 16S and COI mtDNA sequences and maximum parsimony and bayesian phylogenetic reconstruction methods (Groeneveld et al., 2007). The results obtained by Groeneveld et al. (2007) supported the monophyly of each species within the genus and indicated that the Northern Hemisphere species *P. charlestoni* could actually have been originated from a South-African ancestor colonizing Cape Verde islands, even though results were inconclusive. The authors propose that the present geographical distribution of *Palinurus* species indicates a pre-Miocene allopatric divergence, with two main lineages separating after the northward collision of Africa with Eurasia that closed the marine gateway between Mediterranean Sea and Indian Ocean (11.2– 23 Mya) (Rögl, 1999).

Such interpretation of the results implied that the *Palinurus* mtDNA (COI and 16S rRNA combined) has evolved no faster than 0.18% (lower bound) to 0.36% (upper bound) per lineage per million years. Those rates of evolution would be 3-7 times slower than reported for other decapod taxa (Schubart et al., 1998), with *Palinurus* showing among the slowest mtDNA mutation rate reported to date (Groeneveld et al., 2007). In relation to this question, there is a certain controversy on the phylogeography and speciation modes of the Eastern Atlantic and Western Indian species of some taxa, e.g. algae (Verbruggen et al., 2005), sea urchins (Lessios et al., 2001), fishes (Rocha et al., 2005, Teske et al., 2007). These studies suggest that either older events, e.g. the widening

of the central Atlantic during the Jurassic or recent oceanographic processes, e.g. western African upwellings (Shannon, 1985) could have influenced the phylogeny of many marine taxa. Therefore, a more complete understanding of the phylogenetic relationships among *Palinurus* species, will allow us to answer important questions regarding the speciation processes in marine taxa with an Eastern Atlantic and Western Indian Ocean distribution.

Moreover, it should be noticed that, even though the mtDNA results provide comforting genealogical support to the classical view of species as qualitatively distinct taxa (Mayr, 2001), the reconstruction provided by mtDNA is not representative of most of the genome and may bias perceptions of evolutionary diversification (Hare et al., 2002). Actually, some doubts had been previously raised on the phylogenetic relationships of the extant species of the spiny lobster genus *Palinurus*, since they show very few morphological differences, with overlaps between the Indian and Atlantic Ocean taxa (Berry and Plante, 1973). If the specific monophyly assumption is false, species relationships may be incorrectly inferred. Furthermore, the demographic context of differentiation is not taken into account in most mtDNA studies because single loci offer low precision on estimates of historical population size (Edwards and Beerli, 2000) and because the relatively shallow coalescent time for this molecule limits the temporal window for demographic inferences (Knowles et al., 1999). For a given divergence time, historical population size is a key factor determining whether a species is polymorphic at most loci and whether genes are expected to accurately trace the species phylogeny. Large populations undergoing rapid speciation, such as in some marine species, could create intermingled genealogical tracings containing very little phylogenetic information among species divergence (Palumbi, 1994).

The present study aims to ascertain the phylogenetic relationships and monophyly patterns in species of the genus *Palinurus* from the Eastern Atlantic and Western Indian Ocean using mitochondrial DNA sequence data and a set of 13 microsatellite markers previously developed in *Palinurus elephas*. In order to solve the phylogenetic tree topology and test among opposite evolutionary hypotheses, we will use both the classic

distance-based and the recently developed coalescent-based Approximate Bayesian Computation methods, which have been successfully used to trace complex colonizing scenarios (Pascual et al., 2007). Coalescent-based methods will allow us to define the likelihood for different mutation rates and tree topologies to have produced the observed dataset and consequently test the importance of a strict vicariance mechanism (i.e. closure of marine gateway) versus a peripatric mechanism (i.e. leading edge hypothesis) in the origin of the *Palinurus* species.

MATERIAL AND METHODS

DNA was obtained from *P. elephas* (n = 331; Palero et al., 2008b), *P. mauritanicus* (n = 17; Atlantic Morocco; Palero et al., 2008c), *P. charlestoni* (n = 5; Cape Verde Islands; Palero et al., 2008c), *P. gilchristi* (n = 20; Southcoast South Africa; Tolley et al. 2005), *P. delagoae* (n = 20; S-KZN2 South Africa; Gopal et al. 2006) and *P. barbarae* (n = 18; Madagascar Ridge: Walters Shoals; Gopal et al. 2006). Multiplex PCR amplification using the polymorphic microsatellite loci isolated from *P. elephas* (Palero and Pascual, 2008; Palero et al., 2008c) were carried out under conditions described in Palero et al. (2008b). Amplified products were scored using an ABI 3770 automatic sequencer from the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona. Alleles were sized by PeakScanner™ software, with an internal size marker CST Rox 70–500 (BioVentures Inc.). The 16S rRNA (Palumbi, 1996), and the COI (Folmer et al., 1994) sequences were obtained as in Groeneveld et al. (2007) and Palero et al. (2008d). All samples and microsatellite markers included in Palero et al., (2008c) were used for classic distance-based analysis, while the combined dataset including mtDNA sequence data and 10 microsatellite loci (after excluding Pael22, Pael31 and Pael44, since they do not follow a “stepwise” change in allele size) were used for coalescent-based ABC analysis.

We employed CONVERT 1.2 to transform the excel-based microsatellites dataset into different formats to be run by other population genetic programs (Glaubitz 2004). Pairwise differentiation estimates (F_{ST}) for microsatellite data were obtained using the GENEPOP package version 4.0.7 (Rousset 2008), while average GTR corrected sequence divergence was obtained for mtDNA data as in Groeneveld et al. (2007). In order to test for a correlation among the genetic distance matrix obtained from mtDNA sequence data and the F_{ST} distance matrix based on microsatellites, a Mantel test was carried out. The rows and columns of one of the matrices were subjected to 700 random permutations, with the correlation being recalculated after each permutation. Moreover, the patterns of spatial genetic structure described as isolation-by-distance (IBD) models (Wright 1943) were evaluated using a Mantel test between the matrix of geographic distance and each

genetic distance matrix. The Mantel test analysis for a multiple set of distance matrices (modified from Reynolds, 2001) has been implemented in R and is available from the authors upon request.

Moreover, the distance measure of Cavalli-Sforza and Edwards (1967) was obtained from microsatellite data, and phylogenetic trees (based on individuals or species) were built using the Neighbor Joining algorithm as implemented in the Software Populations v1.2.30 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). A total of 1000 bootstrap replicates over loci were obtained to assess support for each clade. Previous phylogenetic analyses indicate that the species found in the Northernmost part of the distribution area of the genus, *Palinurus elephas*, would be the most basal species of the group, and therefore it has been consistently used to root the trees (Groeneveld et al., 2007; Palero et al., 2008e).

ABC METHODS

When inferring phylogenies under the “Isolation with migration” model (Wakeley, 1996), likelihoods can only be computed for relatively simple scenarios containing few parameters (Hey and Nielsen, 2007). Indeed, likelihood function of complex demographic scenarios can be very difficult, practically impossible, to solve analytically (Marjoram et al., 2003). This problem has been recently tackled by the use of an approximate Bayesian computation approach (Estoup et al. 2004; Hickerson et al, 2006b; Pascual et al., 2007). The advantage of this approach is the easiness to compare alternative models marginal to the parameter values without the need of calculating likelihoods (Beaumont et al, 2002). For this reason the employ of ABC methods to solve phylogenetic related problems has become of great interest (Hickerson et al, 2006a; Fagundes et al, 2007; Legras et al, 2007). The method relies on the simulation of large numbers of data sets using known parameters under a given model. In the present study, the population models were simplified to a sequence of five divergence events, from the ancestral population to the six modern ones. Selection pressures were considered absent, and each locus was assumed to have segregated independently of each other, as shown by

the absence of linkage disequilibrium among loci (Palero et al., 2008b). The used divergence models also assume that there should not be other populations that are more closely related to the sampled populations than they are to each other; and there should not be other unconsidered populations exchanging genes with the studied populations or their own ancestors (Nielsen and Wakeley, 2001).

Approximate Bayesian computation implementation:

When dealing with coalescent-based inference, we rely on simulating genetic data based on a coalescence model and computing summary statistics from the simulated datasets. A typical ABC approach involves two steps (Beaumont et al, 2002): a rejection step and a regression adjustment and weighting step. The rejection step consists of accepting only the simulations whose summary statistics are close to the values of summary statistics computed from the observed dataset. To assess this closeness, a Euclidian distance is computed between the entire set of normalized summary statistics and the normalized summary statistics calculated from the data. A set of values of the parameters is accepted when its Euclidian distance is within a certain percentage of the closest points to the studied data (as in Beaumont, 2008). The second step is a local linear regression adjustment that attempts to model the relationship between the parameter values and the summary statistics. This linear regression is performed only for the accepted set of values of the parameters. We assume that in the vicinity of the target summary statistics the relation between parameters and summary statistics is close to linear. By using this adjustment, more points can be accepted, which allows a better characterization of the space problem (Estoup et al, 2004). Also in this step, each accepted set of parameter values is given a weight between zero and one that declines quadratically until a defined distance from the studied data set (as in Hickerson et al, 2006b).

To reduce heteroscedasticity in the regression, all demographic parameter values were transformed on a log scale. The transformed values of the parameters were adjusted one at a time using a general linear regression on the accepted points. Adjusted values

were then back-transformed taking the exponential for all parameters, to express posterior densities on a normal scale (see for example Beaumont et al, 2002; Estoup et al, 2004; Hamilton et al, 2005). Occasionally, points outside the prior distribution can be obtained when performing the local adjustment in the neighbourhood of the boundaries. These points were then discarded since we considered that this practice does not transgress the Bayesian thinking.

To simulate genetic data a standard backward coalescent process was implemented (see Hudson, 1990; Nordborg, 2001). Genetic data are obtained by adding mutations under a stepwise mutation model (Kimura and Ohta, 1978) for STRs and an infinite sites model (Kimura, 1969) for sequence data. Hamilton and co-workers (2005) suggest running several hundreds of thousands to millions of simulations, depending on the complexity of the underlying model. In our simulations 1,000,000 values of the summary statistics sets were generated and a tolerance $\delta = 0.01$ was used to give 10,000 points from which parameters were estimated. When performing model-choice between the suggested different scenarios 2,000,000 points were simulated and a tolerance of $\delta = 0.005$ was used. We used the mode of the posterior distributions as a point estimate of the parameter. The credible intervals were calculated around the mode, following previous studies by Hamilton et al. (2005) and Beaumont (2007).

In order to decrease the time of simulations the model-choice studies were performed on the joined simulated data sets of the considered models. A program developed by Lopes was used to simulate genetic data in an “Isolation with migration” model for any number of modern populations. This software allows the use of STR’s and SNP’s data at the same time. Another program developed by Lopes was used to perform the rejection-step. Both programs were based on implemented code by Beaumont (2007). The regression step was performed in the version 2.5.0 of the package R (Ihaka and Gentleman 1996; cran.r-project.org). A script developed by Beaumont was used to perform the step (makepd.r, www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/). For all the posterior density estimation from the adjusted sample of parameter values we used the locfit function (Loader 1996).

Prior distributions of parameters

The prior distributions used for inferences based on the North-to-South speciation model (topology 1, with *P. charlestoni* originating from a *P. mauritanicus*-like ancestor) are given in table 1, and those based on Groeneveld et al. (2007) main hypothesis (topology 2, with *P. charlestoni* originating from a south-african ancestor), are given in table 2. They were chosen according to information available from the literature. The mutation rates for each locus were treated as a nuisance parameter. Although we intended to make general inferences about these parameters, that is, differentiate between standard and slow mutation rates, it was not intended to infer their exact values. A broad prior was then used for these rates to account for the uncertainty. The variation in mutation rate between loci was accounted for by using a hierarchical Bayesian framework (Storz and Beaumont, 2002). The mutation rates for each locus were sampled as in Beaumont (2007). Namely, they are drawn from a lognormal distribution (priors) with mean sampled from a normal distribution and the standard deviation being the absolute value sampled also from a normal distribution (hyper-priors). The use of hyper-parameters within ABC methods has been pioneered by work from Hickerson et al. (2006b), Roseblum et al. (2007) and Beaumont (2007).

Choice of summary statistics:

Our choice of summary statistics was made then primarily because of their success in previous ABC studies (Beaumont, 2007). For mtDNA, 3 summary statistics were calculated for each sampled deme: number of haplotypes, k ; number of segregating sites, S ; and the average number of pairwise differences, π . For STR data, three within-deme summary statistics were decalculated for each sampled deme: allele number, k ; heterozygosity, H ; and variance in allele length, $\text{Var}(\text{length})$. All this 6 statistics were computed for each of the six populations taken individually and for each of the fifteenth pairs of populations pooled together. Hence, the Euclidian distances were computed from a total of 126 normalized summary statistics.

Comparison of scenarios using approximate Bayesian computation

In order to test between Groeneveld et al. (2007) proposed hypotheses, we considered four scenarios which differed in the population tree topology and in the mutation rate: (1) A sequential expansion from the Northern hemisphere, passing by Cape Verde, South African coast, ending in the Indian Ocean and considering a fast mutation rate (Pliocene-Pleistocene speciation); (2) The same North-to-South expansion, but considering a slower mutation rate; (3) A secondary colonization of the Northern hemisphere, with *P. charlestoni* originating from a *P. gilchristi*-like ancestor and considering a fast mutation rate; and (4) The same vicariant event and considering a slow mutation rate (Miocene speciation). Therefore, an ABC framework was used to discriminate among our four different scenarios. This model-selection step was performed before estimating the final demographic historic parameters, which were done conditional under the most likely scenario. The prior probability for each scenario in all the comparisons were set to be equal (i.e. $\frac{1}{2}$ for each two-scenario comparison). The posterior probability of each model was estimated then by performing the rejection-step followed by a logistic regression [as suggested in (Beaumont, 2007)]. Priors for divergence times were made broad enough to consider both a Miocene and a Pleistocene speciation pattern, with total divergence time being longer than 11 My (Table 1).

Beaumont (2007) indicated that it is possible to sample the model indicator (i.e. $\{1, 2, \dots, m\}$) for “m” models (M_1, M_2, \dots, M_m) from a prior and treat this as a categorical random variable, Y , in the ABC simulations. We can then apply a categorical regression to estimate $P(Y=y_1|S=s')$, where $y = 1, 2, \dots, m$ is the indicator for model M_y and s' is the vector of the summary statistics that summarize our observed data. A scheme of weighting can be also used, with weights given by the Epanechnikov kernel, as done in a standard regression procedure. The regression-step was performed using Beaumont’s R script `calmod` (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/>), which needs the VGAM package (Yee and Wild, 1996). This procedure has been shown to substantially improve previous methods to select among different models using ABC (Beaumont, 2007).

RESULTS

The Mantel test ($R = 0.626$; $P = 0.003$) revealed a significant correlation between the genetic distance matrix obtained from mtDNA sequence data and that obtained from microsatellites. Moreover, the correlation between the matrix of geographic distance and each genetic distance matrix was always significant although higher for the microsatellite dataset ($R = 0.585$; $P = 0.001$) than for the mtDNA dataset ($R = 0.237$; $P = 0.033$). The distance measure of Cavalli-Sforza and Edwards (1967) agrees with placing *P. charlestoni* samples next to *P. elephas* samples and showing a southern hemisphere species clade when phylogenetic trees are built using the individual-based matrices and the Neighbor Joining algorithm (Fig. 1). When dealing with species instead of individuals, a well supported monophyletic southern hemisphere clade was obtained, even though phylogenetic relationships among northern hemisphere species were not well resolved with the microsatellite dataset alone (Fig. 2).

ABC methods

The posterior distribution of 2 models comparisons are presented in table 3. The tests for mutation rate of both topology models gave a better support for a standard mutation rate. This support is fairly strong giving about 90% of probability of having a fast mutation. The comparisons between the two different speciation models [North-to-South (top1) and Groeneveld et al. (2007) main hypothesis (top2)] both considering a fast and a slow mutation rate strongly support the North-to-South speciation model. When considering the fast mutation rate this support is again about 90% (Table 3).

Demographic parameters were estimated by conditioning the ABC runs to the most supported model (North-to-South speciation with a standard mutation rate). Estimations of the modern population effective sizes were quite significant, pointing to about 50,000 individuals for populations of *P. barbarae*, *P. delagoae*, *P. gilchristi* and *P. elephas* and between 80,000 to 100,000 individuals for *P. mauritanicus* and *P. charlestoni*. In most cases, estimates of the ancestor population effective size were not

very informative. The estimation of the second ancestor population, however, had a quite informative posterior distribution, showing a value of about 10,000 individuals. This ancestor population refers to the original population from the South Africa coast that later originated the *P. gilchristi* and from which the *P. barbarae* and *P. delagoae* come from. This value corresponds to the effective population size so it is not straightforward to infer the census population size from it. Nevertheless these results seem to point out an expansion event of the referred south-African ancestral population.

In this ABC study the demographic parameters which estimations had a better support were the ones regarding splitting time. When conditioning for a North-to-South speciation pattern, all the five splitting times show a posterior distribution considerably different from the prior and quite tight around the mode (Table 4). The splitting time that originated the ancestor of both *P. elephas* and *P. mauritanicus* seem to be placed around 2 Million years ago (Mya), the separation between *P. mauritanicus* and *P. charlestoni* lineages happened about 1 Mya, the colonization of South of Africa seem to have taken place only 0.5 Mya and the appearance of both *P. delagoae* and *P. barbarae* would be placed at about 0.2 Mya and 0.1 Mya, respectively.

DISCUSSION

Our within-genus phylogenetic analyses using a new set of polymorphic nuclear loci and the classic distance-based methods consistently support a North-to-South pattern of speciation in *Palinurus* with all the South-African species forming a monophyletic clade (Fig 2). Moreover, the combination of nuclear and mtDNA markers under the recently developed coalescent-based ABC methods has allowed us to test for the previously suggested hypothesis of *P. charlestoni* originating from a *P. gilchristi*-like ancestor (Groeneveld et al., 2007), so that it can be confirmed that a North-to-South speciation pattern is more consistent with the observed dataset. This North-to-South speciation process would be congruent with the overall geographic patterns of surface water currents along the western coast of Africa. The Canary current flows year-round towards the equator (Wooster et al. 1976; Batten et al. 2000), while the ocean surface Angola current flows in a southerly direction near western Africa's coast from 2°N to 20°S. Teleplanic larvae like phyllosoma could have also been transported by the Angola current, which communicates with the turning branch of the Benguela current, facing south. Therefore, some larvae could have colonized South African waters using a conveyor-belt-like system. However, rather than if larvae could have reached southern Africa, there seems to be a more important question to solve: have ever South-African waters been a suitable environment for *Palinurus* to survive and proliferate?

A previous phylogeographic study using the COI region and the standard rates for decapoda found the divergence times for *P. elephas* and *P. mauritanicus* to be much more recent than proposed by Groeneveld et al. (2007) (Palero et al. 2008d). Also, a previous study on the Achelata infraorder evolutionary relationships showed no genetic variation to be present among all *Palinurus* species (but *P. elephas*) when analyzed using sequence data from several nuclear genes (Palero et al. 2008e). In agreement with previous evidence, the coalescent simulations carried out in the present study indicate that the observed molecular dataset is not likely to result from a low mutation rate while the standard (faster) mutation rate is supported regardless of the speciation hypothesis assumed. Interestingly, divergence times obtained for *Palinurus* species using the

standard rates agree with known glaciation-related processes during the last 2 My (Prange et al. 2002). It is well-known that the late Pliocene changes in the climate system, both in the Northern and the Southern Hemisphere, had a large impact on the evolution of many terrestrial organisms (deMenocal, 2004). Therefore, the question directly arises: How did all these changes affect the ocean circulation patterns in the southern Atlantic and, particularly, how did it affect southern Africa marine environment?

During the Pliocene, the most important change in ocean circulation was related to the gradual closure of the Panama Isthmus between 5 and 3 Mya (Marlow et al., 2000; Prange et al. 2002). Exchange of tropical Atlantic and Pacific water masses was stopped and a present day circulation established with a strong influence of North Atlantic Deep Water on global circulation, with a strong intensification of the Benguela Current upwelling system (Prange and Schulz, 2004). Even though upwelling off Namibia probably started during the mid-Miocene (Siesser, 1980), the Matuyama diatom maximum (~2Mya) marked the transition from a warm to a cold mode of trade-wind controlled upwelling along the southwest African coast with enhanced advection of sub-Antarctic water masses (Lange et al., 1999). Marlow et al. (2000) have shown that the Benguela Current upwelling system became pronounced at 2.1 to 1.9 Mya and intensified during the period leading to the onset of the 100 kyr glacial cycles at ~0.6 Mya. The intensification of Benguela Current upwelling had a direct regional influence by cooling the marine waters of southern Africa (Marlow et al., 2000). The average sea surface temperature in southwest African waters was directly affected by this upwelling system, shifting from about 26°C in the mid-Pliocene (3.5 Mya) to approximately 18°C in modern times (Marlow et al., 2000). Therefore, water temperature would not have allowed the expansion of a cold-water genus like *Palinurus* in southern Africa until the late Pleistocene, since *Palinurus* species are generally found between 11-18°C. Indeed, according to ABC divergence time estimates, *P. charlestoni* and *P. gilchristi* lineages would have diverged only about 550ky ago, after southwest African waters became suitable to live in for *Palinurus* species.

Moreover, the individual-based analyses have shown that monophyly patterns in species of the genus *Palinurus* from the Eastern Atlantic and Western Indian Ocean are not well supported. This result is in agreement with the coalescent theory, which claims that polyphyletic gene lineages can persist in species long enough after divergence (Tajima 1984; Hare et al., 2002). It should be taken into account that with an ancestral population effective size of about 20,000 (see results) and a generation time of 4-10 years, a total of 160-400 kyr will be needed for gene lineages to get fixed. This would be in agreement with divergence times estimates obtained from the combined dataset, since the individual-based analyses show that incomplete lineage sorting is most pronounced in the most recently evolved species pair, *P. delagoae* and *P. barbarae* (divergence time: ~89 kyr). Therefore, the combination of markers from both nuclear and mitochondrial genomes under an ABC-coalescent framework has proven to be effective for testing among conflicting evolutionary hypothesis in *Palinurus* and indicates the importance of using multiple markers when dealing with closely-related species.

CONCLUSION

The *Palinurus* speciation pattern is a typical example of a series of rapid speciation events occurring within a group, with very short branches separating the different species. Molecular tools have helped to uncover closely related and still diverging species from a wide variety of taxa and have provided insight into the mechanisms, pace and geography of marine speciation (Knowlton, 1993; Palumbi and Cipriano, 1998; Lessios et al., 2001). Coupled with information about geological history of regions, faunistic affiliations of species found in particular regions, and the oceanic currents that may provide dispersal corridors, molecular data can greatly help document the geographic pattern and relative timing of species formation. Indeed, recent genetic evidence suggests that many species groups are relatively new, originating after the onset of the Pleistocene, during the last two million years (Palumbi 1996; Barber et al. 2002). These recent speciation events provide a great opportunity to analyze the speciation process in marine taxa, and allow a combination of genetic, morphological, behavioural and biogeographic data to be used to answer questions about speciation mechanisms. Footprints of species formation are most

likely to be identified when comparing recently diverged species, initial differentiation of which can be correlated with the different proposed speciation processes. Finally, the present study highlights the necessity of a larger effort to be made in order to test the suitability of microsatellites and other fast-evolving markers and to develop new statistical methods when inferring genealogical relationships after a rapid speciation process.

BIBLIOGRAPHY

- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Molecular Ecology*, **11**, 659-674.
- Batten ML, Martinez JR, Bryan DW, Buch EJ (2000) A modeling study of the coastal eastern boundary current system off Iberia and Morocco. *Journal of Geophysical Research*, **105**, 14173-14195.
- Beaumont MA (2007) Joint determination of topology, divergence time, and immigration in population trees. In: *Simulation, Genetics and Human Prehistory*. (eds. Matsumura S, Forster P, Renfrew C). McDonald Institute Monographs, Cambridge.
- Beaumont MA (2008) Joint determination of topology, divergence time, and immigration in population trees., pp. 135-154 in *Simulations, Genetics, and Human Prehistory*, edited by S. Matsumura, P. Forster and C. Renfrew. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, **162**, 2025-2035.
- Berry PF, Plante R (1973) Revision of Spiny Lobster Genus *Palinurus*, in Southwest Indian-Ocean. *Trans. Roy. Soc. S. Afr.*, **40**, 373-390.
- Booth JD, Phillips BF (1994) Early life history of spiny lobster. *Crustaceana*, **66**, 271-294.
- Butlin RK, Galindo J, Grahame JW (2008) Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions B*, **363**, 2997–3007.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**, 233-257.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland.

- deMenocal PB (2004) African climate change and faunal evolution during the Pliocene-Pleistocene. *Earth and Plant. Sci. Lett, Frontiers*, **6976**, 1-22.
- Diaz D, Mari M, Abello P, Demestre M (2001) Settlement and juvenile habitat of the European spiny lobster *Palinurus elephas* (Crustacea : Decapoda : Palinuridae) in the western Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, **65**, 347-356.
- Edwards SV, Beerli P (2000) Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, **54**, 1839-1854.
- Estoup A, Beaumont MA, Sennedot F, Moritz C, Cornuet JM (2004) Genetic analysis of complex demographic scenarios: spatially expanding populations of the cane toad, *Bufo marinus*. *Evolution Int J Org Evolution*, **58**, 2021-2036.
- Fagundes N, Ray N, Beaumont MA, Neuenschwander S, Salzano FM (2007) Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 17614.
- FAO (2008) Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series (version 2.32) with the dataset "Capture production 1950-2006", Web-site at <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp>.
- Gardner JPA (1997) Hybridization in the sea. In: *Advances in marine biology* (eds. Blaxter JHS, Southward AJ). Academic, New York.
- Glaubitz J (2004) CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol. Ecol.*, **4**, 309-310.
- Gopal K, Tolley K, Groeneveld J, Matthee C (2006) Mitochondrial DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the southwestern Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **319**, 191-198.
- Groeneveld J, Gopal K, George R, Matthee C (2007) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (Decapoda : Palinuridae) with hypotheses on speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**, 102-110.
- Groeneveld JC, Griffiths CL, van Dalsen AP (2006) A new species of spiny lobster, *Palinurus barbarae* (Decapoda, Palinuridae) from Walters Shoals on the Madagascar Ridge. *Crustaceana*, **79**, 821-833.

- Hare MP, Cipriano F, Palumbi SR (2002) Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution*, **56**, 804-816.
- Hey J, Nielsen R (2007) Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS*, **104**, 2785-2790.
- Hickerson M, Dolman G, Moritz C (2006a) Comparative phylogeographic summary statistics for testing simultaneous vicariance. *Molecular Ecology*, **15**, 209-223.
- Hickerson M, Stahl E, Lessios HA (2006b) Test for simultaneous divergence using approximate bayesian computation. *Evolution*, **60**, 2435-2453.
- Holthuis LB (1991) *FAO species catalogue. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date.* Fisheries Synopsis, 25. Rome.
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Survey of Evolutionary Biology*, **7**, 1-44.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, **5**, 299-314.
- Kimura M (1969) The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics*, **61**, 893-903.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**, 2868-2872.
- Knowlton N (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 189-216.
- Lange CB, Berger WH, Lin HL, Wefer G, 175 SSPL (1999) The early Matuyama diatom maximum off SW Africa, Benguela Current System (ODP Leg 175). *Marine Geology*, **161**, 93-114.
- Legras J, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, **16**, 2091-2102.
- Lessios HA, Kessing BD, Pearse J (2001) Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution*, **55**, 955-975.
- Marjoram P, Molitor J, Plagnol V, Tavaré S (2003) Markov chain Monte Carlo without likelihoods. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 15324-15328.

- Marlow JR, Lange CB, Wefer G, Rosell-Mele A (2000) Upwelling intensification as part of the Pliocene-Pleistocene climate transition. *Science*, **290**, 2288-2291.
- Mayr E (2001) *What Evolution Is*. Basic Books, New York.
- Meyer CP, Geller JB, Paulay G (2005) Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*, **59**, 113-125.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, **158**, 885-896.
- Nordborg M (2001) Coalescent Theory, pp. 602-635 in Handbook of statistical genetics.
- Palero F, Abelló P (2007) The first phyllosoma stage of *Palinurus mauritanicus* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). *Zootaxa*, **1508**, 49-59.
- Palero F, Pascual M (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02230.x
- Palero F, Guerao G, Clark PF (2008a) *Palinustus mossambicus* Barnard 1926 (Crustacea: Decapoda: Achelata: Palinuridae); morphology of the puerulus stage. *Zootaxa*, **1857**, 44-54.
- Palero F, Abelló P, Macpherson E, Beaumont M, Pascual M (2008b) Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population structure and conservation strategies of European spiny lobster. *Molecular Ecology*, **(in preparation)**.
- Palero F, Abelló P, Macpherson E, Matthee C, Pascual M (2008c) Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795. *Conservation Genetics*, **(in preparation)**.
- Palero F, Abelló P, Macpherson E, Gristina M, Pascual M (2008d) Phylogeography of the european spiny lobster (*Palinurus elephas*): influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 708-717.
- Palero F, Crandall KA, Abelló P, Macpherson E, Pascual M (2008e) Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **(accepted)**.
- Palumbi SR (1994) Genetic-Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**, 547-572.

- Palumbi SR (1996) What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **203**, 75-92.
- Palumbi SR, Cipriano F (1998) Species identification using genetic tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal Of Heredity*, **89**, 459-464.
- Pascual M, Chapuis M, Mestres F, Balanya J, Huey R (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, **16**, 3069-3083.
- Prange M, Romanova V, Lohmann G (2002) The glacial thermohaline circulation: stable or unstable? *Geophys. Res. Lett.*, **29**, 2028-2031.
- Prange M, Schulz M (2004) A coastal upwelling seesaw in the Atlantic Ocean as a result of the closure of the Central American Seaway. *Geophys. Res. Lett.*, **31**, L17207.
- Ridley M (1993) *Evolution*. Blackwell Scientific. Oxford.
- Rocha LA, Robertson DR, Roman J, Bowen BW (2005) Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, 573-579.
- Rögl F (1999) Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography. *Geologica Carpathica*, **50**, 339-349.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, **8**, 103-106.
- Schubart CD, Diesel R, Hedges SB (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature*, **393**, 363-365.
- Shannon LV (1985) The Benguela ecosystem: Part I. Evolution of the Benguela, physical features and processes. In: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* (ed. Barnes M). Aberdeen University Press, Aberdeen.
- Siesser WG (1980) Late Neocene origin of the Benguela upwelling system off northern Namibia. *Science*, **208**, 283-285.
- Tajima F, Nei M (1984) Note on genetic drift and estimation of effective population-size. *Genetics*, **106**, 569-574.
- Teske PT, McQuaid CD, Froneman PW, Barker NP (2006) Impacts of marine biogeographic boundaries on phylogeographic patterns of three South African estuarine crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*, **314**, 283-293.

- Tolley K, Groeneveld J, Gopal K, Matthee C (2005) Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. *Marine Ecology Progress Series*, **297**, 225-231.
- Verbruggen H, De Clerck O, Schils T, Kooistra WHCF, Coppejans E (2005) Evolution and phylogeography of Halimeda section Halimeda. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 789-803.
- Wakeley J (1996) The variance of pairwise nucleotide differences in two populations with migration. *Theor Popul Biol*, **49**, 39-57.
- Wooster WS, Bakum A, McLain DR (1976) The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *Journal of Marine Research*, **34**, 131-140.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114–138.
- Yee T, Wild C (1996) Vector generalized additive models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, **58**, 481-493.

Table legends.

Table 1.- Priors used for the North-to-South speciation scenario with the standard and the slow mutation rate for the mtDNA data.

Table 2.- Priors used for the Groeneveld et al. (2007) speciation hypothesis with the standard and the slow mutation rate for the mtDNA data.

Table 3.- Amount of support the ABC framework is giving to the different mutation and tree topology models.

Table 4.- Estimates for the mode and the 95% credible intervals for each demographic historic parameter when the simulation is conditional to the most supported scenario (North-to-South speciation with a standard mutation rate).

Figure legends.

Fig. 1- Phylogenetic tree built using the individual-based distance matrix. Species are coded by colors. The Neighbor Joining algorithm under Cavalli-Sforza and Edwards (1967) distance measure agrees with placing *P. charlestoni* samples next to *P. elephas* samples.

Fig. 2- Species tree obtained using the Neighbor Joining algorithm on the Cavalli-Sforza and Edwards (1967) distance matrix. When dealing with populations instead of individuals, a well supported monophyletic southern hemisphere clade was obtained.

Table 1.

Demographic parameters		Prior distribution	
Ne ₁	<i>P. barbarae</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₂	<i>P. delagoae</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₃	<i>P. gilchristi</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₄	<i>P. charlestoni</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₅	<i>P. mauritanicus</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₆	<i>P. elephas</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A1}	First ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A2}	Second ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A3}	Third ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A4}	Forth ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A5}	Fifth ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
t ₁	First splitting time	Uniform (0, 2My)	
t ₂	Second splitting time	t1 values + Uniform (0, 1,5My)	
t ₃	Third splitting time	t2 values + Uniform (0, 1,5My)	
t ₄	Forth splitting time	t3 values + Uniform (0, 2My)	
t ₅	Fifth splitting time	t4 values + Uniform (0, 5My)	

Marker Hyper-parameters		Mutation rate for mtDNA	
		standard	slower
ϑ_{STRm}	mean of mutation rate for STR's locus	Normal (-3.5, 0.25)	Normal (-3.5, 0.25)
ϑ_{STRsd}	st. dev. of mutation rate for STR's locus	Abs[Normal (0, 0.5)]	Abs[Normal (0, 0.5)]
ϑ_{SNPm}	mean of mutation rate for SNP's locus	Normal (-4.630784, 0.25)	Normal (-5.267606, 0.25)
ϑ_{SNPsd}	st. dev. of mutation rate for SNP's locus	Abs[Normal (0, 0.5)]	Abs[Normal (0, 0.5)]

Table 2.

Demographic parameters		Prior distribution	
Ne ₁	<i>P. barbarae</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₂	<i>P. delagoae</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₃	<i>P. charlestoni</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₄	<i>P. gilchristi</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₅	<i>P. mauritanicus</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne ₆	<i>P. elephas</i> population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A1}	First ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A2}	Second ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A3}	Third ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A4}	Forth ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
Ne _{A5}	Fifth ancestral population size	Uniform (1000, 100000)	
t ₁	First splitting time	Uniform (0, 2My)	
t ₂	Second splitting time	t1 values + Uniform (0, 1,5My)	
t ₃	Third splitting time	t2 values + Uniform (0, 1,5My)	
t ₄	Forth splitting time	t3 values + Uniform (0, 2My)	
t ₅	Fifth splitting time	t4 values + Uniform (0, 5My)	

Marker Hyper-parameters		Mutation rate for mtDNA	
		standard	slower
ϑ_{STRm}	mean of mutation rate for STR's locus	Normal (-3.5, 0.25)	Normal (-3.5, 0.25)
ϑ_{STRsd}	st. dev. of mutation rate for STR's locus	Abs[Normal (0, 0.5)]	Abs[Normal (0, 0.5)]
ϑ_{SNPm}	mean of mutation rate for SNP's locus	Normal (-4.630784, 0.25)	Normal (-5.267606, 0.25)
ϑ_{SNPsd}	st. dev. of mutation rate for SNP's locus	Abs[Normal (0, 0.5)]	Abs[Normal (0, 0.5)]

Table 3.

Topology	Mutation rate	Probability
topology 1 (North-to-South)	slow standard	0.1 0.9
topology 2 (Groeneveld et al., 2007)	slow standard	0.11 0.89
top1 top2	standard	0.88 0.12
top1 top2	slow	0.7 0.3

Table 4.

Parameters	Description	Mode	0.95 C.I.	
Ne1	<i>P. barbarae</i> population size	57,079	32,208	97,228
Ne2	<i>P. delagoae</i> population size	49,030	25,139	89,307
Ne3	<i>P. charlestoni</i> population size	49,752	26,376	92,307
Ne4	<i>P. gilchristi</i> population size	97,604	63,970	100,000
Ne5	<i>P. mauritanicus</i> population size	87,317	49,406	100,000
Ne6	<i>P. elephas</i> population size	47,426	25,733	86,020
NeA1	First ancestral population size	34,762	1,000	87,000
NeA2	Second ancestral population size	11,634	1,000	21,851
NeA3	Third ancestral population size	28,861	1,000	66,139
NeA4	Forth ancestral population size	14,881	1,000	50,861
NeA5	Fifth ancestral population size	46,089	1,000	62,218
t1	First splitting time	89,209	15,602	213,021
t2	Second splitting time	200,220	80,858	358,436
t3	Third splitting time	552,555	280,528	886,589
t4	Forth splitting time	975,198	532,753	1,474,347
t5	Fifth splitting time	1,765,377	952,895	2,625,863

Fig. 1

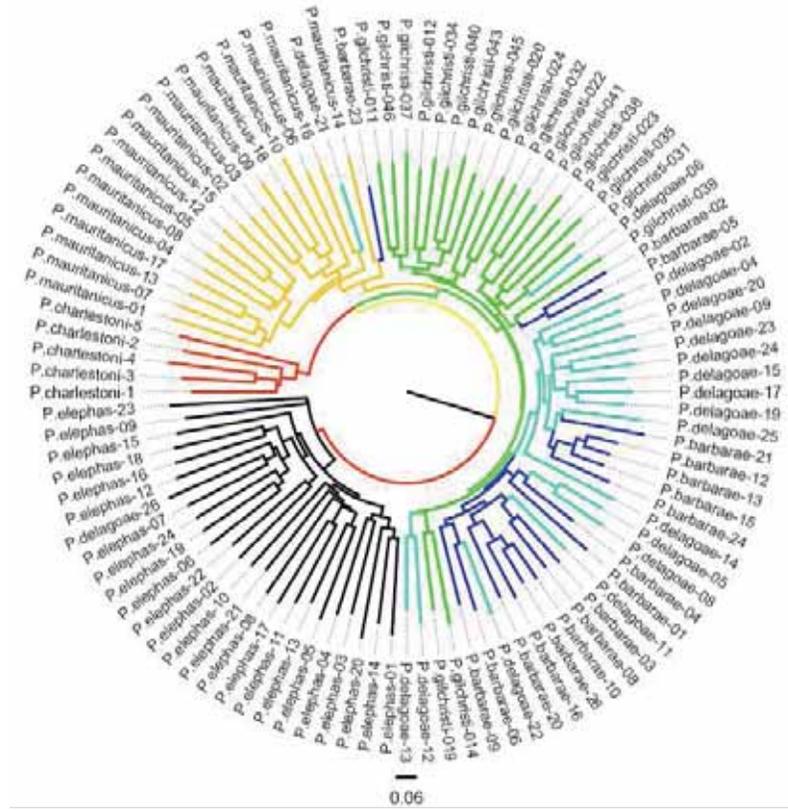
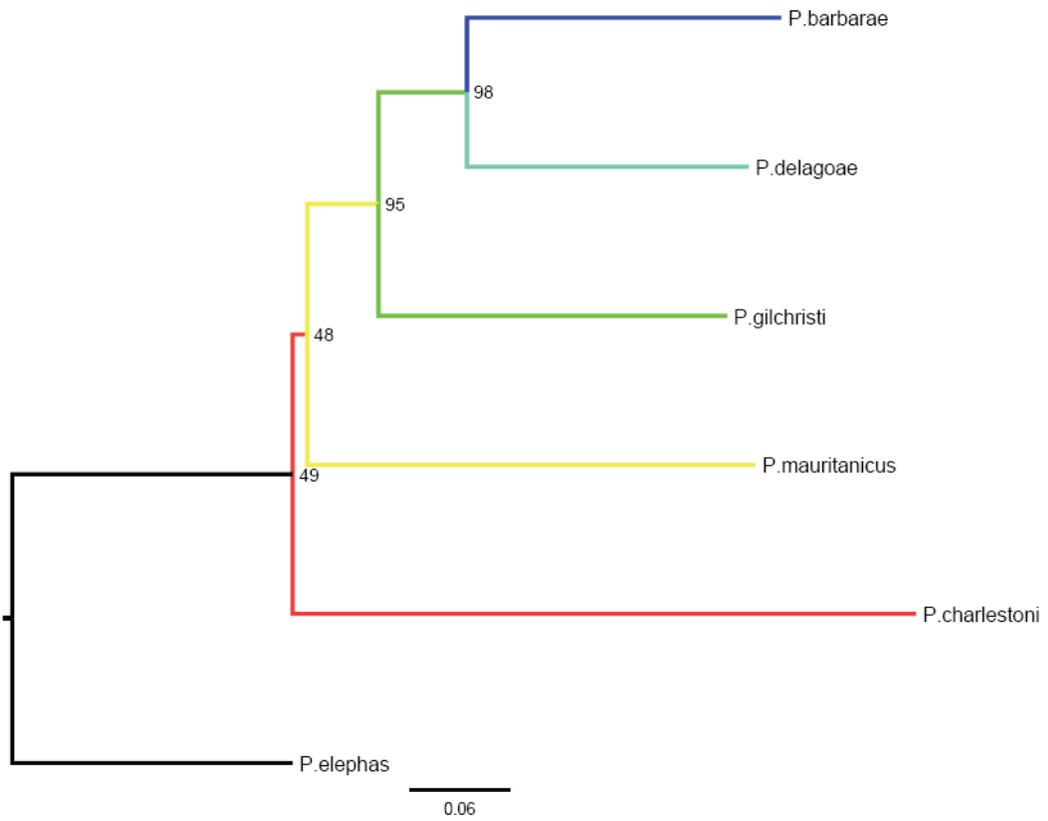


Fig. 2.



3.3. Diversitat genètica i diferenciació en poblacions de llagosta vermella (*Palinurus elephas*) de l'Atlàntic i la Mediterrània.

Publicació 6 Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*):
Influence of current oceanographical features and historical processes

Publicació 7 Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population
structure and conservation strategies of European spiny lobster

Filogeografia de la llagosta europea (*Palinurus elephas*): Influència dels trets oceanogràfics actuals i processos històrics.

La llagosta europea (*Palinurus elephas*) és un organisme idoni per estudiar els efectes de la història demogràfica i els processos oceanogràfics actuals en la diversitat genètica i l'estructuració poblacional d'una espècie marina amb una fase larval de llarga durada. En el present treball, hem seqüenciat una porció del gen COI en 227 individus d'un total de 11 localitats, cobrint la major part de la distribució de l'espècie. La divergència trobada entre les regions atlàntiques i mediterrànies podria ser explicada per una restricció de flux gènic entre poblacions. A més, una anàlisi de components principals ens va permetre detectar diferències dins de cada conca. L'existència de diferenciació genètica entre Bretanya i les poblacions d'Escòcia i Irlanda es podria relacionar amb l'efecte del corrent del Golf, mentre que els processos de meso-escala que pateixen les aigües atlàntiques quan penetren a la Mediterrània podrien ser responsables de la diferenciació genètica dins d'aquesta. A més, els processos històrics podrien ser responsables d'una reducció de la variabilitat genètica global de *P. elephas*. La distribució haplotípica trobada en *P. elephas*, amb la presència d'un haplotip majoritari i un gran nombre d'haplotips estretament relacionats, és típica d'espècies que han experimentat una reducció forta en la variabilitat i subsegüents expansions. Les fluctuacions climàtiques relacionades amb cicles glacials podrien explicar el nivell present de diversitat nucleotídica trobada. Interessantment, aquests esdeveniments glacials no semblen haver tingut el mateix impacte en altres espècies del mateix gènere. Els nostres resultats indiquen que els esdeveniments glacials recents podrien haver tingut un impacte més baix en *Palinurus mauritanicus*, una espècie que presenta una àrea de distribució superposada però que es troba en aigües més fredes que *P. elephas*.

Publicació 6 (pàg. 132-141)

Palero, F., Abelló, P., Macpherson, E., Gristina, M. and M. Pascual (2008)
Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*):
influence of current oceanographical features and historical processes.
Molecular Phylogenetics and Evolution 48, 708-717.

Influència d'una fase larval llarga i de les barreres oceàniques en l'estructuració poblacional i les estratègies de conservació de la llagosta vermella

Sembla àmpliament acceptat que l'estructuració poblacional ve determinada principalment per la connectivitat entre poblacions, la qual depèn directament de l'habilitat dispersant de l'espècie. Conseqüentment, s'esperaria que la llagosta europea presentara una estructuració poblacional baixa, pels elevats nivells de connectivitat provocats per la filosoma, una fase larval adaptada especialment per a una dispersió de llarga durada. En efecte, el present estudi mostra que la diferenciació global entre poblacions de *Palinurus elephas* és molt baixa però significativa ($F_{st} = 0.0083$). Les conques atlàntica i mediterrània mostren diferències significatives, indicant que l'espècie no es comporta com una unitat panmítica senzilla i que una certa estructuració genètica és present. A més, l'estudi mostra que, tot i que la sobrepesca ha reduït dramàticament les captures per tota la seva àrea de distribució, la grandària efectiva històrica de *P. elephas* s'ha mantingut considerablement gran ($N_e = 13,000-47,000$) i per tant la sobreexplotació seria massa recent per a ser detectada. A més a més, aquesta grandària efectiva provocaria valors de F_{st} extremadament baixos fins i tot per a poblacions amb nivells restringits de dispersió. Els nostres resultats il·lustren la importància de considerar paràmetres demogràfics per tal d'avaluar els patrons de connectivitat en organismes marins i estudiar els efectes de la sobrepesca sobre l'estructuració genètica d'una espècie comercial.

TITLE: Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population structure and conservation strategies of European spiny lobster

F. PALERO^{*(1,2)}, P. ABELLÓ⁽²⁾, E. MACPHERSON⁽³⁾, M. BEAUMONT⁽⁵⁾ and M. PASCUAL⁽¹⁾

(1) Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain (2) Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Spain (3) Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CSIC), Carrer d'Accés a la Cala Sant Francesc 14, 17300 Blanes, Spain (4) School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 228, Reading RG6 6AJ, United Kingdom

KEY WORDS: microsatellites, dispersal, long-lived species, overfishing, *Palinurus*

Corresponding autor: FERRAN E. PALERO Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. FAX: 0034 934034420
e-mail: ferranpalero@ub.edu

Running title: Population connectivity of species with long PLD

ABSTRACT

It is widely recognised that population structuring is mainly determined by population connectivity, which directly depends on the dispersal ability of the species. Consequently, low population structuring is expected in the European spiny lobster, given the enhanced connectivity levels caused by the phyllosoma, a larval phase specially adapted for long time dispersal. Indeed, the present study shows that very weak global population differentiation is found in *Palinurus elephas* ($F_{st} = 0.0083$). Nevertheless, Atlantic and Mediterranean basins showed significant differences, indicating that population do not behave as a single panmictic unit and that slight genetic structuring is present. Moreover, the present study shows that even though over-fishing has reduced catches dramatically all over its distribution area, historical effective population size of *P.elephas* is considerably large ($N_e = 13,000-47,000$) and overexploitation is too recent to be detected. Most importantly, this large effective population size would cause F_{st} values to be extremely small even for populations with restricted levels of dispersal. Our results illustrate the importance of considering historical demography and life history parameters when evaluating connectivity patterns in marine organisms and studying the effects of overfishing on the genetic structuring of exploited species.

INTRODUCTION

One of the most puzzling questions in marine molecular ecology is the cause behind population structuring patterns in marine organisms. It is widely recognised that population structuring is mainly determined by population connectivity, which directly depends on the dispersal ability of the species (Palumbi 2003; Shanks et al. 2003). However, direct studies of dispersal in marine organisms are generally scarce due to the nature of the environment occupied (Awise 1998). Definitive estimates of larval dispersal in the ocean require the ability to track microscopic propagules through the pelagic environment, from spawning locations to recruitment sites. Since this is not feasible for all species (but see Moran and Marko 2005), exceptional opportunities are afforded for genetic data to close gaps in knowledge concerning organismal behaviours, natural histories and current and past population demographic factors (Awise 2004). Genetic surveys of marine species can provide an average picture of dispersal patterns by examining long-term mean population connectivities and therefore contribute to improve our understanding of marine population dynamics (Palumbi 2003). For example, planktonic larval duration (PLD) is known to be a key factor in shaping patterns of dispersal and degree of connectivity between populations of marine species (Thorson 1950; Scheltema 1986). Species with a longer PLD should exhibit extensive gene-flow (panmixia) and, therefore, low or no population structuring. However, even though long PLD should enhance connectivity among demes, larval behaviour coupled with oceanographic structures at different scales may be conducive to larval retention (Naylor 2006; Galarza et al. 2008).

Moreover, not only life history traits but also human impact could affect population genetics in marine species. High levels of exploitation may not only affect the census size (N) of target species, but also its genetic constitution and population connectivity (Tufto and Hindar 2003). The depletion of linking populations, which enhances isolation between demes, would also cause a reduction in overall genetic diversity and population effective size (N_e) (Whitlock and Barton 1997). This reduction would have a larger effect in marine species, in which a very high variance in reproductive success generally causes

extremely low N_e/N ratios (Hedgecock 1994). Moreover, observed N_e/N ratios, varying from 10^{-3} to 10^{-5} in marine organisms, imply that even stocks of several million individuals may be in danger of losing genetic variability in the long term, since they would actually represent much smaller effective population sizes (Hauser et al. 2002; Turner et al. 2002). Therefore, defining the real effect of larval dispersal on population connectivity patterns has direct implications on the management of exploited marine resources. Marine reserves must be able to sustain the populations of organisms within the reserve while serving as a reseeded source for populations outside the reserve (DeMartini 1993; Jennings 2000). A population that exports most of its larval production but is dependent on overexploited stocks will be finally exhausted. Given that population effective size and population connectivity are tightly intertwined and highly dependent on the biology of the organism (Rice 2004), efficient management and conservation strategies should integrate information on the biology, genetic diversity and population differentiation of the protected species.

Spiny lobsters (Palinuridae Latreille, 1802) are one of the most commercially important groups of decapod crustaceans and are characterized by the presence of the phyllosoma, a larval phase specially adapted for long time dispersal (Holthuis 1991). The main palinurid species exploited in the Mediterranean Sea and along North eastern Atlantic coasts is the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) (Ceccaldi and Latrouite 1994). *P. elephas* is a long-lived decapod crustacean that has a lifespan of up to 25 years and attains functional reproductive maturity at 5 years age (Marin 1987). The adult spiny lobsters are sedentary, with observed mean annual displacement of generally less than 5 km (Follesa et al. 2007), but estimates of the duration of larval development are among the longest for a marine species, being in the range of 5-6 months in the Mediterranean and one year in the Atlantic (Hunter 1999; Palero and Abelló 2007). Assuming a mean velocity for marine currents of 10cm/s, which would be in the low end for the Mediterranean Sea (Rio et al. 2007), such a long planktonic life would correspond to a potential dispersal distance of 1,300-2,500km. Stock over-exploitation has made mean annual catches of *P. elephas* to decrease alarmingly along its entire distribution area during recent decades (Goñi and Latrouite 2005). Diving for spiny lobster off Cornwall

virtually eliminated the species from shallow water during the 1960s (Hepper 1977) and a substantial decline (>50%) of lobsters in transect counts has been recorded over the last 10 years within the Medes Islands in the Western Mediterranean (Marí et al. 2002). In order to protect this valuable resource from complete depletion, several marine reserves have been recently designed in Mediterranean waters (Columbretes Islands, Goñi et al. 2006; Sardinia, Follesa et al. 2008).

In spite of its relevance in marine reserve design, little is known about the genetic structure and connectivity of European spiny lobster populations across their distribution. Given the large dispersal potential of the phyllosoma, a plausible hypothesis would be that no population structuring is present in *P. elephas* and that all established marine reserves are interconnected. However, regardless its long PLD, several oceanographic barriers found within the distribution area of the European spiny lobster could reduce larval dispersal. One of them, the Almeria-Oran Front (AOF), formed by the encounter of the incoming Atlantic surface water with the modified higher density Mediterranean water (Tintoré et al. 1995) has been found to be responsible of some degree of genetic differentiation in most species, but with some exceptions (Patarnello et al. 2007). A previous study using the mtDNA COI region, found shallow genetic partitioning for *Palinurus elephas* along its distribution area, probably caused by the Almeria-Oran Front, but also related to mesoscale processes within the Mediterranean (Palero et al. 2008a). The Mediterranean Sea has a highly complex system of water mass circulation, mainly influenced by the Algerian Current (western basin) and Libyo-Egyptian Current (eastern basin), which generate anticyclonic eddies and gyres (Millot 2005). Furthermore, several biogeographical boundaries have been observed along the northeastern Atlantic (i.e. ca. 40°N-50°N, separating North Atlantic current and subtropical gyre, Gulf Stream) which tend to occur in association with major oceanographic gyres and main currents (Longhurst et al. 1995; Macpherson 2003). The role of these boundaries in the population structure of marine species is still unknown, although Palero et al. (2008a) observed a certain genetic differentiation between populations from Brittany and Ireland-Scotland (see also Gysels et al. 2004; Hoarau et al. 2007).

In order to study the variability and genetic differentiation found in exploited populations of the European spiny lobster, a total of 331 *Palinurus elephas* individuals from 10 different localities were analysed using 13 microsatellite markers. This sampling scheme, from Scotland to Greece and covering most of the present distribution of the species, will allow us to assess the genetic population structure between and within Atlantic and Mediterranean basins and to infer the effect of different oceanographic barriers. Furthermore, we also aim to analyse whether the present genetic variability and population structure of *P. elephas* is influenced by current and/or historical factors and describe the historical demography of the species.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples of *P. elephas* individuals ($n = 331$) were obtained from several localities covering most of the present distribution of the species (Table 1, Fig. 1). The sampled area included 10 different localities (Fig. 1): Western Scotland (WSCO): Oban; Western Ireland (WIRE): Galway; Brittany (BRIT): Le Conquet; Bay of Biscay (BISC): Gijón; South Portugal (SPOR): Sagres; Western Mediterranean (WMED): Cullera; North Western Mediterranean (NWME): Cap de Creus; Tunisia (TUNI): Tunis; Sicily (SICI): Isola delle Femmine; Greece (GREC), Dia Island. Total genomic DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc). Multiplex amplification reactions were carried out in a 10- μ L reaction containing 30 ng of genomic DNA, 0.5 \times QIAGEN Multiplex PCR Kit 2 \times and 0.2 \times of equimolar (1 mM) primer mix. The PCR thermal profile used was 94 °C for 10 min for initial denaturation, followed by 27 cycles of 94 °C for 30 s, 54 °C for 40 s and 72 °C for 30 s, and a final 20-min extension at 60 °C in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). The same set of 13 polymorphic microsatellite loci as in Palero et al. (2008b) was used. Amplified products were scored using an ABI 3770 automatic sequencer from the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona. Alleles were sized by PeakScanner™ software, with an internal size marker CST Rox 70–500 (BioVentures Inc.).

We employed CONVERT 1.2 to transform the excel-based dataset into different formats to be run by other population genetic programs (Glaubitz 2004). Mean number of alleles per locus, and observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities for each population were estimated with Microsatellite Toolkit v3.1 (Park 2001). Fis estimates according to Robertson and Hill (1984) and exact tests for conformity to Hardy-Weinberg expectations were obtained using the GENEPOP package version 4.0.7 (Rousset 2008). Where multiple tests were involved, significance levels were adjusted according to the sequential Bonferroni procedure. FreeNA was used for estimating null allele frequency at different loci and population differentiation taking null alleles into account (ENA method for estimating F_{ST} values; Chapuis and Estoup 2007). Given that the most suitable means of quantifying microsatellite allele frequency differentiation between samples is still a

matter of argument, depending upon the mutational model adopted, we follow O'Connell and Wright (1997) recommended conservative approach of conventional F-statistics. Therefore, pairwise F_{ST} values obtained with FreeNA were used to determine the degree of population subdivision among different populations. Moreover, the patterns of spatial genetic structure described as isolation-by-distance (IBD) models (Wright 1943) were evaluated using a Mantel test between the matrix of pairwise population differentiation in terms of $F_{ST}/(1-F_{ST})$ and the matrix of the natural logarithm of geographic distance as implemented in GENEPOP v4.0.7 (Rousset 2008). The distribution of genetic variance at different geographical levels was estimated by analyses of molecular variance (AMOVA) using Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005). We also ran the Bayesian clustering method of STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000), by assuming admixture, correlated allele frequencies between K groups, and no prior information on sample location for individuals. Models were run at $K=1-10$, and replicated 20 times at each K to confirm consistency of log-likelihood probabilities (Pritchard et al. 2000).

Finally, in order to carry out a multivariate analysis, an allele counting table was built and the empty cells with missing data were filled with the kth nearest neighbor algorithm implemented by the `knn()` function in the EMV package under R (Troyanskaya et al. 2001). For each individual with a missing value for a particular characteristic (locus), the method works by finding k individuals that have been scored for that characteristic and that have the smallest Euclidean distance from the target individual as measured from the other characters. The missing character value is then replaced by the weighted average of the values in the set of k individuals, where the weights are inversely proportional to the Euclidean distance. In the analysis here, we chose $k = 3$. In this way, we use 98% of the data at the cost of some approximation, whereas if we excluded the individuals that had missing data, a larger proportion would be lost. Ordinations on the microsatellite loci were performed with non-metric multidimensional scaling implemented in isoMDS from the MASS library in the R statistical package. Euclidean distances were used. This method avoids clustering of similar samples into groups as in tree building methods, but instead computes co-ordinates for each sample such that the distances between points fit as closely as possible to the measured distances between the

respective samples. A script for building an allele counting table and calling EMV and MASS functions has been implemented in R and is available from the authors upon request.

Understanding the effects of population bottlenecks on genetic variation has become increasingly important in population genetics, speciation theory, and conservation biology (Cornuet and Luikart 1997). In order to test for genetic evidence of population expansion and contraction, we carried out an empirical analysis of microsatellite variation using a hierarchical bayesian model. We consider the demographic history of a population that increases or decreases exponentially from an initial size N_1 to the current size N_0 , over a time interval x (Beaumont 1999). The loci are assumed to be evolving according to a strict single-step mutation model, with mutation rate μ . Allelic frequencies are used to infer the model parameters = $\{N_0, N_1, x, \mu\}$. Using a Bayesian approach the posterior probability density of the parameters is estimated given a prior density and the data. Parameters for each locus were assumed to be drawn from log-normal distributions. Prior distributions for the means were assumed to be specified by normal distributions with means $\alpha_{N_0} = \alpha_{N_1} = \alpha_x = 10^5$ and $\alpha_\mu = 10^{-3.5}$, and SDs $\sigma_{N_0} = \sigma_{N_1} = \sigma_x = 2$ and $\sigma_\mu = 0.25$. Priors for the SDs were taken to be normal distributions truncated at zero with means $\beta_{N_0} = \beta_{N_1} = \beta_x = \beta_\mu = 0$, and SDs $\tau_{N_0} = \tau_{N_1} = \tau_x = 0.2$ and $\tau_\mu = 0.5$. To make coalescent modelling easier, population size in the demographic models is expressed in units of N_0 generations with $v(t) = N(t)/N_0$. In addition, we define $r = N_0/N_1$ and $tf = ta/N_0$ (number of generations over which the population has been changing in size scaled by current population size). The hierarchical modelling approach used allows the posterior distribution of the mutation rate and the demographic parameters to vary among loci. Allowing inter-locus variation in demographic parameters (N_0, N_1, x, μ) makes our analysis more robust, and it enables us to detect aberrant loci that could potentially bias the results. In a model where the parameters are not allowed to vary, aberrant loci will have a strong effect because the likelihoods for individual loci are multiplied together. In contrast, in a hierarchical model the likelihoods are combined in a more additive fashion (Storz and Beaumont 2002).

To achieve reliable convergence in a reasonable amount of time, a random subset of 100 chromosomes from the whole dataset was taken. The chain was run for 2×10^9 steps, recording parameter values every 10^5 steps to give 20,000 draws from the posterior distribution. Five independent chains were run for each analysis presented in the Results. The output was checked for convergence using the Gelman-Rubin statistic calculated in CODA (Best et al. 1995), as implemented in R (<http://www.r-project.org/>). We examined plots of the value of the Gelman-Rubin statistic against iteration number to check that it was reliably converging toward its final value as recommended by Brooks and Gelman (1998). In addition, posterior densities from individual runs were examined to check for overall consistency in shape. The last half of each run was then combined to produce an overall set of 50,000 points. Density estimation was carried out using the program Locfit, implemented in R. This was used to estimate modes and highest probability density (HPD) limits. The HPD limits specify points of equal probability density enclosing a region (or possibly disjoint regions in multimodal data) with probability equal to some specified value. The strength of evidence of population growth versus population decline was assessed using Bayes factors as described in Beaumont (1999). Bayes factors greater than $\exp(2)$ are generally considered significant. The ratio of posterior probabilities can be estimated from the simulated chain by counting the proportion of iterations in which the population has expanded and then dividing this by the proportion of iterations in which it has contracted. Although extreme ratios vary among replicate chains due to sampling effects, ratios of 10 or less are generally similar among replicate chains for reasonable values of the Gelman-Rubin statistic.

RESULTS

Allele number per population varied from 9.8 to 14.4, with a mean value of 11.6 (Table 1). The amount of genetic variability was homogeneous among spiny lobster population samples as indicated by the low standard deviations associated to the estimated mean observed ($H_O = 0.598 \pm 0.025$) and expected ($H_E = 0.779 \pm 0.053$) heterozygosities. Three loci presented particularly high and statistically significant Fis values (PE22 = 0.552, PE53 = 0.459 and PE44 = 0.260), which caused global Fis values to be significant for every population (Table 1). Moreover, mean Fis value was 0.173 and dropped to 0.098 after excluding the three loci with higher values. This result may be due to the presence of null alleles in these loci as indicated by the FreeNA analyses. However, population differentiation estimates did not vary significantly when using the raw dataset ($F_{st} = 0.0093$) or when correcting for the presence of null alleles ($F_{st} = 0.0083$), which indicates that little population structuring is present within *Palinurus elephas*. Significant F_{st} values were found in comparisons between NWME with BRIT, BISC and TUNI, between SPOR with WIRE, BRIT, BISC and WMED, and between GREC and any population but NWME (Table 2). The mean pairwise F_{st} value for comparisons including GREC ($F_{st} = 0.012 \pm 0.004$) was 2 times larger than the mean pairwise F_{st} value for comparisons not including GREC ($F_{st} = 0.006 \pm 0.005$). Mean F_{st} value obtained for pairwise comparisons within basins (0.006 ± 0.005) was slightly lower than mean F_{st} value obtained for pairwise comparisons among basins (0.009 ± 0.005). Interestingly, population structuring within the Mediterranean (Mediterranean = 0.006 ± 0.004) was reduced after excluding GREC from the within Mediterranean pairwise comparisons (0.004 ± 0.003). When the correlation of pairwise genetic distances (F_{ST}) to geographic distances was analyzed using the Mantel test, a shallow although significant correlation was detected ($R^2 = 0.109$; $P = 0.029$), which indicates a pattern of isolation by distance (Fig. 2). However, this pattern was caused mainly by the GREC population, since the trend was not significant after excluding it from the analysis ($R^2 = 0.011$; $P = 0.181$) (Fig. 2).

A Global Analysis of Molecular Variance as a weighted average over loci was carried out to compare the Atlantic and Mediterranean populations and the effect of several proposed barriers (Table 3). The partitioning of the genetic variance among Atlantic and Mediterranean basins showed most of the variability to be explained by genetic variation within individuals (76.48%) and among individuals within populations (22.42%). Nevertheless, the amount of genetic variation explained by differences among populations within groups (0.70%) was not significant. The amount of genetic variation explained by differences among groups (0.40%) was small but significant. Thus, even though the percentage of the variability explained by differences between Atlantic and Mediterranean basins was less than 1%, the differences were statistically significant. Similar results were obtained when the GREC population was excluded from the analysis (Table 3). Neither the Gulf Stream nor the Eastern-Western Mediterranean discontinuities provide significant AMOVA results. These results could be explained by a sample size effect, since AMOVA analyses were not able to find a statistically significant effect of the Almeria-Oran Front (AOF) when a smaller sample size was used (Table 3). The MDS using the individual matrix did not show any visible structure on the data, with individuals from both basins mixing together (supplementary data, S1). The most likely scenario obtained using the Bayesian clustering method of STRUCTURE 2.2, was that of a single panmictic population ($K=1$; Ln Prob of Data = -17337.34 ± 1.59) (supplementary data, S2). However, it should be pointed out that STRUCTURE is not able to define conclusively the number of clusters (K) present in a sample when F_{st} values are small and the probability of the data is similar for different values of K (Pritchard et al. 2000).

Even though there is some indication of population expansion, our results show fairly constant historical population sizes in *P. elephas*. The Gelman-Rubin convergence statistics for the four demographic and mutational parameters were (upper 97.5% quantile is given in parentheses) N_0 : 1.03 (1.08); N_1 : 1.00 (1.01); μ : 1.00 (1.00); and T_f : 1.03 (1.08). The posterior distribution of N_0 and N_1 for the *P. elephas* dataset is shown in Figure 3A. The first and third quartiles obtained from the combined runs dataset indicate that current population sizes would range from $10^{4.11}$ - $10^{4.67}$, while ancestral population sizes would range from $10^{3.03}$ - $10^{4.38}$. The posterior distribution of the mean mutation rate

μ , had a mean of -3.52 (SD = 0.24) and was therefore very similar to the prior. This was not surprising given the broad priors on N_0 and N_1 , and it should be emphasized that the results presented here on population sizes (but not their ratios) and times of events are highly dependent on the priors set for μ (Beaumont 1999). In addition, we defined $r = N_0/N_1$. If $r < 1$, the population has declined; if $r = 1$, the population has remained stable; and if $r > 1$, the population has expanded. Our results agree with having fairly constant population sizes in *Palinurus elephas* with a slight population expansion, since the r values ranged from -2 to 4 and were centered at about 0.5 (Fig. 3B). The presence of two peaks results from a limited amount of information on the microsatellite dataset about population changes occurring in a very recent time frame or extremely long time scales (Beaumont 1999; see Discussion). The Bayes factor for growth versus decline was 3.957 (< 7.389), which cannot be considered significant, and the posterior probability of growth was 0.79. There is little information on the time scale of population change in this species, given that a constant population size would be the most likely scenario. Mean coalescence time (on log scale) for the loci studied was 4.82 ± 0.88 , which would correspond to a range of 8,800-50,000 years ago.

DISCUSSION

The biological characteristics of the spiny lobsters, like their high larval dispersal capacities, together with the apparent lack of physical barriers to gene flow in the sea make the study of population genetic variation of these crustaceans particularly interesting. The amount of variability found in *P. elephas* microsatellite markers, gene diversity measures and F_{IS} values are similar to those found using microsatellites in other marine decapods (Robainas et al. 2002; Urbani et al. 1998; Yap et al. 2002), and observed heterozygosity values ($H_O = 0.598 \pm 0.03$) are consistent with the mean haplotype diversity values observed using the COI mtDNA region ($H_d = 0.588 \pm 0.03$) (Palero et al. 2008a). As for the population structure pattern, the microsatellite data points to the existence of a single evolutionary unit with very weak although significant genetic structuring. The populations pairwise comparison ($F_{ST} = 0.0083$) also agrees with the results inferred using mtDNA markers ($F_{ST} = 0.014$) (Palero et al. 2008a). It is worth noting that F_{ST} values for mtDNA are expected to be higher than autosomal values (Withlock and McCauley 1999). The four-fold greater effective population size of autosomal loci compared to mtDNA virtually ensures that F_{ST} values based on the latter will be substantially greater than values based on the former, and in fact this is nearly always observed in population studies (but see González and Zardoya 2007). Since mtDNA is maternally inherited, it should be pointed out that sex-biased dispersal can also play a role in elevating F_{ST} for species in which males disperse over greater distances than do females (Carreras et al. 2007).

Very weak genetic structuring is common amongst pelagic marine organisms and has already been observed in several taxonomic groups, from fish to crustacea (Knutsen et al. 2003; Maggioni et al. 2003). However, given that adult spiny lobsters are sedentary benthic crustaceans, the cause for *P. elephas* to show similar weak population structuring to that found in pelagic marine organisms would be the high dispersal ability of phyllosoma larvae. The fact that the most differentiated population was the GREC population is consistent with Eastern Mediterranean having very low influence of Atlantic waters due to the known oceanographical features in the area (Malanotte-Rizzoli

et al., 1999). The large East Levantine Water eddy in Eastern Mediterranean could be causing isolation of phyllosoma larvae, since eddies and oceanographic gyres may last several months and thus retain even larvae with very long PLD. Indeed, it has been shown that some Mediterranean eddies (e.g. Algerian Eddy) may present lifetimes near 3 years long (Puillat et al. 2002). The Greek population is presenting a pattern of isolation by distance when compared to all the other populations and is the cause of the artifactual isolation by distance pattern observed in the overall comparison. Finally, even though the grouping accounted for less than 1% of the genetic variation, Atlantic and Mediterranean basins showed significant differences, indicating that some structure could be present even after excluding Greece from the analysis. This significant differentiation among basins was also found when analysing *P. elephas* populations with the COI gene region and has been described in several marine species (Patarnello et al., 2007; Palero et al. 2008a). Interestingly, neither the Gulf Stream nor the Eastern-Western Mediterranean discontinuities provide significant AMOVA results, which could be explained by a sample size effect. Population genetic differentiation and effective number of migrants are tightly related under the assumed Wright model ($F_{st} = 1 / (1+4Nm)$) (Withlock and McCauley 1999). Given a particular F_{st} value, the fraction of the population that are immigrants (m) will be much lower in those species with a larger population effective size. For example, Palumbi (2003) found that assuming a population effective size of 10^3 , a slope of 0.01/1000km would correspond to a mean dispersal distance of 150km under a one-dimensional stepping-stone model. In the present study, the slope obtained when using the complete dataset was 0.0015/1000km. Given that our estimates for current population sizes in *Palinurus elephas* range from $10^{4.11}$ - $10^{4.67}$, even a slope for F_{st} change as low as 0.001/1000km would correspond to mean dispersal distances lower than expected given the long PLD of *P. elephas* (1,300-2,500km). Therefore, the global F_{st} value indicates a very low but significant genetic differentiation suggesting that restrictions to larval dispersal would be acting for this species. Consequently, the same result should be inferred for several exploited decapod crustaceans that show a similar genetic pattern with low F_{st} values and large population effective size (e.g. *Nephrops*, Stamatis et al., 2004; *Homarus*, Triantafyllidis et al., 2005; *Maja*, Sotelo et al., 2008).

In our previous study using COI data, we found evidence for a genetic bottleneck caused by either selection or demography (Palero et al. 2008a). However, given that we only sequenced a portion of the COI gene and that mtDNA acts as a single locus, selection acting elsewhere on the mtDNA molecule and mimicking a demographic bottleneck could not be discarded. Bazin et al. (2006) concluded in a recent study that mtDNA might, in fact, be a poor indicator of population size, and suggested that frequent episodes of natural selection would make the average amount of mitochondrial nucleotide polymorphism to be invariant across taxa spanning a wide range of population sizes (Gillespie's 'draft hypothesis': Gillespie 2000). According to the draft hypothesis, the reduction in variation caused by recurrent selective sweeps balances the expected greater levels of neutral diversity in larger populations, making variation independent of population size. The hierarchical bayesian approach used in the present study allowed us to integrate independent genetic estimates of past demography obtained from the unlinked set of microsatellite loci. Our results point to fairly constant historical population sizes in *Palinurus elephas* with some indication of slight population expansion and therefore support the conclusions of Bazin et al. (2006) that challenge the utility of mtDNA variation as a reliable indicator of population size.

When a randomly mating population passes through a bottleneck, reduction of genetic diversity depends on population size and time according to $H_t = H_0(1 - 1/(2Ne))^t$. The long generation time of *P. elephas* could have minimized genetic drift and acted as an intrinsic buffer against rapid loss of genetic diversity (Dinerstein and McCracken 1990). A bottleneck lasting about 30–40 years would imply a lower loss of genetic diversity for an organism with large effective population size and a very long generation time like *Palinurus elephas* (Allendorf 1986; Dinerstein and McCracken 1990). In this regard it should be noted that our analysis does not entirely rule out the possibility of a reduction in population size on a very recent timescale (Fig. 3B). Population genetics theory suggests that genetic diversity is significantly reduced only in very small populations (Rice 2004), or for very strong founder effects (Pascual et al., 2007); therefore even “collapsed” stocks such as those of sardines (González and Zardoya, 2007) or lobsters as in the present study, may consist of far too many individuals to show

declines in genetic diversity measurable with feasible sample sizes. Therefore, the biology of the European spiny lobster could cause molecular data to infer constant, or even expanding, historical population sizes when in fact there has been a recent reduction in census size.

Directional human impact could also be unintentionally masking the genetic consequences of population size reduction. If population size was decreasing while connectivity was decreasing too (e.g. due to localised overfishing), then we would infer that population size has been stable for the metapopulation despite a reduction in overall census size (Wakeley's 'many demes model': Wakeley 2004, 2005). Furthermore, it should be noticed that larger female *P. elephas* produce both more eggs (Ceccaldi and Latrouite, 1994) and larger larvae that survive longer under conditions of low food supply (Kittaka and MacDiarmid 1994). Fishing of the European spiny lobster has usually targeted mainly large individuals, making the age structure to shift towards a smaller mean carapace length in several localities (Portugal, Galhardo et al. 2006; Corsica, Marin 1987). An average female of an unexploited area (CL = 120mm) would produce about twice as many eggs as a female of an overexploited area (CL = 90mm) (Goñi et al. 2003). Therefore, the reduction in the number of large females would reduce the variance of reproductive success, since more individuals will contribute a higher proportion of descendants to the next generation. As a consequence, the effective size of a population would be artificially enlarged and could seem to expand even though the census size or number of individuals is actually decreasing (Rice 2004).

Most marine species show an age class structure with high mortalities concentrated on the early stages, so that repeated reproduction during an individual's life will increase its overall contribution to the next generation (Murphy 1968). In these species, a year with strong recruitment produces a cohort of adults that survives over a number of potential reproductive periods ('storage effect': Warner and Chesson 1985). Strong recruitments are essentially stored in the adult population and are capable of maintaining genetic variability in heterogeneous environments (Ellner and Hairston 1994). High recruitment variability due to fluctuations in oceanographic regimes would directly affect

P. elephas populations, since larvae spend at least 4–5 months in offshore waters and natural mortality is inversely proportional to size (Hunter 1999; Diaz et al. 2005). Therefore, when the age-structure is altered (i.e. due to overfishing) populations relying on new recruits would be much more sensitive to chance events reducing larval survival. The larger the generation overlap, the smaller the impact of environmental fluctuations on the level of genetic variability (Gaggiotti and Vetter 1999), so that maintaining the age structure is fundamental for the conservation of genetic variation in *P. elephas* populations.

CONCLUSION

Our results show that very low but significant population genetic structuring is present in the European spiny lobster. The most differentiated population is the Greek population, which is consistent with the isolation of phyllosoma larvae in the large East Levantine Water eddy in Eastern Mediterranean. On the other hand, Atlantic and Mediterranean basins showed significant differences even when the Greek population is excluded from the analysis, which indicates that some structure could be present. Even though over-fishing has reduced catches dramatically all over its distribution area, historic effective population size of *P. elephas* seems to have remained constant. This apparently contradictory result could be accounted for by the biology of the species and the limitations of molecular markers in covering very recent timescales when the effects are not dramatically strong. Most importantly, we noticed that the large effective population size of *P. elephas* ($N_e = 13,000-47,000$) would cause F_{st} values to be extremely small even for populations with restricted levels of dispersal. Taking this fact into account, dispersal capabilities of the European spiny lobster would be much lower than expected under its long PLD. Finally, management strategies for conservation and fishing policies of this species should consider Atlantic and Mediterranean populations as different stocks, and the Eastern Mediterranean population should be considered a different management unit within the Mediterranean basin. Our results illustrate the importance of considering historical demography and life history parameters when

evaluating connectivity patterns in marine organisms and studying the effects of overfishing on the genetic structuring of exploited species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study could not have been carried out without the willing help of those listed below in collecting spiny lobster specimens and providing helpful information and discussions: J Gironès, Prof. D Latrouite, Dr. M Castro, Dr. M Gristina, Dr. N Peristeraki, Dr. K Hiscock, E Palero, N Pascual, D Diaz and N Zaragoza. This work was supported by a pre-doctoral fellowship awarded by the Autonomous Government of Catalonia to F P (2006FIC-00082). Research was funded by projects CGL2006-13423, CTM2007-66635 from the Ministerio de Educación y Ciencia. The authors are part of the research groups 2005SGR-00191, 2005SGR-00277 and 2005SGR-00995 of the Generalitat de Catalunya. FP acknowledges EU-Synthesys grant (GB-TAF-1637).

BIBLIOGRAPHY

Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology* **5**, 181-190.

Avise JC (1998) Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity* **89**, 377-382.

Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avise JC (2004) *Molecular Markers. Natural History and Evolution.*, 2 nd edn. Chapman & Hall.

Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* **312**, 570-572.

Beaumont MA (1999) Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* **153**, 2013–2029.

Best NG, Cowles MK, Vines SK (1995) CODA: Convergence Diagnosis and Output Analysis Software for Gibbs sampling output, Version 0.3. MRC Biostatistics Unit, Cambridge.

Brooks SP, Gelman A (1998) General Methods for Monitoring Convergence of Iterative Simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **7**, 434-455.

Carreras C, Pascual M, Cardona L, *et al.* (2007) The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conservation Genetics* **8**, 761-775.

Ceccaldi H, Latrouite D (1994) The french fisheries for the European spiny lobster *Palinurus elephas*. In: *Spiny lobster management*. (eds. Phillips B, Cobb J, Kittaka J), pp. 169-177.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.

Cornuet JM, Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.

- DeMartini EE (1993) Modeling the potential of fishery reserves for managing Pacific coral reef fishes. *Fisheries Bulletin* **91**, 414–427.
- Dinerstein E, McCracken G (1990) Endangered Greater One-horned Rhinoceros Carry High Levels of Genetic Variation. *Conservation Biology* **4**, 417-422.
- Ellner SP, Hairston NG (1994) Role of overlapping generations in maintaining genetic variation in a fluctuating environment. *American Naturalist* **143**, 403-417.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Follesa MC, Cuccu D, Cannas R, *et al.* (2008) Effects of marine reserve protection on spiny lobster (*Palinurus elephas* Fabr., 1787) in a central western Mediterranean area. *Hydrobiologia* **606**, 63-68.
- Follesa MC, Cuccu D, Cannas R, Sabatini A, Cau A (2007) Emigration and retention of *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) in a central western Mediterranean marine protected area. *Scientia Marina* **71**, 279-285.
- Gaggiotti OE, Vetter RD (1999) Effect of life history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**, 1376-1388.
- Galhardo AC, Serafim P, Castro M (2006) Aspects of the biology and fishery of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) from the southwest coast of Portugal. *Journal of Crustacean Biology* **26**, 601-609.
- Gillespie JH (2000) Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics* **155**, 909-919.
- Glaubitz J (2004) CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology* **4**, 309-310.
- Goni R, Latrouite D (2005) Review of the biology, ecology and fisheries of *Palinurus spp.* species of European waters: *Palinurus elephas* Fabricius, 1787 and *Palinurus mauritanicus* Gruvel, 1911. *Cahiers de Biologie Marine* **46**, 127-142.

Goni R, Quetglas A, Renones O (2003) Size at maturity, fecundity and reproductive potential of a protected population of the spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) from the western Mediterranean. *Marine Biology* **143**, 583-592.

Goni R, Quetglas A, Renones O (2006) Spillover of lobsters *Palinurus elephas* from a marine reserve to an adjoining fishery. *Marine Ecology Progress Series* **308**, 207-219.

González EG, Zardoya R (2007) Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology* **7**, 197-209.

Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology* **13**, 403-417.

Hepper BT (1977) The fishery for crawfish, *Palinurus elephas*, off the coast of Cornwall. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.* **57**, 925-941.

Hindar K, Tufto J, Sættem LJ, Balstad T (2004) Conservation of genetic variation in harvested salmon populations. *ICES Journal of Marine Science* **61**, 1389-1397.

Hoarau G, Coyer JA, Veldsink JH, Stam WT, Olsen JL (2007) Glacial refugia and recolonization pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Molecular Ecology* **16**, 3606-3616.

Holthuis LB (1991) *Marine Lobsters of the world*. Fisheries synopses, 125. FAO, Rome.

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

Jennings S (2000) Patterns and prediction of population recovery in marine reserves. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 209-231.

Kittaka J, Macdiarmid A (1994) Breeding. In: *Spiny Lobster Management* (eds. Phillips B, Cobb J, Kittaka J), pp. 384-401. Fishing News Books, London.

Knutsen H, Jorde PE, Andre' C, Stenseth NC (2003) Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology* **12**, 385-394.

Longhurst A, Sathyendranath S, Platt T, Caverhill C (1995) An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of Plankton Research* **17**, 1245-1271.

Macpherson E (2003) Species range size distributions for some marine taxa in the Atlantic Ocean: effect of latitude and depth. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**, 437-455.

Maggioni R, Rogers AD, Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology* **12**, 3213-3217.

Marí M, Díaz D, Abelló P, Zabala M (2002) Avaluació temporal de les poblacions de llagosta (*P. elephas*) en les Illes Medes. In: *Evolució del patrimoni natural de les Illes Medes* (ed. Zabala M), pp. 62-69. Direcció General de Pesca Marítima, Generalitat de Catalunya, Barcelona.

Marin J (1987) *Exploitation, biologie et dynamique du stock de langouste rouge de Corse, Palinurus elephas Fabricius.*, Université d'Aix-Marseille.

Moran AL, Marko PB (2005) A simple technique for physical marking of marine bivalves. *Journal of Shellfish Research* **24**, 567-572.

Murphy GI (1968) Pattern in life history and the environment. *American Naturalist* **102**, 391-403.

Naylor E (2006) Orientation and navigation in coastal and estuarine zooplankton. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **39**, 13-24.

O'Connell M, Wright JM (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 331-363.

Palero F, Abelló P (2007) The first phyllosoma stage of *Palinurus mauritanicus* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). *Zootaxa* **1508**, 49-59.

Palero F, Abelló P, Macpherson E, Gristina M, Pascual M (2008a) Phylogeography of the european spiny lobster (*Palinurus elephas*): influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**, 708-717.

Palero F, Abelló P, Macpherson E, Matthee C, Pascual M (2008b) Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795. *Conservation Genetics* (in preparation).

Palumbi S (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* **13**, S146-S158.

Park SDE (2001) *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection*, University of Dublin.

Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* **16**, 3069-3083.

Patarnello T, Volckaert F, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology* **16**, 4426–4444.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

Puillat I, Taupier-Letage I, Millot C (2002) Algerian Eddies lifetime can near 3 years. *Journal of Marine Systems* **31**, 245–259.

Rice SH (2004) *Evolutionary Theory: Mathematical and Conceptual Foundations* Sinauer Associates, PO Box 407, Sunderland, MA.

Robainas A, Monnerot M, Solignac M, *et al.* (2002) Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Ecology Notes* **2**, 344-345.

Robertson A, Hill WG (1984) Deviations from hardy-weinberg proportions: Sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* **107**, 703-718.

Rousset F (2008) Genepop'007 : a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.

Scheltema RS (1986) On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates: an eclectic overview and summary of problems. *Bulletin of Marine Science* **39**, 290-322.

Shanks A, Grantham B, Carr M (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications* **13**, S159-S169.

Storz JF, Beaumont MA (2002) Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* **56**, 154-166.

Thorson G (1950) Reproductive Larval Ecology of Marine Invertebrates. *Biological Reviews* **25**, 1-45.

Tintoré J, Wang DP, García E, Viúdez A (1995) Near inertial motions in the coastal ocean. *Journal of Marine Systems* **6**, 301–312.

Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G, *et al.* (2001) Missing Value Estimation Methods for DNA Microarrays. *Bioinformatics* **17**, 520–525.

Tufto J, and Hindar, K. (2003) Effective size in management and conservation of subdivided populations. *Journal of Theoretical Biology* **222**, 273-281.

Urbani N, Sevigny JM, Sainte-Marie B, Zadworny D, Kuhnlein U (1998) Identification of microsatellite markers in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Molecular Ecology* **7**, 357-358.

Wakeley J (2004) Metapopulation models for historical inference. *Molecular Ecology*. **13**, 865-875.

Wakeley J (2005) The limits of theoretical population genetics. *Genetics* **169**, 1-7.

Warner RR, Chesson PL (1985) Coexistence mediated by recruitment fluctuations - A field guide to the storage effect. *American Naturalist* **125**, 769-787.

Whitlock M, McCauley D (1999) Indirect measure of gene flow and migration: F_{ST} does not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity* **82**, 117-125.

Whitlock MC, Barton NH (1997) The effective size of a subdivided population. *Genetics* **146**, 427-441.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114–138.

Yap ES, Sezmis E, Chapin JA, Potter IC, Spencer PBS (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae). *Molecular Ecology Notes* **2**, 30-32.

Figure Legends.

Figure 1. Sampled *Palinurus elephas* localities. Western Scotland (WSCO): Oban; Western Ireland (WIRE): Galway; Brittany (BRIT): Le Conquet; Bay of Biscay (BISC): Gijón; South Portugal (SPOR): Sagres; Western Mediterranean (WMED): Cullera; North Western Mediterranean (NWME): Cap de Creus; Tunisia (TUNI): Tunis; Sicily (SICI): Isola delle Femmine; Greece (GREC): Dia Island.

Figure 2. Correlation in *Palinurus elephas* populations between genetic and geographic distances. Symbols indicate comparisons including the GREC (■) or not including the GREC population (□).

Figure 3. Population demography estimates based on microsatellite loci data from *Palinurus elephas*. A) Joint posterior distribution of N_0 (contemporary population size) and N_1 (ancestral population size). The 90%, 50%, and 10% highest probability density (HPD) limits are plotted for the joint distribution of N_1 and N_0 on a \log_{10} scale. The diagonal line corresponds to $N_0 = N_1$. B) Plot of the marginal posterior distribution of $\log_{10}(r)$ and $\log_{10}(t)$ for the European spiny lobster dataset. HPD limits for the joint distribution of r and t under the hierarchical model are plotted as a continuous line. HPD limits for the prior in the hierarchical model are shown as dotted lines.

Fig 1.



Fig 2.

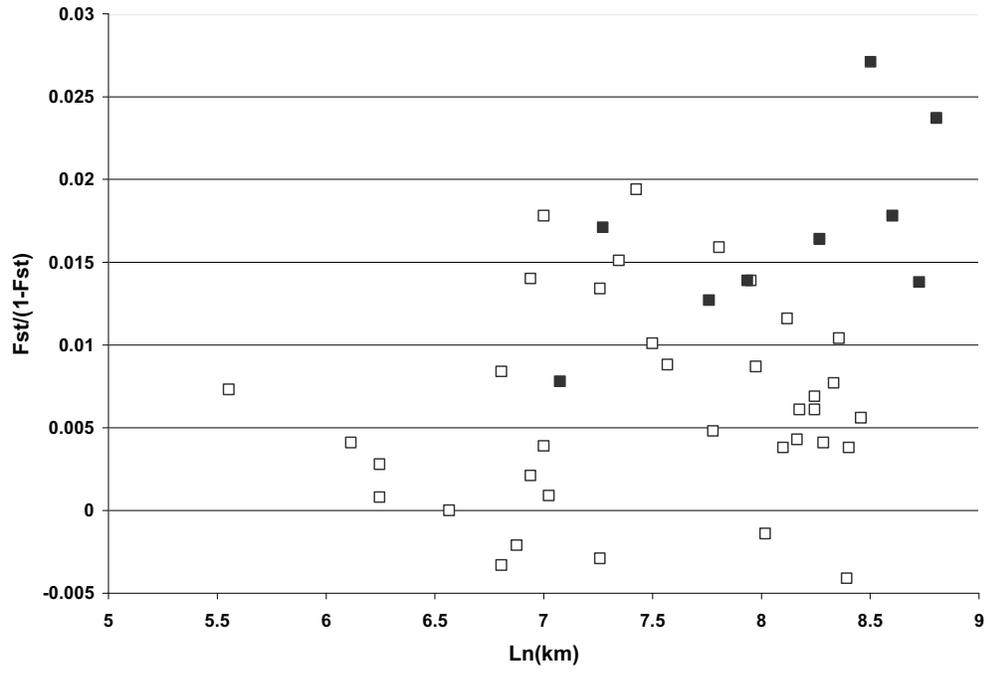


Fig 3A.

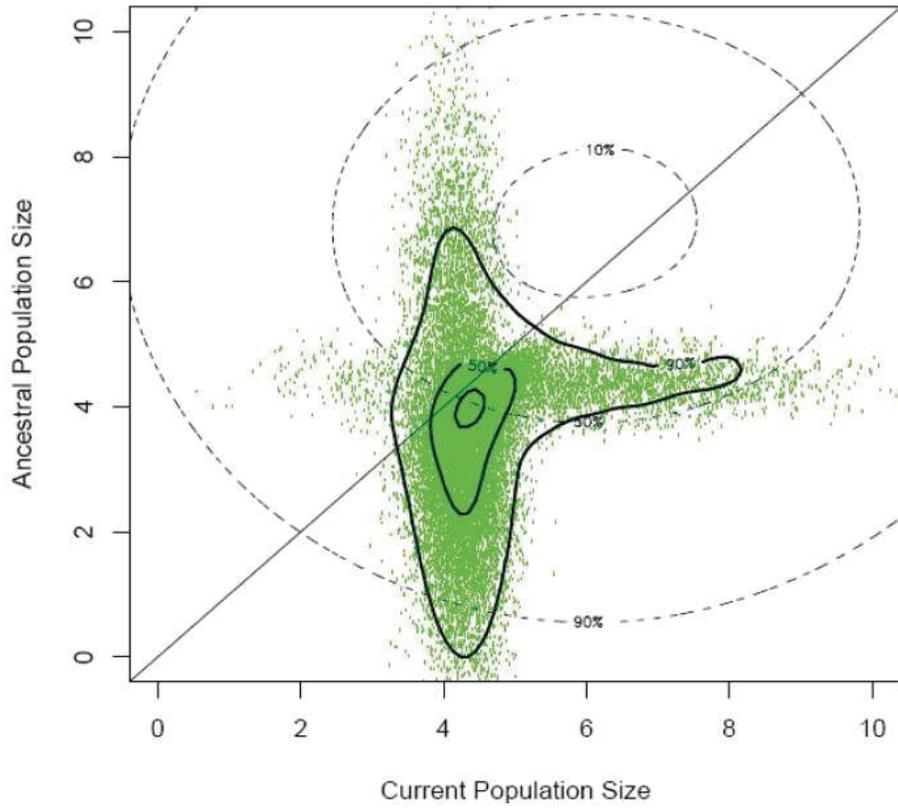


Fig 3B.

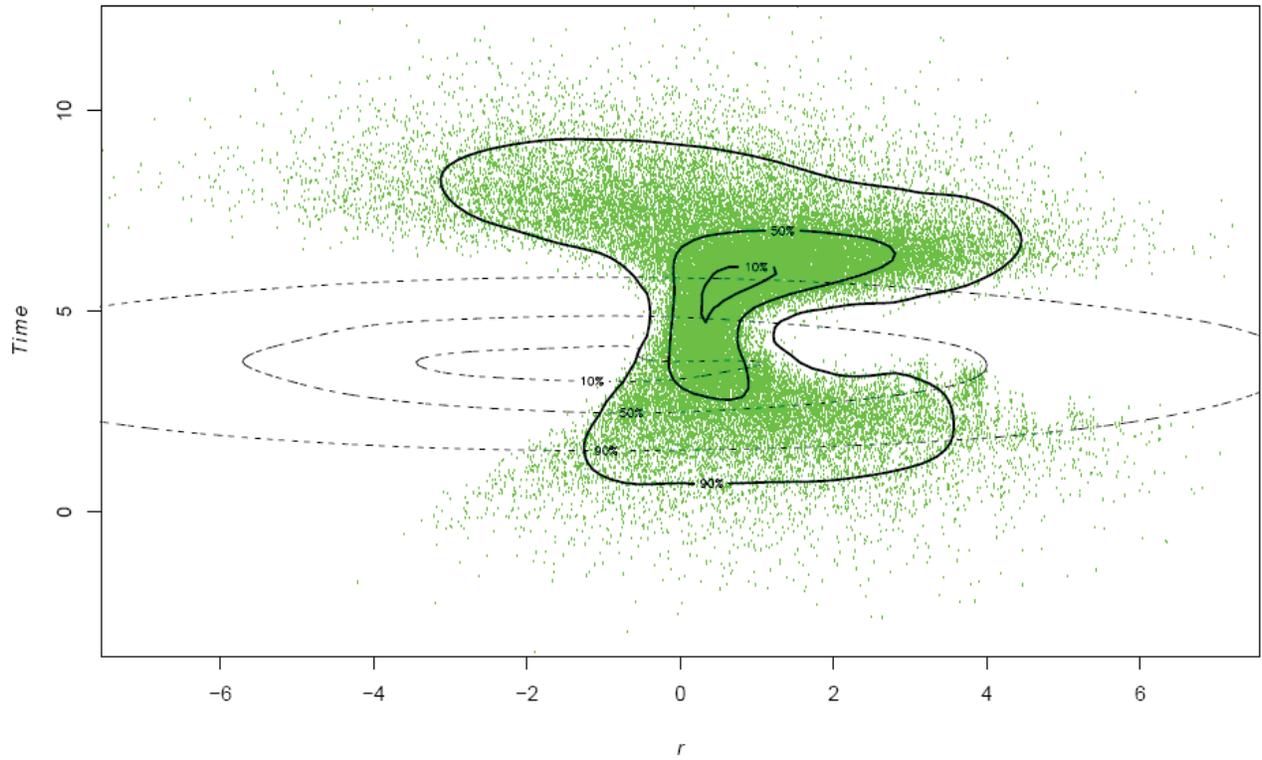


Table 1. Mean number of alleles (n), observed (HO) and expected (HE) heterozygosities and the inbreeding coefficient (Fis) values obtained for each population.

Population	N	n _A	Ho ±sd	He ±sd	Fis
WSCO	24	10.5	0.546 ± 0.029	0.782 ± 0.051	0.269
WIRE	24	10.4	0.585 ± 0.028	0.790 ± 0.051	0.237
BRIT	24	10.8	0.644 ± 0.027	0.779 ± 0.055	0.124
BISC	24	11.5	0.625 ± 0.028	0.800 ± 0.049	0.182
SPOR	54	14.4	0.668 ± 0.018	0.783 ± 0.052	0.114
WMED	59	13.4	0.603 ± 0.019	0.783 ± 0.050	0.160
NWME	50	13.2	0.585 ± 0.020	0.776 ± 0.051	0.152
TUNI	24	10.8	0.532 ± 0.029	0.766 ± 0.058	0.187
SICI	24	10.7	0.635 ± 0.028	0.793 ± 0.046	0.114
GREC	24	9.8	0.557 ± 0.029	0.743 ± 0.063	0.191
Total	331	18.5	0.598 ± 0.025	0.779 ± 0.053	0.173

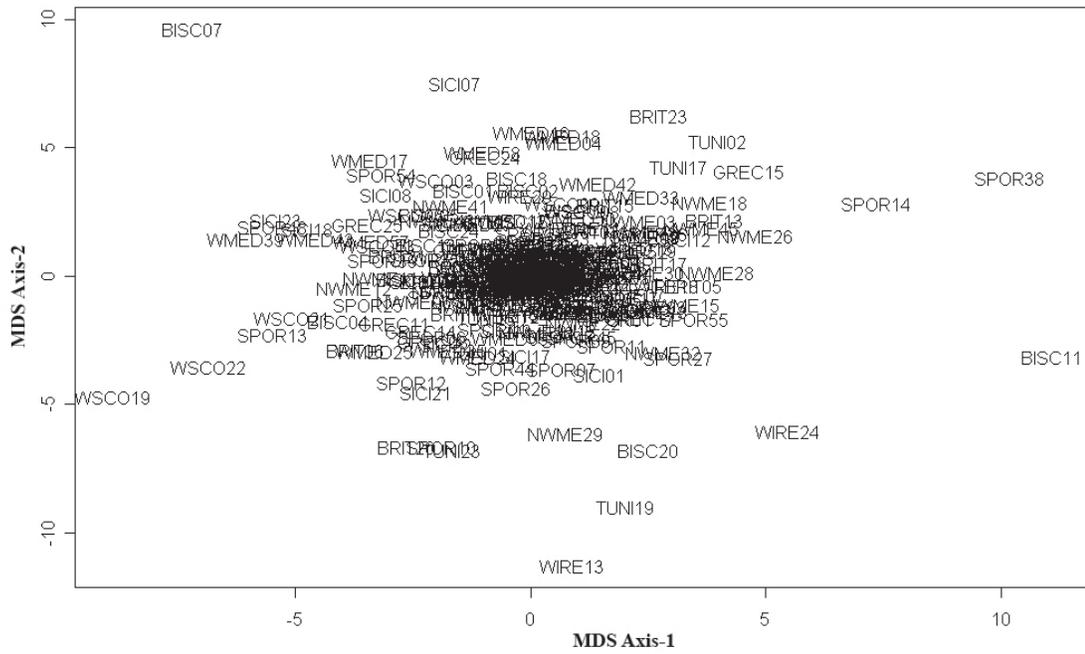
Table 2. Fst values among population pairs before (below diagonal) and after (above diagonal) correcting for the presence of null alleles. The significant Fst values are shown in bold.

	WSCO	WIRE	BRIT	BISC	SPOR	WMED	NWME	TUNI	SICI	GREC
WSCO		0.0028	-0.0033	-0.0029	0.0157	0.0068	0.0103	0.0038	0.0056	0.0232
WIRE	0.0033		0.0000	0.0009	0.0100	0.0043	0.0041	0.0077	-0.0041	0.0137
BRIT	0.0007	0.0023		0.0008	0.0132	0.0087	0.0115	0.0060	0.0061	0.0175
BISC	-0.0023	0.0020	0.0027		0.0138	0.0048	0.0138	-0.0014	0.0038	0.0264
SPOR	0.0137	0.0105	0.0130	0.0125		0.0175	0.0149	0.0190	0.0087	0.0161
WMED	0.0060	0.0053	0.0090	0.0058	0.0161		0.0041	0.0021	0.0038	0.0137
NWME	0.0073	0.0046	0.0097	0.0102	0.0129	0.0030		0.0084	-0.0022	0.0125
TUNI	0.0038	0.0071	0.0071	-0.0009	0.0173	0.0031	0.0073		0.0073	0.0168
SICI	0.0050	-0.0022	0.0057	0.0029	0.0078	0.0035	-0.0014	0.0069		0.0078
GREC	0.0162	0.0113	0.0114	0.0190	0.0125	0.0105	0.0098	0.0132	0.0067	

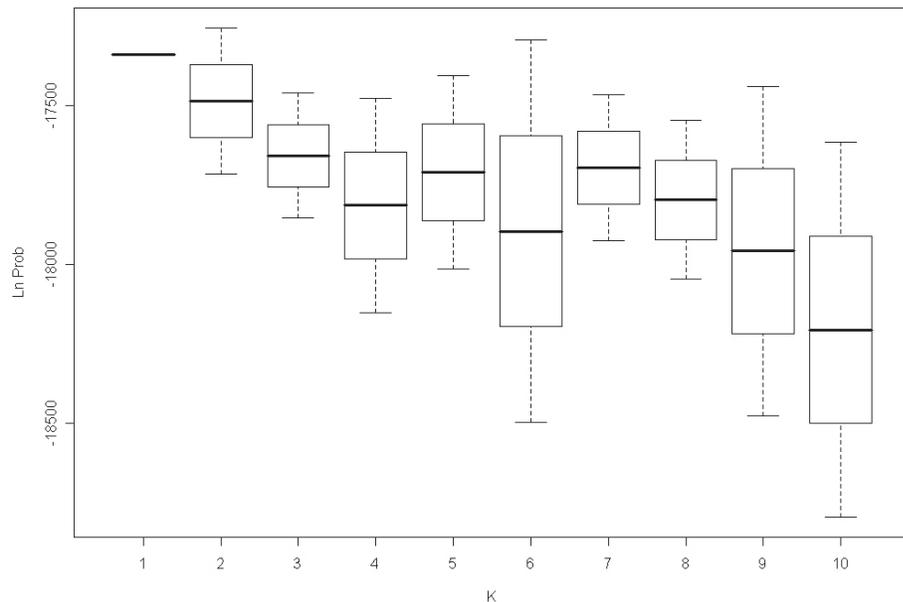
Table 3. Global Analyses of Molecular Variance as a weighted average over loci carried out to compare the effect of several marine barriers on the genetic structuring of *P. elephas* populations. Significant results are indicated in bold.

<i>P.elephas</i> populations	sample size	Barrier	Percentage	P-value
SICI+TUNI-GREC	72	East-MED	0.414	0.292
NWME+WMED-SPOR	163	AOF	0.523	0.312
SICI+TUNI-SPOR	102	AOF	1.169	0.100
ATL-MED	331	AOF	0.397	0.014
ATL-MED (NO GREC)	307	AOF	0.407	0.015
BISC+BRIT-WSCO+WIRE	96	Gulf-Stream	-0.323	0.945

Supplementary data, S1. The Multidimensional scaling (MDS) analysis using the individual matrix did not show any visible structure on the data, with individuals from both basins mixing together.



Supplementary data, S2. The Bayesian clustering method of STRUCTURE 2.2 was not able to detect any population structure for this dataset, since the most likely scenario obtained was that of a single panmictic population ($K=1$; Ln Prob of Data = -17337.34 ± 1.59).



4.- DISCUSSIÓ GENERAL

4.1. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de divergències antigues i Sistemàtica de les llagostes de l'infraordre Achelata (Scholtz and Richter, 1995).

La revisió de l'estat actual de la inferència filogenètica a partir de dades moleculars duta a terme en aquest treball ens ha apropat als mètodes més habituals per inferir les relacions filogenètiques entre diferents taxa (publicació 1). La Màxima parsimònia (MP) busca trobar l'arbre compatible amb un nombre mínim de substitucions entre seqüències. Trobar el cladograma més parsimoniós és normalment una tasca computacionalment intensiva i, tot i que es poden emprar els ràpids algorismes heurístics, no poden garantir trobar el cladograma òptim. L'anàlisi per parsimònia s'ha criticat perquè exigeix assumpcions molt estrictes, com ara la constància en les taxes de substitució entre gens o llinatges. Així, el rendiment de la MP es deteriora quan les taxes mutacionals difereixen entre nucleòtids o gens (Yang, 1996) o si les taxes evolutives són variables entre llinatges (Hendy and Penny, 1989). A mesura que s'analitzen seqüències més divergents, el grau global d'homoplàsia generalment augmenta, i això fa menys probable que l'arbre amb el menor nombre de canvis siga l'arbre real. A més, quan dos llinatges evolutius que han sofert un nivell alt d'evolució estan separats per un llinatge curt, els llinatges llargs tendiran a unir-se de manera espúria. La combinació de condicions quan això ocorre s'anomena la 'Zona de Felsenstein', i la parsimònia és especialment sensible a aquest problema (Huelsenbeck and Crandall, 1997). Per altra banda, els mètodes de MP tenen alguns avantatges sobre altres mètodes filogenètics. L'anàlisi per parsimònia és molt útil per tractar amb caràcters morfològics o amb dades moleculars tipus insercions/deleccions. Els mètodes per distàncies, com ara el Neighbour Joining (NJ), tracten de reconstruir la topologia que millor represente la matriu de distàncies entre parells de taxa. Tanmateix, l'algoritme de NJ no garanteix trobar la millor solució global a una matriu de distàncies (Pearson et al., 1999). A més a més, el problema més seriós amb els mètodes de distàncies és que exigeixen una mesura fiable de les distàncies evolutives entre seqüències. Quan les taxes d'evolució varien entre posicions d'una seqüència, cal corregir les distàncies obtingudes. En mètodes basats en models

probabilístics, la correcció pot utilitzar informació de canvis en una part de l'arbre per corregir-ne d'altres, però un mètode de distàncies és inherentment incapaç de propagar la informació d'aquesta manera. Així, els mètodes de distàncies utilitzen la informació sobre variació en les taxes de mutació de forma substancialment menys eficaç que els mètodes probabilístics (Felsenstein 2004). Els mètodes basats en models probabilístics (p.e. màxima versemblança i inferència Bayesiana) permeten l'aplicació de models matemàtics que incorporen el nostre coneixement sobre els patrons típics d'evolució de seqüències, i així fer inferències més potents. A més, utilitzen una metodologia estadística que permet testar diferents hipòtesis, amb la validació dels resultats en totes les fases de l'anàlisi: es poden testar els valors dels paràmetres en models evolutius, els diferents models d'evolució, i fins i tot diferents hipòtesis de relació evolutives. Tanmateix, els mètodes de màxima versemblança (ML) no assignen directament probabilitats als paràmetres del model i, si volem descriure la incertesa en un paràmetre, hem de repetir les anàlisis moltes vegades (fent bootstrap), i augmentant el cost computacional. Per altra banda, en la inferència Bayesiana la informació es pot obtenir directament a partir de la distribució conjunta dels paràmetres, el que representa un cost computacional raonable. Tot i això, una revisió de la literatura Bayesiana actual indica que es necessita posar molt més èmfasi en el desenvolupament de models més realistes, comprovar els efectes dels 'priors', i controlar la convergència de les cadenes de Markov.

Així, la revisió bibliogràfica duta a terme en aquesta tesi, ens duu a afirmar que les millors estimes filogenètiques s'obtenen utilitzant mètodes d'inferència robustos, capaços d'incorporar models evolutius realistes (Publicació 1). Les dues maneres més directes d'augmentar la precisió d'una inferència filogenètica són incloure més seqüències i/o augmentar la longitud de les seqüències utilitzades. Goldman (1998) va demostrar que afegir més seqüències a una anàlisi no augmenta la quantitat d'informació en diferents parts de l'arbre de manera uniforme, mentre que l'ús de seqüències més llargues sí que resulta en un augment lineal d'informació sobre la totalitat de l'arbre. Així, una aproximació particularment potent és analitzar les seqüències com una totalitat de gens concatenats. L'anàlisi més simple suposaria que tots els gens tingueren els mateixos patrons i taxes d'evolució (Cao et al., 1994). Aquest mètode tan ingenu, però, només

s'hauria d'utilitzar quan hi ha evidència substancial d'un mateix patró evolutiu en tots els gens. Altrament, les diferències entre patrons de substitució dels gens poden conduir cap a resultats esbiaixats. Avui en dia, l'anàlisi de seqüències concatenades és possible, tenint en compte l'heterogeneïtat de models evolutius entre els gens estudiats. Aquesta heterogeneïtat podria ser prou complexa com per deixar a cada gen evolucionar amb un model i amb una taxa de substitució diferent en tots els llinatges (Yang, 1996). Gràcies a la utilització de les tècniques de mostreig per MCMC, els models mixtos i basats en la probabilitat de diferents models evolutius, es podrien utilitzar fins i tot quan l'evolució és heterogènia (Pagel and Meade, 2004).

Tanmateix, cal assenyalar que les estimes filogenètiques bones, en el fons, depenen de l'existència de bons conjunts de dades. En general, un error sistemàtic afectarà qualsevol mètode de reconstrucció filogenètica. Situacions com atracció de branques llargues (LBA) i biaixos en la composició nucleotídica són exemples d'error sistemàtic. Quan inferim filogènies, intentem definir la successió real de divergències passades a partir de les seqüències actuals. Tanmateix, cal tenir en compte que l'extinció de taxa intermedis, la selecció i els paràmetres poblacionals poden influir en la intensitat del senyal filogenètic. En conclusió, la inferència filogenètica s'hauria d'enfocar no sols com a eina per aconseguir una resposta definitiva per a un problema taxonòmic, sinó com a eina per incorporar noves preguntes sobre l'evolució de les molècules i la morfologia i per intentar descobrir les causes d'aquestes diferències en el procés d'evolució de les espècies.

Aíxi, quan ens apropem a l'estudi de la sistemàtica de les llagostes de l'infraordre Achelata (Scholtz and Richter, 1995), la inclusió de gens d'evolució lenta i gens d'evolució ràpida i un mostreig ample de taxa (incloent-hi uns quants outgroups) ens ha permès resoldre, amb un suport estadístic elevat, algunes de les incerteses en les relacions entre grups dins d'aquest infraordre. Això indica que, per a resoldre filogènies moleculars, no solament és important augmentar el nombre de gens sinó també incloure-hi més taxa (Rokas et al., 2005). Així, el conjunt de dades genètiques obtingudes indica una monofília recíproca de les famílies Palinuridae (llagostes) i Scyllaridae (castanyoles)

i, per tant, contradiu la proposta de Förster d'un avantpassat tipus *Linuparus* com a origen dels Scyllaridae (Förster, 1973). A més a més, la classificació habitualment més acceptada, amb la presència de tres famílies (Palinuridae, Scyllaridae i Synaxidae) dins del grup no queda suportada per l'evidència genètica, ja que els Synaxidae sempre es troben agrupats dins dels Palinuridae. De fet, tot i que altres autors havien proposat que els Synaxidae i els Palinuridae evolucionaven separatament des de l'aparició dels Pemphicidae en el Mesozoic (Glaessner 1969; George and Main, 1967), els nostres resultats donen suport a altres estudis previs que assenyalaven als Synaxidae com a grup polifilètic (Davie, 1990). Les relacions entre *Palinurellus* i *Palibythus* (Synaxidae) inferides a partir de les dades moleculars clarament suporten la proposta de Davie (1990) d'establir sinonímia entre les actuals famílies Synaxidae i Palinuridae. Així, nosaltres recomanem formalment que aquesta taxonomia siga adoptada, és a dir, que el grup Achelata conste simplement de dues famílies, Palinuridae i Scyllaridae i que els Synaxidae siguin considerats sinònim de Palinuridae.

Quan ens centrem en les relacions dins de la família Palinuridae, la proposta de George and Main (1967) de les tribus Silentes (espècies sense òrgan estridulant) i Stridentes (espècies amb òrgan estridulant) està suportada per l'evidència molecular, encara que amb un suport baix per al grup Stridentes. El clade Silentes sempre és recuperat com a monofilètic amb un suport estadístic elevat i amb unes relacions evolutives entre gèneres de Silentes que concorden molt bé amb les dades morfològiques, amb *Palinurellus* com el primer gènere a divergir i amb el llinatge que conté a *Projasus*, *Sagmariasus* i *Jasus* originant-se més tard. Tanmateix, les relacions filogenètiques inferides entre els gèneres de Stridentes difereixen de totes les hipòtesis prèviament proposades (George and Main, 1967; Baisre, 1994; Patek and Oakley, 2003). Les nostres dades moleculars suporten un clade *Linuparus/Justitia*, en lloc del clade *Linuparus/Puerulus* proposat anteriorment (George and Main, 1967; George 2006). Val a dir que l'existència d'aquest clade *Linuparus/Justitia* (publicació 2) no està només suportada per les dades moleculars, sinó que també hi ha evidència morfològica que la recolza, ja que aquests dos gèneres són els únics Palinuridae on els genitals dels mascles presenten una extensió de quitina a la base del cinquè parell de pereiòpodes (Holthuis,

1991; Patek and Oakley, 2003). Al mateix temps, la posició d'aquest clade *Limiparus/Justitia* en relació als Silentes i la resta de gèneres Stridentes roman sense resoldre's. La curta branca que separa els Silentes dels Stridentes podria ser indicativa d'una radiació ràpida dels tres principals llinatges de Palinuridae, cosa que faria difícil aconseguir un bon suport estadístic per a les agrupacions inferides. Com ja s'ha observat en altres taxa, els esdeveniments de radiació ràpida no són fàcils de resoldre amb els mètodes de reconstrucció filogenètica (Carreras-Carbonell et al., 2005; Rokas et al., 2005). La inclusió de més espècies que pertanyen als clades 2 i 3 (p. e. *Puerulus* i *Palinustus*; veure Fig. 2, publicació 2) podria ajudar a resoldre la monofília dels gèneres de Stridentes. En particular, augmentant l'esforç de mostreig sobre el gènere *Palinustus*, que compta amb 5 espècies descrites, permetria també testar el suggeriment de George (2006) que *Palinustus* ha sobreviscut com a espècies relict a als tres oceans principals després de la fragmentació del Tethys.

En comptes d'un clade *Palinurus/Puerulus* (Baisre, 1994), el conjunt de dades molecular suporta l'existència d'un clade *Palinurus /Panulirus /Palibythus* (clade 3). Aquest resultat és força interessant, ja que la morfologia de *Palibythus* és especialment divergent i la seva posició dins de Palinuridae roman sense resoldre fins ara (Patek and Oakley, 2003). A més, *Panulirus* i *Palibythus* són els únics Stridentes que mostren unes grans files d'espines en la placa antenular (Davie, 1990; Patek and Oakley, 2003). Finalment, les dues clades principals trobades dins dels Scyllaridae estan d'acord amb inferències prèvies basades en dades morfològiques (Holthuis, 1991). El fet que el clade Arctidinae /Ibacinae mostre un suport molt baix, pot ser degut al nombre reduït d'espècies utilitzat. Així, augmentar el mostreig d'espècies dins d'aquesta família podria ajudar a donar suport a aquestes agrupacions.

Pel que fa a les implicacions de l'anàlisi filogenètica més enllà de les relacions evolutives i la sistemàtica, en la publicació 2 ens hem interessat per incorporar informació temporal i de distribució de les espècies en la interpretació dels resultats de l'anàlisi molecular. Per una banda, l'anàlisi biogeogràfica ens permet trobar la hipòtesi més parsimoniosa que relacione un cladograma d'àrees de distribució conegudes i un

arbre filogenètic. Com que podem trobar patrons biogeogràfics múltiples, hem utilitzat tècniques basades en la màxima parsimònia per tal de desentranyar històries de distribució reticulades (Upchurch, 2008). No obstant això, s'hauria d'assenyalar en primer lloc que l'anàlisi biogeogràfica dels Achelata presenta unes quantes limitacions, ja que la majoria dels gèneres de llagosta tenen una distribució molt ampla i pot no haver-hi prou espècies de cada grup per a traçar acuradament les divergències de les àrees de distribució corresponents, especialment en el cas del gènere *Panulirus* i els escil·làrids, que són molt diversos. Els resultats obtinguts en la nostra anàlisi amb el software TreeFitter apunten a un origen dels Achelata en l'Indo-Pacífic (regió de l'antic Tethys), ja que el cladograma d'àrees que presentava un cost més baix (Cost: 21) és el que inclou l'oceà Índic com a zona basal. Sota el model de quatre esdeveniments de Ronquist, els esdeveniments de duplicació en la filogènia dels Achelata són significativament més freqüents, i correspondrien a processos d'especiació simpàtrida o especiació al·lopàtrida en resposta a una barrera temporal (Ronquist, 2001). D'acord amb això, estudis previs han proposat que les barreres oceanogràfiques a la dispersió larval podrien ser responsables del patró d'especiació observat en algunes llagostes del gènere *Panulirus* (Pollock, 1993). Tanmateix, ajustar cladogrames d'àrea per reflectir el canvi dinàmic de les barreres oceanogràfiques al llarg del temps no és senzill i es necessita molta més recerca per refinar els mètodes actuals de reconstrucció biogeogràfica (Upchurch, 2008).

Per altra banda, la datació de la divergència entre les dues principals famílies d'Achelata (125-178 milions d'anys) obtinguda amb el mètode del rellotge relaxat és compatible amb la hipòtesi prèvia d'un origen Triàssic dels Achelata (Porter et al., 2005; George, 2006). La gran extinció del Permià (251 milions d'anys), amb la desaparició de fins a un 96 per cent de totes les espècies marines, va permetre una gran expansió de nous grups taxonòmics disposats a ocupar els hàbitats buits (Lopez-Gomez and Taylor, 2005). Els primers fòssils semblants als Achelata apareixen abans del Triàssic (250-190 milions d'anys) (*Pemphix sueurii* Meyer 1839 i *Palinurus sueurii* Desmarest 1822), però els fòssils que es poden assignar de manera segura als Achelata són de principis del Juràssic (*Palinurina* Munster 1839, *Palaeopalinurus* Bachmeyer, 1954 i *Cancrinus* Munster 1839), i coincideixen amb la primera ruptura de Pangaea fa aproximadament 180 milions

d'anys. La separació de les dues principals famílies d'Achelata es podria relacionar així amb l'origen de l'Oceà Tethys; ja que els fòssils d'Achelata del Cretaci Mitjà (Estrats Aptià i Albià, al voltant de 110-120 milions d'anys) ja mostren clarament la divergència entre les dues famílies principals: Palinuridae (*Astacodes falcifer* Bell 1863, *Palinurus palaciosi* Vega et al. 2006) i Scyllaridae (*Scyllarella gardneri* Woods 1925, *Scyllarides punctatus* Woods 1925).

L'origen dels grups principals dins de cada família estaria així localitzat en el període que abarca des del final del Cretaci inferior fins al començament del Cretaci superior (Cenomanià, aproximadament 100 milions d'anys). Val a dir que el Cenomanià va suposar el nivell del mar més alt observat durant els passats sis-cents milions d'anys (aproximadament 150 metres per damunt del nivell del mar actual) (Gradstein et al., 2004). La divergència dels grups Silentes/Stridentes va tenir un impacte significatiu en l'evolució dels Palinuridae. L'adquisició d'una estructura complexa, com l'òrgan estridulant, va representar un avantatge adaptatiu important, millorant les possibilitats de supervivència front l'atac d'un predador (Lewis and Cane, 1990). Tanmateix, la monofília dels Stridentes no està fortament suportada en la nostra anàlisi molecular, la qual cosa no ens permet d'afirmar si els Stridentes (incloent *Limuparus/Justitia*) representen un llinatge monofilètic. No obstant això, la monofília dels Silentes està inequívocament suportada i la seva divergència aproximada 75 milions d'anys (55-125 milions d'anys) és coherent amb el registre fòssil (Glaessner, 1969). Així, els gèneres de Silentes haurien pogut originar-se a l'Hemisferi Sud, coincidint amb la formació d'Austràlia i l'Antàrtida (George, 2006). El gènere fòssil de l'Eocè *Archeocarabus* suposaria així una forma transitòria que duria al present grup de gèneres *Jasus*, *Sagmariasus* i *Projasus* (Woods, 1931). De fet, la data estimada per a l'avantpassat comú més recent (MRCA) de *Jasus*, *Sagmariasus* i *Projasus* correspon a l'Eocè (39 milions d'anys), tot i que *Archeocarabus* no va ser utilitzat per calibrar el rellotge molecular.

Entre els gèneres de Stridentes, *Panulirus* no es troba representat en el registre fòssil i per això tradicionalment se suposava que s'havia originat recentment (Miocè, aproximadament 20 milions d'anys) a partir d'un ancestre tipus *Palinurus* (George and

Main, 1967; George 2006). Nogensmenys, treballs previs inferien un origen anterior del gènere *Panulirus* i les evidències, tant morfològiques com genètiques, assenyalen a l'espècie atlàntica *P. argus* (Latreille, 1804) com a representant de la primera espècie que divergeix dins del llinatge (Ptacek et al., 2001). Curiosament, la nostra data estimada de divergència per al clade *Panulirus/Palibythus* - *Palinurus* és al voltant de cinc vegades més antiga que el temps de divergència assumit tradicionalment i suggereix que els gèneres es poden haver separat amb la formació de l'oceà Atlàntic fa al voltant de 100 milions d'anys (Bird et al., 2007). Els nostres resultats coincideixen amb estimes independents prèviament obtingudes a partir de seqüències de les hemocianines de tipus d'alfa de *Palinurus elephas* i *Panulirus interruptus* (Kusche et al., 2003).

En conclusió, els nostres resultats indiquen que els Achelata formen un grup monofilètic de crustacis decàpodes compost de dues famílies principals: Palinuridae i Scyllaridae. L'anàlisi molecular confirma Synaxidae com un grup polifilètic, que s'hauria d'incloure dins de Palinuridae. La família Palinuridae presentaria així tres llinatges principals: 1) els Silentes, incloent-hi l'anterior gènere sinàxid *Palinurellus*; 2) un clade *Linuparus/Justitia* i 3) un clade principal de Stridentes, que inclouria *Puerulus*, *Palinustus*, *Palinurus*, *Panulirus* i l'anterior sinàxid *Palibythus*. A més, les dues clades principals trobades dins dels Scyllaridae estan d'acord amb la taxonomia actual basada en dades morfològiques d'adults. Finalment, la datació de divergències dins d'Achelata obtingudes amb el mètode del rellotge relaxat és compatible amb les hipòtesis prèvies d'un origen Triàssic de les llagostes Achelata. L'ús simultani de marcadors moleculars d'evolució lenta i ràpida i un mostreig ample de diferents taxa han demostrat ser eficaços per resoldre les incerteses trobades en aproximacions prèvies i han permès obtenir estimes de divergència coherents fins i tot utilitzant un registre fòssil incomplet. Finalment, l'aproximació filogenètica utilitzada en el nostre estudi es podria generalitzar per resoldre incerteses en la classificació en altres grups taxonòmics i comparar hipòtesis evolutives en conflicte.

4.2. Reconstrucció Filogenètica: Estudi de la variabilitat genètica i les divergències recents en espècies del gènere *Palinurus*.

L'obtenció d'un nou conjunt de marcadors nuclears d'evolució ràpida (microsatèl·lits) per a la llagosta vermella (*Palinurus elephas*) (publicació 3), marca una nova pauta en el desenvolupament d'aquesta tesi, acostant-nos a processos d'evolució molt més recents. Els desavantatges que presenten els microsatèl·lits, com ara els elevats costos econòmics i les dificultats per trobar microsatèl·lits nous en genomes complexos, poden trobar-se compensats si utilitzem els marcadors desenvolupats en una espècie per a estudiar altres espècies properes. Així, els marcadors obtesos en *Palinurus elephas* van ser utilitzats per a estudiar els nivells de diversitat genètica en totes les espècies del gènere *Palinurus* (publicació 4) i en una anàlisi filogenètica dels processos d'especiació dins del gènere (publicació 5). Gràcies als nous mètodes de computació bayesiana aproximada (ABC), basats en la teoria de la coalescència, vam poder testar diferents hipòtesis evolutives dins del gènere *Palinurus* i acostar-nos una mica més a la descripció dels processos d'especiació en el medi marí.

4.2.1.- Variabilitat genètica en espècies del gènere *Palinurus*.

Els nostres estudis sobre diversitat genètica en espècies del gènere *Palinurus* (Weber, 1795) indiquen que els microsatèl·lits desenvolupats en *Palinurus elephas* amplifiquen en totes les espècies de *Palinurus* conegudes, amb un percentatge de marcadors polimòrfics del 100% per a totes les espècies excepte *P. barbarae* (publicació 4). Estudis previs en peixos marins havien indicat una relació negativa entre la proporció de loci polimòrfics i la distància evolutiva entre espècies (Carreras-Carbonell et al., 2008). *P. elephas* i *P. barbarae*, d'acord amb aquests resultats, presenten la divergència en seqüències de mtDNA més gran entre dues espècies de *Palinurus* (Groeneveld et al., 2007). Aquesta correlació negativa entre distància genètica i l'amplificació i el polimorfisme de loci microsatèl·lits també podria explicar el nombre més elevat d'al·lels nuls trobats en alguns loci en les espècies de l'hemisferi sud.

La diversitat genètica i els valors de Fis trobats en espècies de *Palinurus* utilitzant els marcadors microsatèl·lit són similars a les trobades en altres decàpodes marins (Robainas et al. 2002; Urbani et al. 1998). Malgrat les diferències en tamany mostral en les espècies incloses en els nostres, els mètodes de rarefacció ens han permès comparar la riquesa al·lèlica entre espècies de *Palinurus*. Generalment, les espècies amb una àrea de distribució gran tendeixen a tenir nivells més alts de diversitat genètica que les espècies endèmiques, geogràficament restringides (Awise and Hamrick 1996; Cole 2003). Contradient aquesta tendència, *P. charlestoni* va mostrar el segon valor de diversitat genètica més alt (publicació 4). De fet, la tendència trobada va ser que la riquesa al·lèlica és consistentment més alta en espècies d'aigua poc profunda que en les espècies d'aigua profunda, independentment del nombre de genotips analitzats. Els valors aproximats per a espècies d'aigua poc profunda generalment dobren aquells de congèners d'aigua profunda. Així, una diversitat genètica i una consanguinitat més alta en *P. mauritanicus*, *P. delagoae* o *P. barbarae* són probablement degudes al fet que les poblacions són més petites en espècies d'aigües profundes.

La teoria de genètica de poblacions suggereix que només les poblacions molt petites pateixen una pèrdua significativa de diversitat genètica, a partir d'una grandària efectiva (N_e) mínima de 50-500 individus (Ellstrand and Elam 1993). Per a les pesqueries marines, fins i tot les poblacions "col·lapsades" tenen normalment tamany censals (N) d'uns quants milions d'individus, de manera que es podria pensar que no és necessari preocupar-se sobre la pèrdua de diversitat genètica, tot i que els efectes de la sobrepesca sobre la diversitat de les espècies i la seva abundància estan ben documentats (Hutchings 2000; Law 2007). Per altra banda, molts crustacis marins es caracteritzen per corbes de supervivència tipus III, amb una combinació d'alta fecunditat i elevada mortaldat juvenil. Aquestes característiques de cycle vital generen una variància molt alta en l'èxit reproductiu, cosa que pot deprimir N_e substancialment i provocar proporcions N_e/N extremadament baixes (Hedgecock 1994). Per exemple, la grandària efectiva pot ser unes quantes ordres de magnitud més petita que la mida censal en peixos marins, produint unes proporcions N_e/N de 10^{-5} a 10^{-3} (Hauser et al. 2002). Considerant les grandàries efectives poblacionals calculades en espècies de *Palinurus* amb l'estimador

d'homozigositat (H) de Kimmel et al. (1998) i la fórmula de Ohta and Kimura (1973) i utilitzant la ratio N_e/N de 10^{-3} - 10^{-5} trobada en altres espècies marines (Hauser et al. 2002), els tamanys censals de les espècies de *Palinurus* se n'anirien ben bé per sobre d'uns quants milions d'individus. Recíprocament, poblacions d'uns quants milions d'individus poden representar de fet grandàries efectives molt més petites. Per això, moltes poblacions marines sotmeses a explotació poden estar en perill de perdre variabilitat genètica a llarg termini, malgrat que les seves mides censals siguin grans.

Recentment s'ha estudiat la filogeografia d'unes quantes espècies del gènere *Palinurus* utilitzant gens mitocondrials com CR i COI (Tolley et al., 2005; Gopal et al., 2006; publicació 6). En tots els casos, el mtDNA presentava una diversitat haplotípica bastant alta, amb la presència d'un haplotip majoritari i un nombre gran d'haplotips estretament relacionats. Aquest patró de distribució d'haplotips podria indicar la presència d'un coll d'ampolla provocat per fluctuacions demogràfiques (Harpending 1994). Tanmateix, la selecció sobre la molècula de mtDNA també podria provocar que els haplotips actuals foren molt semblants entre ells (Stephens 2007). Si els patrons de diversitat genètica del mtDNA són causats per la selecció, utilitzar marcadors nuclears selectivament neutres ens donarà una comprensió més completa de la distribució de diversitat genètica d'aquestes espècies. Pel que fa a la inferència de canvis demogràfics per als quals la signatura genètica encara està manifesta, el programa BOTTLENECK no va ser capaç de proporcionar resultats conclouents per a cap espècie analitzada. Aquest resultat es pot relacionar amb una potència insuficient del mètode donat el nombre de loci analitzats (Luikart and Cornuet, 1998) que sols permet detectar colls d'ampolla forts i molt recents (Pascual et al., 2001). La presència d'al·lels nuls també podria tenir un efecte negatiu sobre els resultats (Luikart and Cornuet 1998). No obstant això, quan es va utilitzar el mètode de Kimmel et al. (1998), totes les espècies de *Palinurus* van mostrar un senyal clar de canvis demogràfics, cosa que estaria d'acord amb els estudis previs usant mtDNA.

Per altra banda, no és sorprenent trobar aquest senyal en totes les espècies, ja que si la població experimenta un coll d'ampolla que precedeix expansió, hi haurà un període

molt llarg (uns quants mils de generacions) durant el qual s'infereix un coll d'ampolla abans de mostrar-se la signatura d'expansió. Així, l'efecte de selecció sobre el mtDNA no s'hauria de descartar. Nogensmenys, la comparació del mtDNA entre congèners d'aigua poc profunda (plataforma) i els de talús continental i fons batials (>200 m), ens indica que les espècies d'aigües profundes tenen nivells de diversitat haplotípica més alts que els seus homòlegs d'aigua menys profunda. Per això, les espècies amb la diversitat genètica més alta per a marcadors microsatèl·lit (espècies d'aigües poc profundes) serien aquelles que mostren un valor de diversitat haplotípica més baix en utilitzar dades de seqüència de mtDNA. Una causa probable del patró observat seria que la selecció sobre el mtDNA ha estat més forta en espècies d'aigües més superficials, ja que els ambients d'aigua profunda tendeixen a ser més estables pel que fa a variacions de temperatura. Segons la hipòtesi del "Genetic Draft" d'en Gillespie, la reducció de la variació genètica provocada per escombratges selectius recurrents, equilibraria els nivells de diversitat neutra (que esperaríem foren més grans en poblacions més grans), fent que la variació genètica siga independent de la mida poblacional (Bazin et al. 2006; publicació 6). Així, s'explicarien els valors de diversitat de mtDNA més petits en espècies d'aigua poc profunda malgrat que les seves grandàries poblacionals foren més grans (com ens indiquen els marcadors nuclears).

En conclusió, ha estat confirmat que els marcadors microsatèl·lit desenvolupats per a *Palinurus elephas* són polimòrfics en les altres espècies de *Palinurus* conegudes. La grandària efectiva poblacional en espècies de *Palinurus*, calculades mitjançant l'estimador d'homozigositat (H) de Kimmel et al. (1998) i la fórmula de Ohta and Kimura (1973) seria unes quantes ordres de magnitud més petita que les mides censals corresponents calculades a partir de les dades de pesqueries (FAO, 2008), de manera que milions d'individus serien equivalents a una grandària efectiva poblacional de només centenars o milers. Més important encara és el fet que les espècies d'aigua profunda presenten una grandària efectiva poblacional més baixa, comparades als seus homòlegs d'aigua poc profunda. Això farà que les espècies d'aigua profunda siguen més sensibles a la sobreexplotació i, consegüentment, que la sobrepesca tinga un efecte molt més gran sobre la diversitat genètica d'aquestes espècies a llarg termini.

4.2.2.- Filogènia i especiació en el gènere *Palinurus* Weber, 1795.

Al treball previ amb la utilització de seqüències d'ADN nuclear i mitocondrial (publicació 2), es va poder recuperar *Palinurus elephas* com a primera espècie a divergir dins del gènere, encara que les relacions entre les altres espècies del gènere *Palinurus* no es van poder resoldre per la manca de variabilitat en la major part de les seqüències. De fet, alguns dels gens mitocondrials van presentar una notable manca de polimorfisme nucleotídic. És interessant resaltar que, dins d'una mateixa espècie (p.e. *P. mauritanicus*), alguns gens mitocondrials no presentaven variabilitat mentre que altres sí eren variables. Un procés demogràfic, com per exemple un coll d'ampolla molt fort, reduiria la variabilitat de forma global a tots els gens mitocondrials, perquè aquest genoma representa un sol grup de lligament. Per altra banda, un procés de selecció també tendeix a reduir de forma global el polimorfisme en la molècula seleccionada, però una grandària efectiva considerable permetria l'existència de diferents individus amb una mateixa variant d'un gen. El fet que aquesta variant fóra seleccionada en més d'un llinatge dins de l'espècie ajudaria al manteniment de part de la variabilitat ancestral en les regions no seleccionades. A més a més, s'ha de tenir en compte que si una regió concreta està sotmesa a selecció de manera recurrent, la variabilitat que es forma per mutació seria seleccionada en contra per a eixa regió en concret, però no per a la resta de la molècula i això també faria que la taxa de mutació semblara comparativament menor en una regió del genoma que en una altra.

Les nostres anàlisis filogenètiques dins del gènere *Palinurus*, utilitzant un conjunt de loci nuclear polimòrfic (microsatèl·lits) i els mètodes clàssics basats en distàncies, sostenen un patró d'especiació amb totes les espècies africanes formant un clade monofilètic (Publicació 5). A més, la combinació de marcadors nuclears i mtDNA amb els mètodes recentment desenvolupats basats en coalescència (ABC: Computació Bayesiana Aproximada), ens ha permès testar la hipòtesi prèviament suggerida que suposa que *P. charlestoni* es va originar a partir d'un avantpassat sud-africà tipus *P. gilchristi* (especiació Sud-Nord) (Groeneveld et al., 2007). Els resultats obtinguts amb les

dades microsatèl·lit assenyalen que un patró d'especiació Nord-Sud és més coherent amb el conjunt de dades moleculars. Aquest procés d'especiació Nord-Sud podria estar relacionat amb les pautes dels corrents marins en la costa occidental d'Àfrica. El corrent Canari flueix al llarg de l'any cap a l'equador (Wooster et al. 1976; Batten et al. 2000), mentre que el corrent d'Angola flueix prop de la costa d'Àfrica des de 2°N fins a 20°S. Les larves teleplàniques, com la filosoma, podrien haver estat transportades pel corrent d'Angola, que es comunica amb la branca de gir del corrent de Benguela, viatjant més cap al sud. Per això, algunes larves podrien haver colonitzat aigües africanes utilitzant un sistema de corrents semblant a una cinta transportadora. A més a més, s'hauria d'assenyalar que aquesta hipòtesi d'especiació Nord-Sud també és coherent amb les anàlisis filogenètiques prèvies amb dades de seqüència de mtDNA (Groeneveld et al., 2007). Tanmateix, abans que el fet de si les larves podrien haver arribat a l'Àfrica del sud, sembla haver una qüestió més important per resoldre: eren les aigües sudafricanes un ambient idoni per a que les espècies de *Palinurus* pogueren sobreviure i proliferar?

En l'estudi filogeogràfic, utilitzant part del gen COI i les taxes de mutació estàndards per a crustacis decàpodes, hem trobat que el temps de divergència entre *P. elephas* i *P. mauritanicus* era molt més recent que el proposat per Groeneveld et al. (2007) (publicació 6). Amb l'estudi en les relacions evolutives dins de l'infraordre Achelata, hem mostrat que no hi ha variació genètica entre espècies de *Palinurus* (excepte a *P. elephas*) quan s'analitzen dades de seqüència per a gens nuclears (publicació 2). Tota aquesta evidència sembla indicar que un procés d'especiació molt recent hauria estat responsable de l'origen de les espècies de *Palinurus*, tot i que una taxa de mutació extremadament baixa també es podria invocar per a explicar la manca de diferenciació genètica. D'acord amb l'evidència prèvia, les simulacions per coalescència fetes en la publicació 5 indiquen que no és probable que el conjunt de dades moleculars observat resulti d'una taxa de mutació baixa mentre que la taxa de mutació més ràpida està ben suportada independentment de la hipòtesi d'especiació assumida. Les taxes de mutació marquen la diferència en aquest cas, ja que és obvi que les dades genètiques són només la meitat de la història i que l'especiació hauria de ser coherent amb una altra informació independent disponible. Així, els temps de divergència obtinguts per a les

espècies de *Palinurus* utilitzant les taxes de mutació estàndards coincideixen amb els processos relacionats amb les glaciacions ocorreguts durant els darrers 2 My (Prange et al. 2002). És conegut que els canvis climàtics del Pliocè, tant a l'hemisferi Nord com al Sud, tingueren un gran impacte en l'evolució de molts organismes terrestres (deMenocal, 2004). Per això, la pregunta sorgeix directament: Com afectaren tots aquests canvis els patrons de circulació d'oceans en l'Atlàntic sud i, especialment, com afectaren a l'ambient marí de l'Àfrica del sud?

Durant el Pliocè, el canvi més important en la circulació dels oceans està relacionat amb el tancament gradual de l'Istme de Panamà, fa ara entre 5 i 3 milions d'anys (Marlow et al., 2000; Prange et al. 2002). L'intercanvi de masses d'aigua tropical de l'Atlàntic i Pacífic es va aturar i s'establí la circulació actual amb una influència forta de l'Aigua Profunda de l'Atlàntic Nord sobre la circulació global, amb una intensificació forta del sistema d'aflorament de Benguela (Prange and Schulz, 2004). Tot i que l'aflorament de Namíbia probablement començara durant el Miocè (Siesser, 1980), el màxim de diatomees Matuyama (~2 milions d'anys) marca la transició d'un període càlid a un mode fred de control dels afloraments al llarg de la costa sud-oest africana (Lange et al., 1999). Marlow et al. (2000) han demostrat que el sistema d'aflorament de Benguela es va tornar més pronunciat cap als 2.1 a 1.9 milions d'anys i s'intensificà durant el període que condueix al començament dels cicles glacials de 100 kyr, ara fa uns 0.6 milions d'anys. La intensificació d'aquest aflorament va tenir una influència directa, refredant les aigües marines de Sud-Àfrica (Marlow et al., 2000). La temperatura superficial mitjana en aigües sudafricanes, directament afectada per aquest sistema d'aflorament, va baixar des de 26°C en el Pliocè mitjà (3.5 milions d'anys) fins a 18°C en l'actualitat (Marlow et al., 2000). Això ens fa concloure que la temperatura de l'aigua a Sud-Àfrica no hauria permès l'expansió d'un gènere d'aigua freda com *Palinurus* fins a finals del Pleistocè, ja que les espècies de *Palinurus* es troben generalment entre 11-18°C (Holthuis, 1991; Groeneveld et al., 2007). En efecte, segons les estimacions de divergència obtingudes amb els mètodes ABC, els llinatges de *P. charlestoni* i *P. gilchristi* haurien divergit fa només uns 550 kyr, just després que les aigües africanes es tornessin adequades per a la supervivència d'espècies de *Palinurus*. A més a més, val a dir que *P. barbarae* sembla

estar especialment adaptada a ambients més càlids, ja que és l'única espècie de *Palinurus* que es troba habitualment en aigües per damunt dels 16°C (Groeneveld et al., 2007), fet que també concordaria amb la hipòtesi d'especiació Nord-Sud.

Per altra banda, les anàlisis basades en individus en lloc d'espècies, van mostrar que la monofília no està ben suportada en espècies del gènere *Palinurus* de l'Oceà Índic Occidental i l'Atlàntic Oriental. Aquest resultat és coherent amb la teoria de la coalescència, que afirma que poden persistir llinatges polifilètics entre espècies fins i tot molt de temps després de divergir (Tajima 1984; Palumbi, 1998). De fet, amb una grandària efectiva ancestral d'aproximadament 20,000 individus (publicació 4) i un temps de generació de 4-10 anys, es necessitaria un total de 160-400 kyr perquè es fixaren els llinatges. Això estaria perfectament d'acord amb els temps de divergència estimats a partir del conjunt de dades combinat (mtDNA+microsatèl.lits), ja que les anàlisis basades en individus ens mostren que la separació incompleta de llinatges és més evident en el parell d'espècies que han divergit fa menys temps, *P. delagoae* i *P. barbarae* (~89 kyr).

De totes formes, això no significa que la inferència basada en els marcadors microsatèl·lits siga completament fiable i perfecta. Atés que els models d'evolució molecular són els que ens expliquen com ha ocorregut la divergència entre espècies, és molt important que les seves limitacions es tinguin en compte (Avise, 2000). El model utilitzat en els nostres treballs suposa que només la deriva genètica i la immigració estan implicades en el canvi genètic, és a dir, que la selecció és insignificant i les poblacions estan en equilibri (Chakraborty and Leimar, 1987). Així, l'actuació de la selecció sobre els marcadors microsatèl·lit podria distorsionar les assumpcions del model i obligaria a canviar les interpretacions. Uns altres problemes específics de la inferència filogenètica basada en els microsatèl·lits estarien relacionats amb una limitació en el tamany dels al·lells, ja que normalment es manté el nombre de repeticions per sota d'un cert llinar (Bowcock et al., 1991). Estudis previs han mostrat que el model de mutació stepwise (SMM) explica relativament bé els processos evolutius de molts loci microsatèl·lit (p. e. Weber and Wong, 1993). Tanmateix, el fet de tenir mostrejats un nombre considerable de

loci microsatèl·lit permet que el soroll fet per loci que evolucionen de forma irregular es redueca (Takezaki and Nei, 1996).

En conclusió, el patró d'especiació trobat en *Palinurus* és un exemple típic dels processos d'especiació ràpida dins d'un grup, amb branques molt curtes separant les diferents espècies. Les eines moleculars han ajudat a descobrir divergències recents en una àmplia varietat de taxa i ens han proporcionat unes quantes pistes sobre els mecanismes, el ritme i la geografia de l'especiació marina (Knowlton 1993; Lessios et al. 2001). La inferència filogenètica a partir de dades moleculars pot ajudar a documentar el patró geogràfic i cronològic de la formació d'espècies, sempre que estiga acoblat amb informació sobre la història geològica de les regions i els corrents oceànics passats i presents que poden proporcionar corredors de dispersió. En efecte, l'evidència genètica suggereix que molts grups d'espècies són relativament recents, originant-se després del començament del Pleistocè, durant els darrers 2 milions d'anys (Palumbi 1996; Barber et al. 2002). Aquests esdeveniments d'especiació recent proporcionen una gran oportunitat per a analitzar el procés d'especiació en organismes marins, i permeten que una combinació de dades genètiques, morfològiques i biogeogràfiques siguin utilitzades per contestar diferents qüestions sobre els mecanismes d'especiació. El nostre estudi demostra que és més probable que les petjades sobre la formació de les espècies s'identifiquin quan comparem espècies que han divergit fa poc, ja que la diferenciació genètica es pot relacionar amb els diferents processos d'especiació proposats.

4.3. Diversitat genètica i diferenciació en poblacions de llagosta vermella (*Palinurus elephas*) de l'Atlàntic i la Mediterrània.

Fins ara hem discutit els resultats obtinguts en els estudis filogenètics de divergències antigues, duts a terme per tal de reconstruir les relacions evolutives entre grans grups dins dels Achelata, i els resultats obtinguts en els estudis filogenètics de divergències més recents, que ens permeten identificar quins processos han tingut un paper fonamental en l'expansió i diversificació de les llagostes del gènere *Palinurus*. Tanmateix, l'evolució no és un fet passat. L'evolució segueix actuant de forma contínua sobre les poblacions de llagosta, i els efectes dels processos històrics més recents segueixen tenint un impacte sobre la diversitat genètica de les espècies actualment. De fet, les característiques biològiques de les llagostes, com per exemple la seva extraordinària capacitat de dispersió larval, juntament amb la menor importància aparent de fortes barreres físiques al flux gènic al mar, fan especialment interessant l'estudi de la variació genètica actual en les poblacions d'aquests crustacis.

4.3.1.- Filogeografia en *Palinurus elephas*.

Tot i que la presència d'un haplotip abundant per tota l'àrea de distribució de l'espècie indica un grau alt d'homogeneïtat genètica entre poblacions, l'anàlisi de les dades de freqüències haplotípiques va revelar l'existència d'estructuració geogràfica de les poblacions. La diferenciació genètica trobada entre les regions atlàntiques i mediterrànies va resultar significativa i podria ser explicada per una restricció del flux gènic entre aquestes dues àrees. Mentre que el test de Mantel mostra un patró d'aïllament per distància (IBD) quan s'inclouen totes les localitats mostrejades, l'anàlisi de les localitats mediterrànies i atlàntiques per separat no va ser capaç de detectar-lo, indicant que aquest patró podria ser espuri i resultat de la restricció del flux gènic a través de l'Estret de Gibraltar/Mar d'Alboran. Aquests resultats assenyalen cap a una possible reducció en la capacitat de dispersió de la larva filosoma en comparació amb els nivells esperats donada la seva llarga duració planctònica (5-9 mesos, Mercer, 1973; Hunter, 1996). De fet, aquesta reducció es podria relacionar amb la dinàmica de processos oceànics de

mesoescala, que podrien tenir un efecte de restricció sobre la dispersió global (Naylor, 2005, 2006). L'anàlisi de components principals suggereix l'existència de quatre grups de poblacions en *P. elephas* (publicació 6). Les dues localitats amb una distribució més septentrional formen el grup més diferenciat. Curiosament, l'existència de diferenciació genètica entre Bretanya i mostres d'Irlanda-Escòcia també s'ha trobat en el peix *Pomatoschistus microps* i l'alga *Fucus serratus* (Gysels et al., 2004; Hoarau et al., 2007) i podria ser causada per l'efecte del Gulf Stream, que colpeix el subcontinent europeu aproximadament al sud d'Irlanda (Jakobsen et al., 2003). El Gulf Stream es divideix llavors en un corrent cap al nord i un corrent sud cap a l'Europa continental de manera que la seva influència podria reduir el flux genètic entre aquestes àrees. D'acord amb això, un segon grup era format per les poblacions atlàntiques trobades al Canal de la Mànega i l'àrea del Golf de Biscaia, que són influïdes per la branca sud del Gulf Stream. A més a més, la mostra de Portugal s'agrupava amb aquelles poblacions mediterrànies (Sardenya, Tunísia i Sicília) que reben una influència més forta d'aigües atlàntiques (Milot, 2005). L'aigua atlàntica superficial ingressa a la Mediterrània a través de l'Estret de Gibraltar i, després de creuar el Mar d'Alboran formant dos girs anticiclònics, viatja cap a les costes del nord d'Àfrica, formant el Front d'Almeria-Oran, i cap al Canal de Sicília, que separa les conques occidental i oriental de la Mediterrània. Alguns girs se separen sovint cap al nord, cap a Sardenya i les Balears (Milot, 2005). Les dues poblacions més diferenciades de *P. elephas* dins de la Mediterrània són aquelles localitzades a la conca nord-occidental, que són precisament les àrees sota una menor influència d'aigua atlàntica i constitueixen les aigües mediterrànies més diferenciades (Salat, 1996). A la conca Liguro-Provençal-Catalano-Valenciano-Balear, l'estructura i dinàmica dels corrents superficials formen un gir ciclònic (sentit NW a la península i NE a Balears), que podria afavorir la retenció larval. Els nostres resultats indiquen que, tot i que l'estructuració poblacional en una espècie marina amb distribució Atlàntic-Mediterrània pot estar influïda pel Front d'Almeria-Oran (Patarnello et al., 2007), els processos de mesoescala patits per les aigües atlàntiques també poden provocar diferenciació genètica dins de la Mediterrània.

Els canvis demogràfics i diferents processos històrics poden afectar la resolució dels marcadors genètics quan estudiem la diferenciació entre poblacions, ja que les reduccions en tamany poblacional o els escombratges selectius poden causar una reducció de la variabilitat genètica global (publicació 6). L'elevada diversitat haplotípica observada en *P. elephas*, amb la presència d'un haplotip majoritari i un gran nombre d'haplotips estretament relacionats, és consistent amb els resultats observats en altres estudis de llagostes palinúrides (Tolley et al., 2005; Gopal et al., 2006). Tanmateix, s'ha d'assenyalar que un estudi previ amb *P. elephas* i *P. mauritanicus* no va detectar variabilitat al gen de COI (Cannas et al., 2006), mentre que un article més recent va trobar variabilitat intraespecífica en les dues espècies (Groeneveld et al., 2007). Per això, podem concloure que hi ha una tendència global perquè aquest grup de crustacis presente uns nivells tan alts de diversitat haplotípica. Un coll d'ampolla genètic provocat per la selecció o per demografia, reduiria la grandària efectiva poblacional i provocaria que els haplotips actuals s'uniren en un temps molt recent. Com que la regió COI sembla haver evolucionat de manera neutra en *P. elephas* i *P. mauritanicus* (Publicació 6), aquest patró podria indicar que les fluctuacions demogràfiques hagin estat responsables de formar la distribució de variació genètica actual (Harpending, 1994). Tanmateix, pel fet que tot el mtDNA actua com a un sol marcador, si la selecció actua en qualsevol altre gen de la molècula de mtDNA, s'imitaria exactament un coll d'ampolla demogràfic; així, cal utilitzar gens nuclears per descartar completament la hipòtesi selectiva (Bazin et al., 2006). No obstant això, val a dir que la distribució del nombre de diferències i el patró poc profund de la genealogia d'haplotips sembla una tendència general present en espècies pertanyents a diversos grups taxonòmics (Domingues et al., 2005). Aquest patró es pot relacionar amb canvis mediambientals que haurien tingut efectes dramàtics sobre una àrea molt àmplia, com ara els períodes glacials, que poden provocar caigudes del nivell del mar de més de 100 m (Lambeck et al., 2002). L'impacte de períodes glacials en les fluctuacions demogràfiques s'ha observat en diferents espècies (Bargelloni et al., 2005; Domingues et al., 2005; Carreras-Carbonell et al., 2005). Si se suposa que la taxa de mutació és igual a la taxa de substitució, la data de coalescència per als haplotips de *P. elephas* seria aproximadament uns 266-355 kyr i es podria relacionar amb els canvis climàtics del període glacial Mindel (230-300 kyr) (Publicació 6). D'acord amb això, les

dates de coalescència de mtDNA obtingudes en *P. mauritanicus* serien d'uns 477-583 kyr, indicant la possible influència de la glaciació Günz (620-680 kyr). Tanmateix, hi ha hagut recentment molt de debat sobre les taxes de mutació intraespecífica, sent molt més altes que les taxes de substitució interespecífiques (Ho et al., 2005). Tenint aquestes observacions en compte i utilitzant una taxa de mutació 3-10 vegades més ràpida que la taxa de substitució (Emerson, 2007), el temps de coalescència per a *P. elephas* seria molt més recent i podria estar relacionat amb el darrer màxim glacial (LGM). No obstant això, utilitzant aquesta taxa més ràpida, els haplotips de *P. mauritanicus* encara s'unirien en una època més antiga que *P. elephas*, indicant que l'últim esdeveniment glacial hauria tingut un efecte més petit sobre *P. mauritanicus*. Estudis previs han emfatitzat el diferent efecte de les glaciacions en la reducció dels nivells de variació genètica en espècies supra- i inter- mareals, on els temps d'exposició al fred serien diferents (Marko, 2004). Atés que *P. mauritanicus* es troba generalment en aigües més profundes que *P. elephas* (Holthuis, 1991), canvis en el nivell del mar o canvis de temperatura podrien haver afectat les poblacions de *P. mauritanicus* en una menor mesura. Durant períodes càlids sempre es pot trobar un refugi de temperatura fred en aigües més profundes (Graham et al., 2007), mentre que, en períodes freds, un refugi càlid només es trobaria fent migracions latitudinals cap al sud. Aquests processos provocarien colls d'ampolla que implicarien una disminució en la diversitat genètica com la trobada en *P. elephas* i un efecte més petit en espècies d'aigua més freda, com *P. mauritanicus*. A més a més, les glaciacions podrien tenir un impacte diferencial en les grandàries efectives poblacionals, reduint o canviant diferencialment les àrees de distribució globals de cada espècie. D'aquesta manera, una àrea de distribució més gran durant les glaciacions podria haver permès a *P. mauritanicus* retenir poblacions més grans en comparació amb *P. elephas* i així promoure el manteniment de més polimorfismes ancestrals. El temps de divergència entre els llinatges de *Palinurus elephas* i *P. mauritanicus* (5.52-6.75 Mya) estimat a partir de gens mitocondrials (publicació 6) és molt més antic que el temps de coalescència d'haplotips per a cada espècie. Aquesta data d'especiació es podria relacionar amb la Crisi de Salinitat del Messinià (MSC), que va provocar la dessecació de la Mediterrània i canvis en els corrents oceànics, ara fa entre 5.96 i 5.33 milions d'anys (Duggen et al., 2003). Els processos oceanogràfics i canvis a corrents oceànics que varen tenir lloc

després del MSC podrien haver provocat un esdeveniment d'especiació al·lopàtric a *Palinurus* ja que les larves filosoma es podrien haver quedat retingudes en diferents sistemes oceànics (Pollock, 1990). Tanmateix, l'estudi filogenètic dut a terme incorporant nous marcadors nuclears, com són els microsatèl·lits, i mètodes basats en la teoria de la coalescència ens indica un període d'especiació més recent, d'uns 2 milions d'anys (publicació 5).

En conclusió, l'estudi filogeogràfic amb marcadors mitocondrials ens mostra que els processos oceanogràfics actuals i la història paleoecològica (p. e. glaciacions) tenen un paper fonamental en la formació dels patrons de variabilitat genètica i estructuració poblacional en *Palinurus elephas*. La variabilitat i distribució del nombre de diferències entre parelles d'haplotips en *P. elephas* indica o bé canvis demogràfics o una forta escombrada selectiva relacionada amb períodes glacials. Malgrat una reducció en la variabilitat genètica global i la seva llarga duració larval, el flux gènic sembla estar restringit en poblacions de *P. elephas*, causant diferenciació genètica entre les regions atlàntica i mediterrània i entre àrees diferents dins de cada conca. L'exemple de *Palinurus elephas* ens indica que els patrons de circulació de mesoescala poden ser responsables de diferenciació genètica dins d'una regió marina concreta, subratlla la influència dels processos històrics en la distribució de la variació genètica i resalta la necessitat de cobrir la major part de l'àrea de distribució d'una espècie marina, quan provem de definir l'existència de diferenciació genètica i possibles restriccions a la dispersió.

4.3.2.- Estructuració genètica en *P. elephas* inferida amb marcadors microsatèl·lit.

Per altra banda, la variabilitat genètica trobada en *P. elephas* usant marcadors microsatèl·lit (publicació 7) indica que la diversitat gènica i els valors de Fis són similars als trobats en altres decàpodes marins (Robainas et al., 2002; Urbani et al., 1998). A més, els valors d'heterozigositat observats amb microsatèl·lits ($H_o = 0.598 \pm 0.03$) són coherents amb els valors de diversitat haplotípica trobats amb la regió COI del mtDNA ($H_d = 0.588 \pm 0.03$) (Publicació 6). Pel que fa al patró d'estructuració poblacional, les dades microsatèl·lit assenyalen l'existència d'una única unitat evolutiva amb una subestructuració genètica molt dèbil però significativa. Els valors de Fst obtinguts utilitzant microsatèl·lits ($F_{st} = 0.0083$) són majors que utilitzant marcadors mitocondrials ($F_{st} = 0.014$) (Publicació 6). El fet que la grandària efectiva sigui 4 vegades més gran en loci autosòmics que al mtDNA ens assegura que els valors de Fst seran substancialment més grans per al mtDNA, i això s'observa gairebé sempre en estudis poblacionals (González and Zardoya, 2007). Ja que el mtDNA s'hereta per via materna, s'hauria d'assenyalar que un biax en la dispersió degut al sexe també podria elevar els valors de Fst per a espècies on els mascles es dispersen més que les femelles (Carreras et al., 2007).

Una molt baixa estructuració genètica és prou comuna entre organismes marins pelàgics i ja s'ha observat en uns quants grups taxonòmics, des de peixos fins a crustacis (Knutsen et al. 2003; Maggioni et al. 2003). Tanmateix, com que les llagostes adultes són crustacis relativament sedentaris, la principal causa perquè *P. elephas* mostre una estructuració tan baixa com la dels organismes pelàgics seria l'habilitat dispersiva de la larva filosoma. Per això, el fet que la població més diferenciada siga la població de Grècia és coherent amb la baixa influència d'aigües atlàntiques en la Mediterrània Oriental (Malanotte-Rizzoli et al., 1999). El gran gir present a la Mediterrània Oriental podria estar provocant l'aïllament de larves filosoma, ja que aquestos remolins i girs oceanogràfics poden durar uns quants mesos i podrien retenir fins i tot larves amb una PLD molt llarga. En efecte, s'ha demostrat que alguns remolins mediterranis (p. e. l'Algerià) poden presentar durades superiors a 3 anys (Puillat et al. 2002). Finalment, tot i que l'agrupació explica menys d'un 1% de la variació genètica, val a dir que les conques

atlàntica i mediterrània mostren diferències significatives, indicant que existeix una certa estructuració poblacional. Aquesta diferenciació significativa entre conques també es troba quan s'analitzen les poblacions de *P. elephas* amb el gens COI i ha estat descrita en altres espècies marines (Patarnello et al., 2007; publicació 6). Per altra banda, ni el Gulf Stream ni les discontinuïtats oceanogràfiques de la Mediterrània Occidental no proporcionen resultats significatius amb els Anàlisi de la Variança Molecular (AMOVA) quan usem els marcadors microsatèl·lit, i açò podria ser degut a un efecte de tamany mostral. Tanmateix, hem de senyalar que aquests resultats no impliquen directament que la barreja larval sigui intensa i continuada. Cal tenir en compte que la diferenciació genètica entre poblacions i el nombre efectiu de migrants estan estretament relacionats sota el model de Wright generalment assumit ($F_{st} = 1 / (1+4Nm)$) (Withlock, 1997). Si tenim un valor de F_{st} concret, la proporció de migrants en la població (m) serà molt més baixa en aquelles espècies amb una grandària efectiva major. Per exemple, Palumbi (2003) va trobar que assumint una grandària efectiva de 10^3 , un pendent de variació en valors de F_{st} de 0.01/1000 km correspondria a una distància mitjana de dispersió d'uns 150 km sota un model "stepping-stone" unidimensional. El pendent de variació en valors de F_{st} que obtenim amb el conjunt de dades poblacionals és de 0.0015/1000km (publicació 7). Com que les nostres estimes per a la grandària efectiva actual en *Palinurus elephas* es troben al voltant de $10^{4.11}$ - $10^{4.67}$, fins i tot un pendent per al canvi en valors de F_{st} tan baix com 0.001/1000 km significaria que la distància de dispersió larval és molt més baixa que l'esperat donada una PLD tan llarga com la de *P. elephas* (1,300-2,500km). Per això, tot i que el valor mitjà de F_{st} indica una diferenciació genètica molt baixa, aquesta espècie estaria patint restriccions a la dispersió larval. Consegüentment, el mateix resultat s'hauria d'inferir per a molts altres crustacis decàpodes sotmesos a explotació pesquera i que mostren uns patrons genètics similars, amb valors mitjans de F_{st} baixos i una elevada grandària efectiva (p. e. *Nephrops*, Stamatis et al., 2004; *Homarus*, Triantafyllidis et al., 2005; *Maja*, Sotelo et al., 2008).

S'ha afirmat que l'ADN mitocondrial és apropiat per detectar esdeveniments històrics, i pot ser molt útil descrivint la filogeografia actual d'organismes amb una capacitat de dispersió relativament baixa (Avise, 2000). Com ja hem comentat abans, en

un estudi previ amb dades del gen COI trobarem certa evidència a favor d'un coll d'ampolla provocat o bé per la selecció, o per demografia (publicació 6). Tanmateix, com que només contàvem amb una porció del gen COI i que el mtDNA actua com a un marcador únic, no es va poder descartar l'acció de la selecció sobre qualsevol altre gen dins de la molècula de mtDNA, que imitaria un coll d'ampolla demogràfic. Bazin et al. (2006) senyalen en un estudi recent que el mtDNA podria, de fet, ser un indicador pobre de la grandària poblacional, i suggereixen que episodis freqüents de selecció farien que la quantitat mitjana de polimorfisme mitocondrial fóra semblant en taxa amb unes grandàries poblacionals molt diferents (genetic Draft: Gillespie, 2000). Segons la hipòtesi del "genetic Draft", la reducció en variació provocada per escombrades selectives recurrents, equilibraria els nivells de diversitat neutra (que esperaríem foren més grans en poblacions més grans), fent que el polimorfisme fóra independent del tamany poblacional. L'aproximació bayesiana jeràrquica utilitzada en la publicació 7, però, ens ha permès integrar estimes genètiques independents obtingudes a partir d'un conjunt de loci microsatèl·lit. Els nostres resultats indiquen unes grandàries poblacionals històriques relativament constants en *Palinurus elephas* amb una certa indicació d'expansió poblacional i per tant donen suport a les conclusions de Bazin et al. (2006) que desafien la utilitat de la variació en el mtDNA com a indicador fiable del tamany poblacional. Per altra banda, val a dir que les datacions obtingudes depenen directament de les taxes de mutació assumides, per la qual cosa s'haurien de tenir en compte les consideracions presentades al respecte en la publicació 6 (Ho et al., 2005; Emerson, 2007).

De fet, tant l'estructura poblacional com la desviació d'un model mutacional "stepwise" tendrien a donar valors de $r < 0$, així que de fet hi hauria una major evidència de creixement poblacional en el nostre conjunt de dades. No obstant això, quan una població travessa un coll d'ampolla, la reducció de diversitat genètica depèn de la grandària efectiva i el temps segons l'equació $H_t = H_0(1 - 1/(2N_e))^t$. Un coll d'ampolla amb una duració aproximada de 30-40 anys implicaria una pèrdua més baixa de diversitat genètica per a un organisme amb una grandària efectiva gran i un temps de generació llarg, com és el cas de *Palinurus elephas* (Allendorf, 1986; Dinerstein and McCracken, 1990). Aquesta consideració ens permet indicar que la nostra anàlisi no exclou totalment

la possibilitat d'una reducció del tamany poblacional en una escala temporal recent (Publicació 7). A més, la teoria de genètica de població suggereix que la diversitat genètica es redueix significativament només en poblacions molt petites (Rice 2004) o en processos colonitzadors sotmesos a un efecte fundador sever (Pascual et al., 2007), i per això, fins i tot poblacions 'col.lapsades' poden consistir de massa individus com per mostrar disminucions mesurable en la diversitat genètica amb uns tamanyos mostrals realistes. Per això, la biologia de la llagosta europea podria fer que les dades moleculars indicaren grandàries poblacionals històriques constants, o fins i tot expansions, quan, de fet, hi ha hagut una reducció en el tamany censal.

Un impacte humà direccional podia també estar emmascarant (involuntàriament, clar) les conseqüències genètiques d'una caiguda en la grandària efectiva poblacional. Si la població disminueix mentre la connectivitat també disminueix (p. e. a causa d'una sobrepesca localitzada), llavors inferiríem que la metapoblació ha sigut estable malgrat una reducció en el tamany censal global ('many demes model': Wakeley, 2004, 2005). La pesca de llagosta se centra principalment en la captura d'individus mitjans/grans, fent que l'estructura d'edat varie cap a una talla mitjana més petita en moltes localitats (Portugal, Galhardo et al., 2006; Còrsega, Marin, 1987). Atés que les femelles més grans de *P. elephas* produeixen més ous (Ceccaldi and Latrouite, 1994) i larves més grans i que sobreviuen més temps sota condicions de manca d'aliments (Kittaka and MacDiarmid, 1994), una femella mitjana d'una àrea verge (CL mm de = 120) produiria unes dues vegades més ous que una femella d'una àrea sobreexplotada (CL mm de = 90) (Goñi et al. 2003). Per això, la reducció en el nombre de femelles grans reduiria la variància en l'èxit reproductiu, ja que més individus contribuiran amb una proporció més alta de descendents a la pròxima generació. Com a conseqüència, la grandària efectiva s'unflaria artificialment i podria semblar que la població s'expandís, tot i que la grandària censal o nombre total d'individus seguira disminuint (Rice 2004).

La majoria de les espècies marines presenten classes d'edat amb mortalitats elevades en les primeres fases del desenvolupament, de manera que repetits períodes de reproducció durant la vida d'un individu serveixen per augmentar la seva contribució

global cap a la generació següent (Murphy, 1968). En aquestes espècies, un any amb reclutament fort produeix una cohort d'adults que sobreviu durant un cert nombre de períodes reproductius ('storage effect': Warner and Chesson, 1985). Els reclutaments elevats s'emmagatzemen en la població adulta i són capaços de mantenir la variabilitat genètica en ambients heterogenis (Ellner and Hairston, 1994). A causa de les fluctuacions en el règim oceanogràfic, l'elevada variabilitat en el reclutament afectaria directament les poblacions de *P. elephas*, ja que les larves passen com a mínim 4-5 mesos en aigües oceàniques (Hunter, 1996). Per això, quan es canvia l'estructura d'edats (p.e. a causa de la sobrepesca) les poblacions que depenen de reclutes nous són molt més sensibles front a esdeveniments que redueixen la supervivència larval. Com més gran siga el solapament entre generacions, més petit serà l'impacte de les fluctuacions ambientals en el nivell de variabilitat genètica (Gaggiotti and Vetter, 1999), de manera que mantenir l'estructura d'edats és fonamental per a la conservació de la variació genètica en poblacions de *P. elephas*.

En conclusió, els nostres resultats mostren que l'estructuració genètica és molt baixa en les poblacions de llagosta europea. La població més diferenciada és la població grega, fet que és coherent amb l'aïllament de larves de filosoma al gran gir de la Mediterrània Oriental. D'altra banda, cal assenyalar que les conques atlàntica i mediterrània mostren diferències significatives, fins i tot quan s'exclou de l'anàlisi a la població grega, cosa que indica que hi ha una certa subestructuració tal i com s'ha detectat amb marcadors mitocondrials. Tot i que la sobrepesca ha reduït dramàticament les captures per tota l'àrea de distribució de l'espècie, la grandària efectiva de *P. elephas* sembla que hagi romàs històricament constant. Aquest resultat contradictori podria explicar-se per la biologia de l'espècie i per les limitacions dels marcadors moleculars per cobrir escales temporals molt recents. A més a més, si tenim en compte la grandària efectiva de *P. elephas* ($N_e = 13,000-47,000$), fins i tot valors de F_{st} extremadament petits correspondrien a nivells de dispersió restringits. Tenint en compte aquest fet, les capacitats de dispersió de la llagosta europea serien molt més baixes que l'esperat a partir del seu llarg PLD. Finalment, els nostres resultats indiquen que les estratègies de gestió i polítiques de conservació i pesca d'aquesta espècie haurien de considerar les poblacions

atlàntiques i mediterrànies com a poblacions distintes, i que la població grega s'hauria de considerar una unitat de gestió diferent dins de la conca mediterrània. Els nostres estudis il·lustren la importància de considerar els paràmetres demogràfics i de cicle vital a l'hora d'avaluar els patrons de connectivitat en organismes marins i estudiar els efectes de la sobrepesca sobre l'estructuració genètica d'una espècie explotada.

5.- CONCLUSIONS

1- Les inferències filogenètiques més potents s'obtenen mitjançant els mètodes basats en models probabilístics (ML i BI), ja que permeten l'aplicació de models matemàtics que incorporen patrons més realistes sobre l'evolució de les seqüències moleculars.

2- Les llagostes de l'infraordre Achelata formen un grup monofilètic de crustacis decàpodes compost de dues famílies principals: Palinuridae i Scyllaridae. L'anàlisi molecular confirma Synaxidae com un grup polifilètic, que s'hauria d'incloure dins de Palinuridae.

3- Els Palinuridae estan formats per tres llinatges principals: 1) els Silentes, incloent-hi l'anterior gènere synaxid *Palinurellus*; 2) un clade *Linuparus/Justitia* i 3) un clade principal de Stridentes, incloent-hi els gèneres *Puerulus*, *Palinustus*, *Palinurus*, *Panulirus* i l'anterior synaxid *Palibythus*. A més, els dos clades principals trobats dins del Scyllaridae estan d'acord amb la taxonomia actual basada en dades morfològiques.

4- Finalment, la datació del temps de divergència del grup Achelata obtinguda amb un model de rellotge relaxat és compatible amb hipòtesis prèvies d'un origen Triassic d'aquest grup..

5- S'ha aïllat un conjunt de marcadors microsatèl·lit altament polimòrfics per a *P. elephas* que, a més a més, també amplifiquen i són polimòrfics per a totes les espècies de *Palinurus*.

6- Les espècies de *Palinurus* en aigües superficials semblen tenir unes grandàries poblacionals efectives i un grau de variabilitat en marcadors nuclears majors que les espècies d'aigües profundes, alhora que també semblen haver estat sotmeses a processos més recents de selecció en el mtDNA.

7- L'anàlisi filogenètica dóna suport a un patró d'especiació Nord-Sud al gènere *Palinurus*, amb totes les espècies africanes formant un clade monofilètic.

8- El patró d'especiació en *Palinurus* seria un exemple típic d'una sèrie d'esdeveniments d'especiació ràpids, amb branques molt curtes separant les diferents espècies. Curiosament, els temps de divergència obtinguts utilitzant les taxes de mutació estàndards, permeten relacionar els processos d'especiació als processos de canvi climàtic més destacats dels darrers 2 Mya.

9- Els resultats obtinguts a partir de les dades microsatèl·lit i mtDNA mostren que l'estructuració genètica de les poblacions de llagosta europea és molt baixa. Tanmateix, les conques atlàntica i mediterrània mostren diferències significatives i per tant, es recomana tractar-les com a unitats de gestió diferenciades.

10- Tot i la reducció dràstica en les captures per tota l'àrea de distribució de *P. elephas*, la grandària efectiva poblacional històrica de *P. elephas* sembla haver-se mantés constant. A més a més, cal tenir en compte que l'elevada grandària efectiva poblacional de *P. elephas* provocaria valors de F_{st} extremadament petits, fins i tot per a poblacions amb nivells de dispersió restringits.

CONCLUSIONS

- 1- More powerful inferences are obtained using likelihood-based methods (ML and BI) since they permit the application of mathematical models that incorporate more realistic patterns of sequence evolution.
- 2- Our results indicate that Achelata form a monophyletic group of decapod crustaceans composed of two main families: Palinuridae and Scyllaridae. The molecular analysis confirms Synaxidae as a polyphyletic group, which should be included within Palinuridae.
- 3- The Palinuridae family presents three main lineages: 1) the Silentes, including the former synaxid genus *Palinurellus*; 2) a *Linuparus/Justitia* clade and 3) a main clade of Stridentes, including *Puerulus*, *Palinustus*, *Palinurus*, *Panulirus* and the former synaxid lobster *Palibythus*. Moreover, the two main clades found within the Scyllaridae are in agreement with current taxonomy based on adult morphological data.
- 4- Finally, the dating of divergence of Achelata obtained with a relaxed-clock model is compatible with previous hypotheses of a Triassic origin of the Achelata lobsters.
- 5- A set of highly polymorphic microsatellite markers have been developed from *P. elephas* which also give successful amplification and show polymorphism for all *Palinurus* species.
- 6- Shallow-water *Palinurus* species show larger effective population size and genetic diversity for nuclear markers than their deep-water counterparts. At the same time, selection on the shallow-water species' mtDNA genome seems to have been stronger and more recent.

- 7- Our within-genus phylogenetic analyses consistently supported a North-to-South pattern of speciation in *Palinurus* with all the South-African species forming a monophyletic clade.
- 8- The *Palinurus* speciation pattern is a typical example of a series of rapid speciation events occurring within a group, with very short branches separating the different species. Interestingly, divergence times obtained for *Palinurus* species using the standard rates agree with known glaciation-related processes during the last 2My.
- 9- Our results show that no strong population genetic differentiation is present in the European spiny lobster. However, Atlantic and Mediterranean basins showed significant differences and should be treated as different management units.
- 10- Even though over-fishing has reduced catches dramatically all over its distribution area, historical effective population size seems to have remained constant in the European spiny lobster. The large effective population size of *P.elephas* would cause F_{st} values to be extremely small even for populations with restricted levels of dispersal.

6.- BIBLIOGRAFIA

- Abelló P, Valladares FJ, Castellon A (1988) Analysis of the structure of decapod crustacean assemblages off the Catalan coast (North-West Mediterranean). *Marine Biology*, **98**, 39-49.
- AdriaMed (2007) *Some considerations on the concept and on criteria for defining "priority species" for fishery assessment and management purposes in the GFCM area*. FAO-AdriaMed Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea.
- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology*, **5**, 181-190.
- Avise JC (1998) Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity*, **89**, 377-382.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers. Natural History and Evolution.*, 2 nd edn. Chapman & Hall.
- Avise JC, Hamrick JL (1996) *Conservation genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York, USA.
- Baisre JA (1994) Phyllosoma larvae and the phylogeny of Palinuroidea (Crustacea: Decapoda): a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, **45**, 925-944.
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Molecular Ecology*, **11**, 659-674.
- Bargelloni L, Alarcon JA, Alvarez MC, Penzo E, Magoulas A, Palma J, Patarnello T (2005) The Atlantic–Mediterranean transition: discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 523-535.

- Batten ML, Martinez JR, Bryan DW, Buch EJ (2000) A modeling study of the coastal eastern boundary current system off Iberia and Morocco. *Journal of Geophysical Research*, **105**, 14173-14195.
- Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, **312**, 570-572.
- Beaumont MA, Rannala B (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 251-261.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754-3774.
- Bolstad WM (2004) *Introduction to Bayesian Statistics*. John Wiley.
- Booth JD (1997) Long-distance movements in *Jasus spp.* and their role in larval recruitment. *Bulletin of Marine Science*, **61**, 111-128.
- Booth JD, Phillips BF (1994) Early life history of spiny lobster. *Crustaceana*, **66**, 271-294.
- Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Hebert JM, Carotenuto L, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL (1991) Drift, admixture, and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. *Genetics*, **88**, 839-843.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **18**, 225-239.
- Cannas R, Cau A, Deiana A, Salvadori S, Tagliavini J (2006) Discrimination between the Mediterranean spiny lobsters *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus* Crustacea, Decapoda by mitochondrial sequence analysis. *Hydrobiologia*, **557**, 1-4.
- Cao Y, Adachi J, Janke A, Pääbo S, Hasegawa M (1994) Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 519-527.
- Carr MH (2000) Marine protected areas: challenges and opportunities for understanding and conserving coastal marine ecosystems. *Environmental Conservation*, **27**, 106-109.

- Carreras C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Margaritoulis D, Rees A, Turkozan O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2007) The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conservation Genetics*, **8**, 761-775.
- Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2005) Rapid radiation and cryptic speciation in mediterranean triplefin blennies (Pisces: Tripterygiidae) combining multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 751-761.
- Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2008) Utility of pairwise mtDNA genetic distances for predicting cross-species amplification and polymorphism success in fishes. *Conservation Genetics*, **9**, 181-190.
- Ceccaldi H, Latrouite D (1994) The french fisheries for the European spiny lobster *Palinurus elephas*. In: *Spiny lobster management*. (eds. Phillips B, Cobb J, Kittaka J), pp. 169-177.
- Chakraborty R, Leimar O (1987) Genetic variation within a subdivided population. In: *Population Genetics and & Fishery Management* (eds. Ryman N, Utter F). Washington Sea Grant Publications/University of Washington Press, Seattle.
- Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematics*, **34**, 213-237.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Darwin C (1859) *The origin of species*. John Murray, London.
- Davie PJF (1990) A new genus and species of marine crayfish, *Palibythus magnificus*, and new records of *Palinurellus* (Decapoda: Palinuridae) from the Pacific Ocean. *Invertebrate Taxonomy*, **4**, 685-695.
- Denver DR, Morris K, Lynch M, Vassilieva LL, Thomas WK (2000) High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **289**, 2342-2344.
- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, **56**, 461-473.

- Dinerstein E, McCracken G (1990) Endangered Greater One-horned Rhinoceros Carry High Levels of Genetic Variation. *Conservation Biology*, **4**, 417-422.
- Domingues VS, Bucciarelli G, Almada VC, Bernardi G (2005) Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology*, **14**, 4051-4063.
- Duggen S, Hoernle K, Bogaard P, Rupke L, Morgan J (2003) Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*, **422**, 602-606.
- Ellner SP, Hairston NG (1994) Role of overlapping generations in maintaining genetic variation in a fluctuating environment. *American Naturalist*, **143**, 403-417.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 217-242.
- Emerson BC (2007) Alarm bells for the molecular clock? No support for Ho et al.'s model of time-dependent molecular rate estimates. *Systematic Biology*, **56**, 337-345.
- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriamanga M, Guyomard R (1998) Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, **7**, 339-353.
- FAO (2008) Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series (version 2.32) with the dataset "Capture production 1950-2006", Web-site at <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp>.
- Felsenstein J (2004) *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**, 121-145.
- Gaggiotti OE, Vetter RD (1999) Effect of life history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **56**, 1376-1388.

- Galhardo AC, Serafim P, Castro M (2006) Aspects of the biology and fishery of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) from the southwest coast of Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, **26**, 601-609.
- Gelman A, Carlin JB, Stern H, Rubin DB (2003) *Bayesian Data Analysis (2nd ed.)*. Chapman and Hall, London.
- George R, Main AR (1967) The evolution of spiny lobsters (Palinuridae): a study of evolution in the marine environment. *Evolution*, **21**, 803-820.
- George RW (2006) Tethys origin and subsequent radiation of the spiny lobsters (Palinuridae). *Crustaceana*, **79**, 397-422.
- Gillespie JH (2000) Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics*, **155**, 909-919.
- Glaessner MF (1969) Decapoda. In: *Treatise on Invertebrate Paleontology* (eds. Moore RC, Teichert C). Geological Society of America and University of Kansas Press.
- Goldman N (1998) Phylogenetic information and experimental design in molecular systematics. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **265**, 1779-1786.
- Goni R, Latrouite D (2005) Review of the biology, ecology and fisheries of *Palinurus* spp. species of European waters: *Palinurus elephas* Fabricius, 1787 and *Palinurus mauritanicus* Gruvel, 1911. *Cahiers de Biologie Marine*, **46**, 127-142.
- Goni R, Quetglas A, Renones O (2003) Size at maturity, fecundity and reproductive potential of a protected population of the spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) from the western Mediterranean. *Marine Biology*, **143**, 583-592.
- González EG, Zardoya R (2007) Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 197-209.
- Gopal K, Tolley K, Groeneveld J, Matthee C (2006) Mitochondrial DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the southwestern Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **319**, 191-198.
- Gradstein FM, Ogg JG, Smith AG, Agterberg FP, Bleeker W, Cooper RA, Davydov V, Gibbard P, Hinnov LA, House MR, Lourens L, Luterbacher HP, McArthur J, Melchin MJ, Robb LJ, Shergold J, Villeneuve M, Wardlaw BR, Ali J, Brinkhuis H, Hilgen FJ, Hooker J, Howarth RJ, Knoll AH, Laskar J, Monechi S, Plumb KA,

- Powell J, Raffi I, Röhl U, Sadler P, Sanfilippo A, Schmitz B, Shackleton NJ, Shields GA, Strauss H, Van Dam J, van Kolfshoten T, Veizer J, Wilson D (2004) *A Geologic Time Scale*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Graham M, Kinlan BP, Druehl LD, Garske LE, Banks S (2007) Deep-water kelp refugia as potential hotspots of tropical marine diversity and productivity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **104**, 16576–16580.
- Groeneveld J, Gopal K, George R, Matthee C (2007) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (Decapoda : Palinuridae) with hypotheses on speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**, 102-110.
- Groeneveld JC (2003) Under-reporting of catches of South Coast rock lobster *Palinurus gilchristi*, with implications for the assessment and management of the fishery. *African Journal of Marine Science*, **25**, 407-411.
- Groeneveld JC, Branch GM (2002) Long-distance migration of South African deep-water rock lobster *Palinurus gilchristi*. *Marine Ecology Progress Series*, **232**, 225-238.
- Groeneveld JC, Goni R, Latrouite D (2006) Lobsters of commercial importance: *Palinurus* species. In: *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries* (ed. Phillips BF), pp. 385-411 (Chapter 12). Blackwell, Scientific Publications, Oxford.
- Groeneveld JC, Griffiths CL, van Dalsen AP (2006) A new species of spiny lobster, *Palinurus barbarae* (Decapoda, Palinuridae) from Walters Shoals on the Madagascar Ridge. *Crustaceana*, **79**, 821-833.
- Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology*, **13**, 403-417.
- Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences, genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. Goldstein DB, Schlötterer C). Oxford University Press, Oxford.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 591–600.

- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **99**, 11742-11747.
- Heads M (2005) Towards a panbiogeography of the seas. *Biological Journal of the Linnean Society*, **84**, 675-723.
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (ed. Beaumont AR), pp. 122-134. Chapman & Hall, London.
- Hendy MD, Penny D (1989) A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Systematic Zoology*, **38**, 297-309.
- Hennig W (1950) *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hepper BT (1977) The fishery for crawfish, *Palinurus elephas*, off the coast of Cornwall. *Journal of the Marine Biological Association*, **57**, 925-941.
- Ho SYW, Phillips MJ, Cooper A, Drummond AJ (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1561-1568.
- Hoarau G, Coyer JA, Veldsink JH, Stam WT, Olsen JL (2007) Glacial refugia and recolonization pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Molecular Ecology*, **16**, 3606-3616.
- Holthuis LB (1991) FAO species catalogue. *Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date*. FAO Fisheries Synopsis, 125.
- Howell N, Smejkal CB, Mackey DA (2003) The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: there is a difference between phylogenetic and pedigree rates. *American Journal of Human Genetics*, **72**, 659-670.
- Hudson RR (1991) Gene genealogies and the coalescent process. In: *Oxford Surveys of Evolutionary Biology* (eds. Futuyma D, Antonovics J). Oxford University Press, Oxford.

- Huelsenbeck JP, Crandall KA (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review Of Ecology and Systematics*, **28**, 437-466.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, **294**, 2310-2314.
- Hunter E, Shackley SE, Bennett DB (1996) Recent studies on the crawfish *Palinurus elephas* in South Wales and Cornwall. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **76**, 963-983.
- Hutchings JA (2000) Collapse and recovery of marine fishes. *Nature*, **406**, 882-885.
- Hutchinson WF, Carvalho GR, Rogers SI (2001) Marked genetic structuring in localised spawning populations of cod *Gadus morhua* in the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Marine Ecology Progress Series*, **223**, 251-260.
- Jakobsen PK, Ribergaard MH, Quadfasel D, Schmith T, Hughes CW (2003) Near-surface circulation in the northern North Atlantic as inferred from Lagrangian drifters: variability from the mesoscale to interannual. *Journal of Geophysical Research*, **108**, 3251.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 424-429.
- Kimmel M, Chakraborty R, King JP, Bamshad M, Watkins WS, Jorde LB (1998) Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. *Genetics*, **148**, 1921-1930.
- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**, 624-626.
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press.
- Kimura M (1989) The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome*, **31**, 24-31.
- Kingman JFC (1982) The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, **13**, 235-248.
- Kingman JFC (1982) On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*, **19**, 27-43.

- Kittaka J, Macdiarmid A (1994) Breeding. In: *Spiny Lobster Management* (eds. Phillips B, Cobb J, Kittaka J), pp. 384-401. Fishing News Books, London.
- Knowlton N (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 189-216.
- Knutsen H, Jorde PE, Andre' C, Stenseth NC (2003) Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology*, **12**, 385-394.
- Kusche K, Hembach A, Milke C, Burmester T (2003) Molecular characterisation and evolution of the hemocyanin from the European spiny lobster, *Palinurus elephas*. *Journal of Comparative Physiology B*, **173**, 319-325.
- Lambeck K, Esat T, Potter E (2002) Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, **419**, 199-206.
- Lambert DM, Ritchie PA, Millar CD (2002) Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science*, **295**, 2270-2273.
- Lange CB, Berger WH, Lin HL, Wefer G, 175 SSPL (1999) The early Matuyama diatom maximum off SW Africa, Benguela Current System (ODP Leg 175). *Marine Geology*, **161**, 93-114.
- Larson EJ (2004) *Evolution: The Remarkable History of a Scientific Theory*. Modern Library, New York.
- Law R (2007) Fisheries-induced evolution: present status and future directions. *Marine Ecology Progress Series*, **335**, 271-277.
- Lessios HA, Kessing BD, Pearse J (2001) Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution*, **55**, 955-975.
- Lewis EE, Cane JH (1990) Stridulation as a primary antipredator defense of a beetle. *Animal Behaviour*, **40**, 1003-1004.
- López-Gómez J, Taylor E (2005) Preface. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **229**, 1-2.
- Luikart G, Allendorf F, Cornuet J, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, **89**, 238-247.

- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N (2003) Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **12**, 3213-3217.
- Malanotte-Rizzoli P, B.B. M, M. RdA, A. T, S. B, G. B, E. O (1999) The Eastern Mediterranean in the 80s and in the 90s: The big transition in the intermediate and deep circulations. *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, **29**, 365-395.
- Marin J (1985) La langouste rouge: biologie et exploitation. *La pêche maritime*, **64**, 105-113.
- Marin J (1987) Exploitation, biologie et dynamique du stock de langouste rouge de Corse, *Palinurus elephas* Fabricius., 328p. Université d'Aix-Marseille.
- Marko PB (2004) 'What's larvae got to do with it?' Contrasting patterns of postglacial population structure in two benthic marine gastropods with identical larval dispersal capabilities. *Molecular Ecology*, **13**, 597-611.
- Marlow JR, Lange CB, Wefer G, Rosell-Mele A (2000) Upwelling intensification as part of the Pliocene-Pleistocene climate transition. *Science*, **290**, 2288-2291.
- Mayr E (2001) *What Evolution Is*. Basic Books, New York.
- Mercer JP (1973) Studies on the spiny lobsters (Crustacea: Decapoda: Palinuridae) of the West coast of Ireland, with particular reference to *Palinurus elephas* Fabricius, 1787, 331p. University of Galway.
- Millot C (2005) Circulation in the Mediterranean Sea: evidences, databases and unanswered questions. *Scientia Marina*, **69**, 5-21.
- Moulton J (1957) Sound production in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille). *Biological Bulletin*, **113**, 286-295.
- Murphy GI (1968) Pattern in life history and the environment. *American Naturalist*, **102**, 391-403.
- Naylor E (2005) Chronobiology: implications for marine resource exploitation and management. *Scientia Marina*, **69**, 157-167.
- Naylor E (2006) Orientation and navigation in coastal and estuarine zooplankton. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **39**, 13-24.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.

- Pagel M, Meade A (2004) A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence of character-state data. *Systematic Biology*, **53**, 571-581.
- Palero F, Guerao G, Clark PF (2008) *Palinustus mossambicus* Barnard 1926 (Crustacea: Decapoda: Achelata: Palinuridae); morphology of the puerulus stage. *Zootaxa*, **1857**, 44-54.
- Palumbi S (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, S146-S158.
- Palumbi SR (1994) Genetic-Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**, 547-572.
- Palumbi SR (1996) What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **203**, 75-92.
- Palumbi SR (2004) Marine reserves and ocean neighborhoods: The spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources*, **29**, 31-68.
- Palumbi SR, Cipriano F (1998) Species identification using genetic tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity*, **89**, 459-464.
- Patarnello T, Volckaert F, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, **16**, 4426–4444.
- Patek SN, Oakley TH (2003) Comparative tests of evolutionary trade-offs in a palinurid lobster acoustic system. *Evolution*, **57**, 2082-2100.
- Pearson WR, Robins G, Zhang T (1999) Generalized neighbor-joining: more reliable phylogenetic tree reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 806-816.
- Pollock DE (1990) Palaeoceanography and speciation in the spiny lobster genus *Jasus*. *Bulletin of Marine Science*, **46**, 387-405.
- Pollock DE (1993) Speciation in spiny lobsters-clues to climatically-induced changes in ocean circulation patterns. *Bulletin of Marine Science*, **53**, 937-944.

- Porter ML, Pérez-Losada M, Crandall KA (2005) Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 355-369.
- Prange M, Romanova V, Lohmann G (2002) The glacial thermohaline circulation: stable or unstable? *Geophysical Research Letters*, **29**, 2028-2031.
- Prange M, Schulz M (2004) A coastal upwelling seesaw in the Atlantic Ocean as a result of the closure of the Central American Seaway. *Geophysical Research Letters*, **31**, L17207.
- Ptacek MB, Sarver SK, Childress MJ, Herrnkind WF (2001) Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Panulirus* (Decapoda : Palinuridae). *Marine and Freshwater Research*, **52**, 1037-1047.
- Puillat I, Taupier-Letage I, Millot C (2002) Algerian Eddies lifetime can near 3 years. *Journal of Marine Systems*, **31**, 245–259.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**, 285-288.
- Relini M, Torchia G (1997) Unexpected displacement of a spiny lobster in the Ligurian Sea. *Biologia Marina Mediterranea*, **5**, 641-643.
- Rice SH (2004) *Evolutionary Theory: Mathematical and Conceptual Foundations*. Sinauer Associates, PO Box 407, Sunderland, MA.
- Robainas A, Monnerot M, Solignac M, Dennenbouy N, Espinosa G, Machado EG (2002) Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Ecology Notes*, **2**, 344-345.
- Rocha LA, Robertson DR, Roman J, Bowen BW (2005) Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, 573-579.
- Rögl F (1999) Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography. *Geologica Carpathica*, **50**, 339-349.
- Rokas A, Carroll SB (2005) More Genes or More Taxa? The Relative Contribution of Gene Number and Taxon Number to Phylogenetic Accuracy. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1337-1344.
- Ronquist F (2001) TreeFitter, Version 1.0, Department of Systematic Zoology, Uppsala University, Sweden (www.ebc.uu.se/systzoo/research/treefitter/treefitter.html).

- Rousset F, Raymond M (1997) Statistical analyses of population genetic data: New tools, old concepts. *Trends in Ecology and Evolution*, **12**, 313-317.
- Salat J (1996) Review of hydrographic environmental factors that may influence anchovy habitats in the Northwestern Mediterranean. *Scientia Marina*, **60**, 21-32.
- Scholtz G, Richter S (1995) Phylogenetic systematics of the reptantian Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **113**, 289-328.
- Schram FR (2001) Phylogeny of decapods: moving toward a consensus. *Hydrobiologia*, **449**, 1-20.
- Shanks AL, Eckert GL (2005) Population persistence of California Current fishes and benthic crustaceans: A marine drift paradox. *Ecological Monographs*, **75**, 505-524.
- Shoemaker JS, Painter IS, Weir BS (1999) Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics*, **15**, 354-358.
- Siesser WG (1980) Late Neocene origin of the Benguela upwelling system off northern Namibia. *Science*, **208**, 283-285.
- Sotelo G, Moran P, Fernandez L, Posada D (2008) Genetic variation of the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in the northeastern Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, **362**, 211-223.
- Stamatis C, Triantafyllidis A, Moutou KA, Mamuris Z (2004) Mitochondrial DNA variation in northeast atlantic and mediterranean populations of norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology*, **13**, 1377-1390.
- Stephens M (2001) Inference under the coalescent theory. In: *Handbook of statistical genetics* (eds. Balding DJ, Bishop M, Cannings C). John Wiley and Sons, West Sussex, U.K.
- Tajima F, Nei M (1984) Note On Genetic Drift and Estimation Of Effective Population-Size. *Genetics*, **106**, 569-574.
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**, 389-399.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**, 6463-6471.

- Tolley K, Groeneveld J, Gopal K, Matthee C (2005) Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. *Marine Ecology Progress Series*, **297**, 225-231.
- Triantafyllidis A, Apostolidis A, Katsares V, Triantafyllidis A, Apostolidis A, Katsares V, Kelly E, Mercer J, Hughes M, Jørstad K, Tsolou A, Hynes R, Triantaphyllidis C (2005) Mitochondrial DNA variation in the European lobster (*Homarus gammarus*) throughout the range. *Marine Biology*, **146**, 223-235.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 330-343.
- Udekem d'Acoz C (1999) *Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N*. Patrimoines naturels (M.N.H.N./S.P.N.).
- Upchurch P (2008) Gondwanan break-up: legacies of a lost world? *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 229-236.
- Urbani N, Sevigny JM, Sainte-Marie B, Zadworny D, Kuhnlein U (1998) Identification of microsatellite markers in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Molecular Ecology*, **7**, 357-358.
- Verbruggen H, De Clerck O, Schils T, Kooistra WHCF, Coppejans E (2005) Evolution and phylogeography of *Halimeda* section *Halimeda*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 789-803.
- Wakeley J (2004) Metapopulation models for historical inference. *Molecular Ecology*, **13**, 865-875.
- Wakeley J (2005) The limits of theoretical population genetics. *Genetics*, **169**, 1-7.
- Warner RR, Chesson PL (1985) Coexistence mediated by recruitment fluctuations - A field guide to the storage effect. *American Naturalist*, **125**, 769-787.
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, **2**, 1123-1128.
- Whitlock M, McCauley D (1999) Indirect measure of gene flow and migration: F_{ST} does not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity*, **82**, 117-125.
- Whitlock MC, Barton NH (1997) The effective size of a subdivided population. *Genetics*, **146**, 427-441.

- Woods H (1931) *A monograph of the fossil macrurous crustacea of England*. Paleontological Society, London.
- Wooster WS, Bakum A, McLain DR (1976) The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *Journal of Marine Research*, **34**, 131-140.
- Yang Z (1996) Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 367-372.
- Zariquiey Alvarez R (1968) *Crustaceos decapodos ibéricos*. ICM-CSIC, Barcelona.

Informe dels directors

a) Factor d'impacte de les publicacions

Títol de la Tesi: Genètica evolutiva en llagostes de l'infraordre Achelata

Autor: Ferran Palero Pastor

Directors: Dra. Marta Pascual, Dr. Pere Abelló, Dr. Enrique Macpherson

La memòria de tesi doctoral presentada per Ferran Palero Pastor titulada "Genètica evolutiva en llagostes de l'infraordre Achelata", ha estat dirigida conjuntament per la Dra. Marta Pascual de la Universitat de Barcelona, el Dr. Pere Abelló de l'Institut de Ciències del Mar (CSIC) i el Dr. Enrique Macpherson del Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CSIC). Aquesta tesi consta de set articles, quatre d'ells publicats o acceptats en vies de publicació, i tres per enviar properament.

Tots els articles publicats han passat per la revisió d'investigadors anònims designats pels editors. A continuació es detalla l'índex d'impacte de les revistes i la posició en l'àrea segons les dades del *ISI Web of Science*, edició 2007. Els tres articles encara no publicats s'enviaran a revistes internacionals tant de l'àrea de la Biologia Evolutiva com de l'Ecologia.

Publicació 1 Phylogenetic inference using molecular data

Capítol de llibre

Decapod Crustacean Phylogenetics

Editors. Joel W. Martin, Keith A. Crandall, Darryl L. Felder.

CRC / Taylor & Francis

disponible el 2009. ISBN: 9781420092585.

Publicació 2 Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata)

Molecular Phylogenetics and Evolution

Impact Factor: **3,994**

Posició en l'àrea: 10/35 (Evolutionary Biology)

Publicació 3 Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*

Molecular Ecology Resources (Formerly Molecular Ecology Notes)

Impact Factor: **1,409**

Posició en l'àrea: 62/116 (Ecology)

Posició en l'àrea: 30/35 (Evolutionary Biology)

Publicació 4 Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795

per enviar

Publicació 5 Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus* spp) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data

per enviar

Publicació 6 Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes

Molecular Phylogenetics and Evolution

Impact factor: **3,994**

Posició en l'àrea: 10/35 (Evolutionary Biology)

Publicació 7 Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population structure and conservation strategies of European spiny lobster

per enviar

Signat:

Marta Pascual Berniola

Pere Abelló Sala

Enrique Macpherson Mayol

Barcelona, 7 d'octubre de 2008

Informe dels directors

b) Contribució del candidat en publicacions amb més signants

Títol de la Tesi: Genètica evolutiva en llagostes de l'infraordre Achelata

Autor: Ferran Palero Pastor

Directors: Dra. Marta Pascual, Dr. Pere Abelló, Dr. Enrique Macpherson

Publicació 1

Palero F., Crandall K. 2009. Phylogenetic Inference Using Molecular Data. *In: Decapod Crustacean Phylogenetic* (Eds. Joel W. Martin, Keith A. Crandall, Darryl L. Felder). CRC / Taylor & Francis

El candidat ha recopilat tota la informació i ha redactat l'article durant una estada al laboratori del Dr. Crandall a la Brigham Young University (USA).

Publicació 2

Palero F., Crandall K., Abelló P., Macpherson E., Pascual M. (2009). Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **50**: 152-162.

El candidat ha fet la major part del mostreig (inclosa feina a museus), tot el treball de laboratori, totes les anàlisis i la redacció de la major part de l'article. Part del treball de laboratori el va fer en el laboratori del Dr. Crandall.

Publicació 3

Palero F., Pascual M. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Palinurus elephas*. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 1477–1479.

El candidat ha fet tot el treball de laboratori, totes les anàlisis i la major part de la redacció de l'article.

Publicació 4

Palero F., Abelló P., Macpherson E., Matthee C.A., Pascual M. Cross-species amplification and microsatellite variability in spiny lobsters of the genus *Palinurus* Weber, 1795

El candidat ha fet gran part de la feina de mostreig, tot el treball de laboratori, totes les anàlisis i la major part de la redacció de l'article. El Dr. Matthee ha proporcionat material de les espècies sudafricanes i ha contribuït a la discussió.

Publicació 5

Palero F., Lopes J., Abelló P., Macpherson E., Pascual M., Beaumont M. Rapid radiation in spiny lobsters (*Palinurus* spp) as revealed by classic and ABC methods using mtDNA and microsatellite data

El candidat ha fet gran part de la feina de mostreig, tot el treball de laboratori, part de les anàlisis i la major part de la redacció de l'article. Part del treball computacional l'ha fet en el laboratori del Dr. Beaumont a University of Reading (UK). J. Lopes ha fet part de les simulacions i ha contribuït a la discussió.

Publicació 6

Palero F., Abelló P., Macpherson E., Gristina M., Pascual M. (2008). Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 708-717.

El candidat ha fet gran part de la feina de mostreig, tot el treball de laboratori, totes les anàlisis i la major part de la redacció de l'article. El Dr. Gristina ha proporcionat material de Sicília i ha contribuït a la discussió.

Publicació 7

Palero F., Abelló P., Macpherson E., Beaumont M, Pascual M., Influence of long larval phase and oceanic boundaries on population structure and conservation strategies of European spiny lobster

El candidat ha fet gran part de la feina de mostreig, tot el treball de laboratori, totes les anàlisis i la major part de la redacció de l'article. Part del treball computacional l'ha fet en el laboratori del Dr. Beaumont.

Signat:

Marta Pascual Berniola

Pere Abelló Sala

Enrique Macpherson Mayol

Barcelona, 7 d'octubre de 2008