

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Conectividade e variabilidade genética do
tubarão galha-branca oceânico, *Carcharhinus longimanus*,
usando DNA mitocondrial**

Sâmia Mouallem de Camargo

**Botucatu – SP
2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Conectividade e variabilidade genética do
tubarão galha-branca oceânico, *Carcharhinus longimanus*,
usando DNA mitocondrial**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Sâmia Mouallem de Camargo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

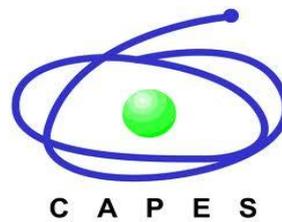
**Botucatu – SP
2015**

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



Genética Pesqueira e Conservação
Instituto do Mar - UNIFESP



*Dedico aos meus pais, Cristina e Thiers, e a minha irmã Laila,
por serem minhas maiores inspirações.*

Agradecimentos

Foram muitas pessoas que contribuíram de diferentes maneiras, para que esse trabalho fosse realizado, jamais conseguiria colocar em palavras o quanto sou grata a cada uma delas, deixo registrado aqui alguns nomes, mas agradeço imensamente a todos que de alguma forma, estiveram presentes comigo nessa trajetória.

Ao meu orientador Professor Fernando Fernandes Mendonça por toda confiança em mim depositada desde a iniciação científica, pela compreensão nos momentos difíceis e pela nítida alegria compartilhada quando alcançávamos um dos nossos objetivos. Obrigada pela paciência e por sempre estar presente. Obrigada também por todos os ensinamentos e por me abrir as portas para esse mundo tão apaixonante dos tubarões. Me sinto privilegiada de ser sua primeira aluna. Muito obrigada por tudo Chefe!

Ao Professor Fausto Foresti por todo apoio nesse trabalho, pelo exemplo de pessoa e de profissional que é para todos nós, por sempre estar disposto a ajudar e por acreditar em todos nós.

Ao Professor Cláudio Oliveira por todas as oportunidades geradas e por não medir esforços para nos ajudar sempre.

Ao Professor Rui Coelho pela contribuição na viabilização deste estudo, além do essencial suporte teórico.

À Professora Adriane Wasko por todo incentivo durante esses dois anos, principalmente no desenvolvimento da cartilha, por me mostrar que nosso papel como pós-graduandos vai muito além da nossa própria pesquisa.

À Professora Luciana Lunardi pela revisão da cartilha. Imagino que não foi uma tarefa fácil passar por cima da fobia pessoal com os tubarões para realizar a correção.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP – Botucatu por todas as trocas, pela amizade, pelo convívio diário e por tantos auxílios teóricos e práticos. Agradeço especialmente a Natália (Marionete), Priscila, Ricardo (Tarja), Maria Ligia, Luz, Vanessa, Bruno Melo, Bruno (Guiodai), Daniela, Duílio, Bruno (Piteira), Yuldi, Guilherme (Varvito) por toda amizade dentro e fora do laboratório vocês fizeram dessa caminhada muito melhor e mais divertida. Muito obrigada de coração!

Ao Yuldi, Guilherme (Varvito), Bruno Melo, Vanessa, Luz e Cristiane um agradecimento particular por toda ajuda, pelo apoio e suporte acadêmico e por todas as discussões científicas. Vocês foram essenciais nessa etapa da minha formação.

A todos os meus amigos, novos e de muito tempo, pelo companheirismo, pelo apoio, carinho e alegria que podemos passar durante nossos encontros. Vocês estão sempre comigo, mesmo longe!

À República Tarja Preta por serem minha família em Botucatu durante 5 anos, por me mostrarem que os melhores momentos da vida só valem a pena quando compartilhados. Dual, Bússola, Siga, Diaze, Efe, Rivo e Travs vocês são irmãs que a vida me permitiu escolher!

A todos do grupo Oficina da Dança, cada um de vocês foi imprescindível durante esses anos. Obrigada por toda arte, por todo companheirismo, por todas as conquistas, por me mostrarem o valor e a importância de um trabalho em grupo. Ao meu mestre e grande amigo Rubens Barbosa por acreditar inteiramente no potencial de cada um de nós, por me trazer de volta a arte de uma forma tão bela e única.

Aos meus grandes camaradas Cui, TôSu, Filips, Paxola e Kim por toda alegria que só vocês tem, por compartilháramos tantas histórias e por me fazerem sorrir a cada encontro. A amizade de vocês me torna uma pessoa melhor. Um brinde a vocês, meus amigos!

Ao meu maior companheiro Caio, por sempre acreditar em mim e em nós, por toda paciência nos momentos difíceis, pelo cuidado, pelo auxílio constante, por projetar cada nova etapa comigo, por partilhar a alegria de cada vitória como se fosse a sua própria, por ser meu grande incentivador e por encher nossos dias com muito amor e sorrisos.

A todos da minha família, especialmente a minha mãe Cristina, ao meu pai Thiers e a minha irmã Laila, vocês são os meus exemplos e minha força. Cada um de vocês preencheu, e continua preenchendo, minha trajetória de forma essencial e única. É por vocês que meu desejo de lutar não cessa. Obrigada por todo amor dedicado a nossa família. Vocês são minha maior motivação!

Resumo

Até poucas décadas atrás, a captura de tubarões era considerada apenas como incidental e sem efeitos significativos para as suas populações. No entanto, principalmente devido ao grande aumento no valor das nadadeiras e ao declínio das populações de peixes mais tradicionais para o consumo humano, os tubarões passaram a serem alvos das pescarias em praticamente todo o mundo. Destes, o tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus* apresenta fortes sinais de esgotamento populacional, estando listado atualmente como globalmente “Vulnerável” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza. Entre os parâmetros básicos para a definição de planos de conservação eficientes, a aquisição de conhecimentos sobre a estrutura genética populacional das espécies é um passo fundamental para o estabelecimento de políticas de conservação eficazes. Dessa maneira, considerando a urgente necessidade de ações para a preservação de diversas espécies de elasmobrânquios e o ainda o restrito conhecimento a respeito de sua biodiversidade e distribuição, sobretudo de seu ponto de vista molecular, este estudo teve como objetivo caracterizar a estrutura genética populacional do tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus* no Oceano Atlântico e em regiões do Oceano Índico, utilizando sequências nucleotídicas da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop). A partir de 215 espécimes de *C. longimanus*, foram obtidos 724 pares de bases analisáveis, identificando nove sítios polimórficos que resultaram em 12 haplótipos distintos. A diversidade nucleotídica total foi de $\pi = 0.0013$ e a diversidade haplotípica de $h = 0.5953$. Estes resultados mostram uma variabilidade genética ligeiramente abaixo da média observada entre outras espécies de tubarões pelágicos. A análise de variância molecular (AMOVA) evidenciou níveis moderados de estrutura populacional ($F_{ST} = 0.1039$, $P < 0.001$), com restrição de fluxo gênico entre o Oceano Atlântico Ocidental e

Oriental, com uma forte relação deste último com o Oceano Índico. Assim, para a expansão dos planos de conservação da espécie, também para a manutenção de seus estoques genéticos, devem ser consideradas, ao menos, duas populações no Oceano Atlântico e mais atenção deve ser dirigida às áreas onde os maiores índices de diversidade genética foram encontrados. Dado que a aquisição de conhecimentos a respeito das causas ambientais associadas à perda da biodiversidade é capaz de induzir mudanças comportamentais e, portanto, contribuir à conservação biológica, o presente trabalho também incluiu o desenvolvimento de uma cartilha como estratégia educativa contendo informações básicas sobre os tubarões e raias, as principais causas no aumento dos riscos de extinção, a importância da identificação das espécies e da preservação do ecossistema marinho (Apêndice I).

Palavras-chave: Região controladora do DNA mitocondrial, Estrutura populacional, *Carcharhinus longimanus*, Elasmobrânquios, Genética da conservação.

Abstract

Until few decades ago, shark catching was considered to be only incidental and with no significant effects on their populations. However, the great increase in the fins market value combined with declining levels of traditional fish population for human consumption, sharks have become targets of the fisheries worldwide. Among these, the whitetip shark *Carcharhinus longimanus* shows strong signs of population depletion, and is currently listed as globally "Vulnerable" according to the Red List of Threatened Species of the International Union for Conservation of Nature. Regarding conservation plans, acquiring knowledge about the population genetic structure of the species is a fundamental step towards establishing effective conservation policies. Considering the limited information about population dynamics of the oceanic whitetip shark, were used partial sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region to determine its population genetic structure across the Atlantic Ocean and the Indian Ocean. Were sampled 215 specimens of *C. longimanus* and obtained 724 base pairs (bp), identifying nine polymorphic sites, which resulted in 12 distinct haplotypes. The total nucleotide diversity was $\pi = 0.0013$ and haplotype diversity $h = 0.5953$. These results show a genetic variability slightly below the observed average among other species of pelagic sharks. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) evidenced moderate levels of population structure ($F_{ST} = 0.1039$, $P < 0.001$) with restriction of gene flow between the Western and Eastern Atlantic Ocean with a strong relationship of this latter with the Indian Ocean. Thus, for the expansion of conservation plans of the species, also for the maintenance of their genetic stocks, should be considered at least two populations in the Atlantic Ocean and more attention to areas where the greatest genetic diversity indexes were found. As the acquisition of information about the environmental causes that are associated to species extinction can induce behavioral changes and, therefore, contribute

to biodiversity conservation, the present project also included the development of educational strategy gathering information about the extinction risks, genetics identification and elasmobranch conservation. (Appendix I).

Keywords: Mitochondrial control region DNA, Population structure, *Carcharhinus longimanus*, Elasmobranchs, Conservation Genetics.

Sumário

1. Introdução	11
1.1. <i>O tubarão galha-branca oceânico <i>Carcharhinus longimanus</i></i>	13
1.2. <i>Marcadores moleculares, DNA mitocondrial e região controle</i>	16
2. Objetivos	21
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	21
3. Material e Métodos	21
3.1. <i>Coleta das amostras</i>	21
3.2. <i>Extração de DNA, amplificação e sequenciamento</i>	24
3.3. <i>Análise das sequências</i>	25
4. Resultados e Discussão	28
5. Bibliografia completa	45
6. Material complementar	54
6.1. <i>Apêndice I</i>	55
6.2. <i>Apêndice II</i>	71

1. Introdução

Os oceanos e mares ocupam mais de 70% do planeta e mantêm a biodiversidade extremamente rica até em grandes profundidades, onde abundantes formas de vida prosperam (Gouletquer et al. 2014). Além disso, o ambiente marinho abrange um dos maiores habitats do planeta e a mais longa história evolutiva. Portanto, há uma crescente preocupação a respeito do aumento da influência humana sobre a biodiversidade marinha que tem ocorrido ao longo dos últimos 500 anos (Dulvy et al. 2014). Reduções na riqueza ou abundância das espécies podem ameaçar serviços ambientais, tais como a pesca ou a ciclagem de nutrientes e podem reduzir a estabilidade do ecossistema global (Danovaro et al. 2008, Selig et al. 2014, Worm et al. 2006). Embora a diminuição da fauna tenha sido menos intensa nos oceanos do que na terra, o efeito sobre os animais marinhos está aumentando em ritmo e impacto e mesmo com um começo considerado tardio, os seres humanos já mudaram poderosamente quase todos os principais ecossistemas marinhos (McCauley et al. 2015).

Estudos recentes concluíram que sobrepesca, poluição, soterramento dos estuários, modificações na costa, introdução de espécies invasoras, aquecimento global, acidificação do oceano, entre outros impactos ecológicos, têm reduzido os ecossistemas marinhos consideravelmente (Erlandson e Rick 2010). Dentre esses, a sobrepesca representa a maior ameaça direta às populações de peixes marinhos no mundo todo e tem sido reconhecida como o principal problema ambiental e socioeconômico nos oceanos pela redução da biodiversidade e modificações no funcionamento dos ecossistemas (Gallagher et al. 2014, Worm et al. 2009). A pesca excessiva pode provocar o colapso de estoques, alterar cadeias tróficas nas comunidades marinhas causando, conseqüentemente, a queda na riqueza das espécies e o desencadeamento de um efeito em cascata destrutivo e imprevisível.

Em todo o mundo, a captura de elasmobrânquios (tubarões e raias) podia ser considerada praticamente como uma ocorrência acidental, embora sempre tenha havido comercialização da carne e de subprodutos destes animais. No entanto, principalmente nas últimas três décadas, esse quadro se alterou drasticamente e, com a valorização das nadadeiras comercializadas principalmente na Ásia, as pescarias de tubarões passaram a ser direcionadas a diversas espécies. Nos dados estatísticos da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) sobre a exploração pesqueira mais recente, foi registrado, no ano de 2013, a captura mundial de aproximadamente 770.930 toneladas de elasmobrânquios, com cerca de 523.000 toneladas de tubarões e o restante de raias. Deste total, cerca de 310.000 toneladas foram capturadas apenas no Oceano Atlântico, sendo o Brasil responsável pela captura de aproximadamente 21.000 toneladas (FAO 2014). A partir do ano 2000, o Brasil passou a ser considerado pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “Major Shark fishing State” (Lack et al. 2006).

Em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido incluídas nas listas de risco de extinção da IUCN (Camhi et al. 1998). Por serem espécies consideradas “K” estrategistas, tubarões e raias são particularmente vulneráveis à sobre-exploração apresentando crescimento lento, maturidade sexual tardia, longos ciclos reprodutivos, baixa fecundidade e reduzido número de filhotes gerados (Stevens et al. 2000). Dentre as espécies de grande porte comumente capturadas nas pescarias oceânicas no Atlântico, algumas já apresentaram declínios populacionais acima de 50% de acordo com os registros das últimas décadas (Baum et al. 2003). Segundo Baum (2003), no Atlântico Norte, foi estimado o declínio de aproximadamente 90% para as espécies do gênero *Sphyrna* (tubarões-martelo) e

declínio de cerca de 70% para as populações do tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus*. Para estas mesmas espécies, os dados referentes às capturas no Atlântico Sul ainda permanecem inconsistentes.

A Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção - CITES é um dos acordos ambientais mais importantes para preservação das espécies, tendo a maioria dos países do mundo como signatários, entre eles o Brasil. Em março de 2013, por uma proposição brasileira, esta convenção determinou a inclusão de cinco espécies de elasmobrânquios (*Sphyrna lewini*, *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna zygaena*, *Manta birostris* e *Carcharhinus longimanus*) em seu apêndice II que determina a obrigatoriedade da emissão e acompanhamento de licenças expedidas por órgãos governamentais em todas as operações de comércio internacional que incluam estas espécies. Esta inclusão, no caso dos tubarões, teve como objetivo principal controlar o comércio internacional das suas nadadeiras, efetuado especialmente entre a China e a grande maioria dos países que realizam a pesca em ambientes marinhos.

1.1. O tubarão galha-branca oceânico *Carcharhinus longimanus*

Pertencente ao gênero mais diverso de tubarões, a espécie *Carcharhinus longimanus* (Poey 1861), popularmente conhecida como galha-branca, é uma espécie oceânica de distribuição mundial (Compagno 1984, Fourmanoir 1961, Smith 1997), por muito tempo frequentemente capturada, sobretudo para a retirada das longas nadadeiras arredondadas e com as extremidades brancas, característica morfológica marcante no tubarão que permite fácil identificação da espécie (Figuras 1 e 2). O tubarão galha-branca é um predador topo de cadeia, relativamente grande (podendo alcançar mais de 3 metros de comprimento) e

altamente migratório (Compagno 2001). Nas listas de ameaça de extinção da IUCN, a espécie é classificada mundialmente como “Vulnerável” e classificada como “ criticamente em Perigo” no Atlântico Noroeste e Central (Baum et al. 2006). Juntamente com *Carcharhinus falciformis* e *Prionace glauca*, *Carcharhinus longimanus* já foi considerada uma das espécies de tubarões oceânicos mais abundantes entre todos os animais marinhos de grande porte (Bonfil 1994, Castro et al. 1999, Compagno 1984). No entanto, observações recentes têm registrado apenas ocasionalmente a ocorrência desta espécie (Baum e Myers 2004), evidenciando a fragilidade frente a exploração pesqueira imposta nos últimos anos.

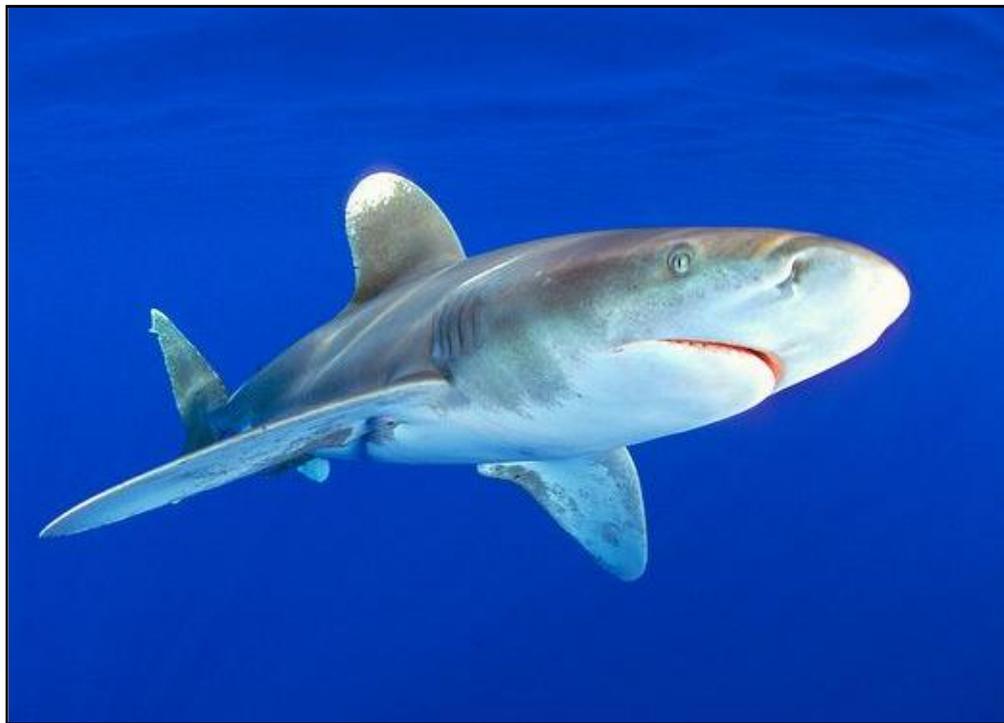


Figura 1. Foto da espécie *Carcharhinus longimanus*. Fonte: www.arkive.org

O tubarão galha-branca se torna maduro sexualmente a partir dos seis anos, possui gestações de nove a doze meses e uma média de 5 a 6 filhotes gerados a cada dois anos

(Camhi et al. 2008, Lessa et al. 1999). Similar a outras espécies da família Carcharhinidae, a espécie *Carcharhinus longimanus* é vivípara com desenvolvimento embrionário placentário e apesar de possuir uma distribuição mundial e ter sido intensamente capturada na maioria dos grandes navios pesqueiros, pouca atenção tem sido dada à sua biologia e ecologia (Camhi et al. 2008). Até o presente momento, poucos estudos foram realizados a fim de conhecer o ciclo reprodutivo da espécie e em um dos trabalhos mais recentes realizado por Coelho et al. (2009), foi observado que o tamanho da primeira maturação ocorre entre 160 e 196 centímetros nos machos, e de 181 a 203 centímetros nas fêmeas. Seu período de gestação é de 10 a 12 meses como descrito anteriormente (Backus et al. 1956, Seki et al. 1998, Stevens 1984) porém, ainda não foi possível estabelecer um ciclo reprodutivo definitivo para esta espécie.

A dinâmica e a estrutura populacional do tubarão *C. longimanus* também permanecem desconhecidas até o momento e estudos do ponto de vista genético ainda são muito restritos. Li et al. (2014) apresentaram a sequência completa do DNA mitocondrial do tubarão e Mendes et al. (2015) desenvolveram marcadores microssatélites. Além desses, outro trabalho importante para o conhecimento da biologia da espécie foi o realizado por Howey-Jordan et al. (2013), onde a primeira evidencia de filopatria, retorno dos indivíduos para o sua área de nascimento (Mayr 1963), é descrita para as fêmeas.

Antes de sua inclusão no Apêndice II da CITES, no Hemisfério Norte, a delimitação de quotas de pesca para *C. longimanus*, era a única medida de conservação. No Brasil, a espécie foi classificada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) como “Espécie Ameaçada de Extinção” e pela Instrução Normativa nº 1 de 12 de

março de 2013, sua captura é proibida em toda a zona de exploração marítima brasileira (ICMBio 2013).

Obviamente, a efetiva conservação desta espécie circunglobal requer ampla cooperação internacional (Baum et al. 2006), o que passou a ser buscado através da CITES e seus signatários. No entanto, as lacunas no conhecimento científico a cerca desta espécie ainda poderão limitar medidas eficientes para a recuperação e manutenção de suas populações.



Figura 2. Distribuição da espécie *Carcharhinus longimanus*. Fonte: www.flmnh.ufl.edu

1.2. Marcadores moleculares, DNA mitocondrial e região controle.

Nos últimos anos, uma representativa parcela da comunidade científica mundial tem se dedicado ao conhecimento relacionado à diversidade biológica e à conservação dos recursos genéticos, utilizando desde as tradicionais técnicas para os estudos de DNA até as mais recentes inovações biotecnológicas aplicadas em análises intra e interespecíficas para

avaliação de processos evolutivos, estimativas do grau de variabilidade genética, análises de zonas de contato entre espécies, fluxo gênico, biogeografia histórica, caracterizações de estruturas populacionais, sistemática molecular, inferência de relações filogenéticas, e identificação específica de espécimes processados, entre outras (Avice et al. 1987, Ortí et al. 1996).

Com a evolução do conhecimento sobre marcadores de DNA e o acelerado desenvolvimento recente da biotecnologia, estudos genéticos estão sendo incorporados à conservação das espécies de forma prática e eficiente. Para o setor pesqueiro, a identificação e manutenção de estoques genéticos diferenciados são elementos fundamentais pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho e Hauser 1994), constituindo-se o conhecimento da variabilidade genética das populações e a estrutura destas entidades biológicas no ambiente os objetivos básicos estabelecidos em programas de controle e conservação das espécies (Lindenmayer e Lacy 1995).

Já há algum tempo, os padrões de diversificação do DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo reconhecidos como ferramentas potencialmente importantes nos estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris e Berg 1987, Toledo et al. 1992), possibilitando a distinção de populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos (Bermingham e Martin 1998, Patarnello et al. 2003, Perdices et al. 2004). As observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies apresentam uma distribuição geográfica determinada introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avice et al. 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de sequências entre estes segmentos genômicos, Avice (2000) propõe e discute

categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas.

Dessa maneira, o DNA mitocondrial tornou-se uma ferramenta comum e eficiente em elucidar as relações entre indivíduos, em diferentes escalas evolutivas também pelas suas propriedades peculiares, como a presença de somente genes ortólogos, falta de recombinação e taxas de substituição aproximadamente 10 vezes maiores que as encontradas para genes nucleares (Brown et al. 1979, Gissi et al. 2000). Além disso, segundo Heist (2005), a região controladora do DNA mitocondrial, também conhecida como D-loop, contém os maiores trechos de DNA não codificante e exibe a maior taxa de substituição do DNA mitocondrial. Por isso, essa região tem sido amplamente utilizada para entender a estruturação populacional em elasmobrânquios (Ashe et al. 2015, Castro et al. 2007, Clarke et al. 2015, Ferrette et al. 2015, Hoelzel et al. 2006, O'Leary et al. 2015, Portnoy et al. 2014).

Schultz et al. (2008) identificaram fortes restrições ao fluxo gênico em populações do tubarão-limão, *Negaprion brevirostris*, coletadas no Brasil, Bahamas e Guiné Bissau, além de caracterizar os níveis de variabilidade genética em cada população. Neste estudo, ficou evidente a estruturação entre as porções do leste e oeste do Oceano Atlântico e ainda uma moderada diferenciação entre as amostras brasileiras coletadas no hemisfério sul e as amostras das Bahamas, no Caribe. Em outro estudo realizado por Chapman et al. (2009) com a espécie *Sphyrna lewini*, estes autores encontraram uma forte diferenciação estrutural no Atlântico, com estoques distintos no Golfo do México, Caribe e América do Sul. Do mesmo modo, para os tubarões de pequeno porte *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii*, duas das espécies mais capturadas em pescarias costeiras das Américas, Mendonça et al. (2013, 2011)

identificaram seus níveis de diversidade genética e fortes estruturações entre populações do Atlântico Ocidental.

Em estudos com espécies pelágicas de hábitos semelhantes ao do tubarão galha-branca a região controladora do DNA mitocondrial também é amplamente utilizada. O'Leary et al. (2015) avaliaram a diversidade genética do tubarão branco, *Carcharodon carcharias*, no Noroeste Atlântico e na África do Sul utilizando as sequências mitocondriais e 14 loci de microssatélite. Neste estudo foi caracterizada a existência de duas populações geneticamente distintas. Em outro trabalho, com o tubarão crocodilo, *Pseudocarcharias kamoharai*, Ferrette et al. (2015) encontraram um alto fluxo gênico entre as regiões dos Oceanos Atlântico e Índico, com um único estoque genético e reduzida variabilidade populacional. Clarke et al. (2015) relataram uma avaliação genética dos tubarões-seda, *Carcharhinus falciformis*, amostrados na maior parte da sua área global de ocorrência e, no geral, pelo menos cinco populações de tubarões-seda foram identificadas indicando que esforços de conservação e de gestão devem ser exercidos em pequenas escalas.

Pela observação dos modelos de dinâmica populacional de tubarões oceânicos e costeiros estudados do ponto de vista genético, acredita-se que cada espécie possui características que, associadas às pressões ambientais, podem determinar estruturas populacionais distintas. No entanto, padrões compartilhados, se identificados, poderão viabilizar o desenvolvimento de planos de manejo eficientes para um grupo de espécies. Desta forma, sendo determinada uma região prioritária de proteção que englobe importantes estoques de diversas espécies, é possível diminuir recursos e esforços no manejo e controle da pesca de maneira localizada. Considerando a urgente necessidade de medidas de conservação para um grande número de espécies de tubarões e a atual falta de informações que viabilizem

estas medidas, o objetivo desse trabalho foi gerar dados a respeito das dinâmicas populacionais da espécie *Carcharhinus longimanus* no Oceano Atlântico, utilizando as sequências da região controladora do DNA mitocondrial para identificar seus níveis de variabilidade genética, determinar a distribuição geográfica de suas populações e, assim, caracterizar estoques genéticos diferenciados.

2. Objetivos

Considerando a escassez de informações científicas e a urgente necessidade de medidas de conservação para um grande número de espécies de tubarões, este trabalho tem como objetivo gerar dados a respeito das dinâmicas populacionais da espécie *Carcharhinus longimanus* no Oceano Atlântico e em regiões do norte e oeste do Índico, utilizando sequências nucleotídicas da região controladora do DNA mitocondrial.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a diversidade genética do tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus* ao longo de sua distribuição no Oceano Atlântico e regiões do Índico;
- ✓ Identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial de *C. longimanus* na área estudada;
- ✓ Testar hipóteses de estruturação populacional e filogeográfica estabelecendo as relações entre as populações da espécie;
- ✓ Gerar conhecimento científico sobre elasmobrânquios e subsidiar ações globais de conservação desta espécie.

3. Material e Métodos

3.1. Coleta das amostras

O presente estudo, incluindo a coleta das amostras, foi desenvolvido em colaboração científica entre pesquisadores do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (UNESP); do Departamento de

Ciências do Mar, Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); do Centro de Ciências do Mar (CCMar) da Universidade do Algarve e Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA) – Portugal e School of Marine and Atmospheric Science, na Stony Brook University – USA.

Para a caracterização da diversidade genética e padrões de estruturação da espécie *Carcharhinus longimanus* foram coletadas amostras em regiões oceânicas através de barcos de pesca que operam com espinheis de superfície e meia água e redes de espera (deriva) em uma área abrangendo os hemisférios norte e sul e as regiões leste e oeste do Atlântico e em regiões do norte e oeste do Índico. Foram analisadas 215 amostras, sendo 28 capturadas no noroeste atlântico, 51 provenientes da região equatorial oeste atlântico, 6 amostras obtidas da região sudoeste atlântico, 50 amostras capturadas na região denominada mezo-atlântico, 54 do nordeste atlântico, 17 amostras do sudoeste atlântico e 9 amostras do noroeste do Oceano Índico (Figura 3). A maior parte destas amostras foi obtida por observadores de bordo que operam em barcos portugueses em praticamente toda a faixa Leste do Atlântico e por pesquisadores que trabalham junto aos desembarques nos Estados de Santa Catarina, São Paulo e Pará, no Brasil. As amostras provenientes de “Cat Island” nas Bahamas e do Oceano Índico foram obtidas por pesquisadores e observadores de bordo norte americanos. Nestas coletas foram preservados fragmentos de tecido muscular em solução de etanol a 95%, acondicionados em tubos individuais devidamente identificados.

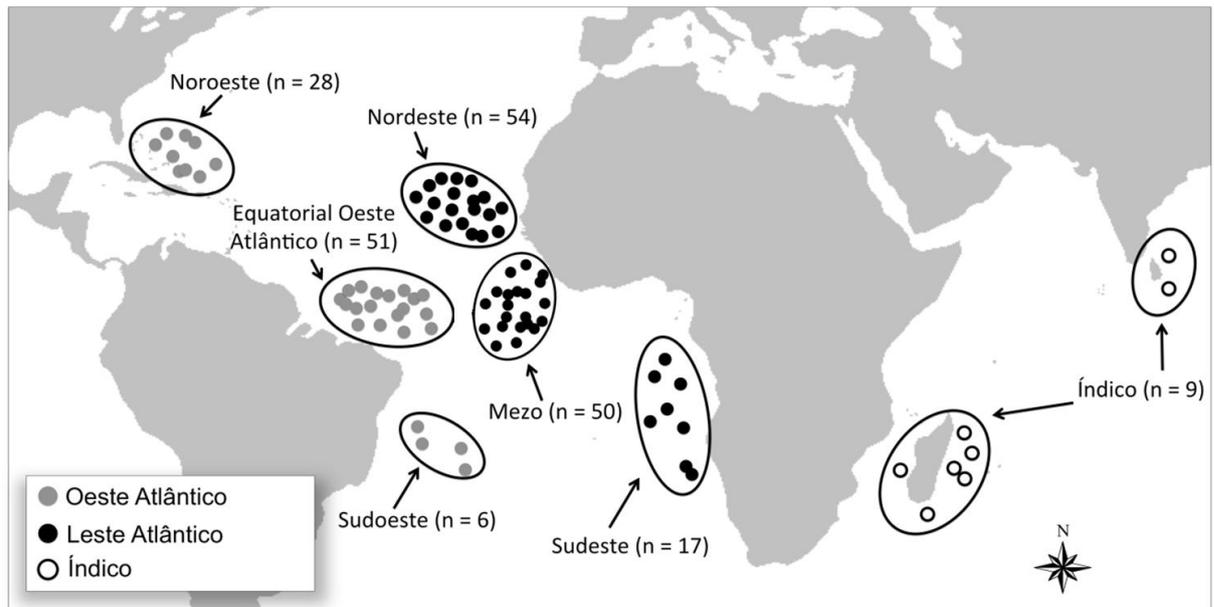


Figura 3. Localização geográfica da amostragem de *C. longimanus* utilizadas no estudo sendo n o número amostral de cada região.

As amostras obtidas foram depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP, Botucatu, credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. Para a obtenção, transporte e utilização de material biológico nacional foram expedidas licenças permanentes em nome do curador da coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Ministério do Meio ambiente). Licenças individuais para a aluna-autora, seu orientador e demais colaboradores no Brasil foram expedidas em caráter excepcional quando necessário. Para as amostras obtidas pelos pesquisadores colaboradores estrangeiros, todos os critérios e requisitos foram seguidos e lavrados de acordo com a Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES e de acordo com a legislação local e suas instituições sede.

3.2. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.

O DNA genômico das amostras de tubarões foi extraído utilizando o kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey & Nagel, Düren, Germany) seguindo o protocolo do fabricante que consiste em 80µl de tampão de lise, 8 µl de proteinase e uma porção de 0.025 a 10 mg de tecido livre de etanol. A solução contendo o tecido, tampão e proteinase foi mantida por 4 a 8 horas a 56°C para a digestão completa do tecido. Após esse procedimento, foram criadas condições apropriadas para a ligação do DNA a uma membrana de sílica através da adição de etanol. A mistura foi aplicada ao NucleoSpin® Tissue XS (Macherey & Nagel, Düren, Germany) pra que a ligação do DNA a essa membrana de sílica fosse concluída. Subsequentemente, dois passos de lavagem foram realizados para remover contaminações e o DNA foi eluído com 5-30 mL de tampão de eluição ligeiramente alcalino de baixa força iônica (5 mM Tris-HCl, pH 8,5). A quantificação e a verificação de contaminação das amostras de DNA obtidas foram realizadas em espectrofotômetro.

A amplificação parcial dos segmentos de DNA da região controladora (*D-loop*) com cerca de 1000 pb, foi efetuada em ciclador térmico de PCR modelo Veriti 96, (Applied Biosystems) utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 100 ng de primers (F. 5' - CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG - 3' e R. 5' - GGC TTA GCA AGG TGT CTT CTT GG - 3') descritos por Mendonça et al. (2009), 1 unidade de enzima *Taq* Polimerase (Invitrogen) e 1µl da solução de extração do DNA genômico. Cada ciclo de PCR foi constituído basicamente de desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com 35 repetições. Os segmentos de DNA

amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com GelGreen™ sob luz ultravioleta.

A purificação enzimática do produto de PCR foi realizada usando o kit ExoSAP-IT®, seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir do seguinte protocolo: para cada amostra 2µl de pré-mix (fornecido no kit - Dye-Terminator), 2µl de produto de PCR purificado e 2µl de cada primer (10µM), em termociclador modelo Veriti 96 (Applied Biosystems). Após o final da reação de sequenciamento o produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando-se EDTA (0,5Mm) como agente quelante para a eliminação dos primers, dNTPs e ddNTPs não incorporados durante a amplificação de sequenciamento e acetato de sódio como agente protetor do produto amplificado, seguindo o protocolo recomendado no kit de sequenciamento DYEEnamic ET dye terminator (Applied Biosystems). Em seguida, a composição nucleotídica destes fragmentos foi determinada pela da leitura dos fragmentos sequenciados através do sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.3. Análise das sequências

Os eletroferogramas das sequências do fragmento de DNA mitocondrial foram visualizados através do programa Geneious 4.8.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012) o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento. A edição e o alinhamento das sequências também foram realizados através do programa Geneious 4.8.5. O alinhamento foi executado utilizando o programa *Muscle Alignment* implementado no Geneious 4.8.5. A identidade das sequências foi confirmada

utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores.

Para as análises populacionais foram calculadas a composição nucleotídica, a composição percentual das bases, a diversidade das sequências, o número de sítios polimórficos, a frequência e a diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.5.1.3 de Excoffier et al. (2005) e o programa DnaSP Sequence Polymorphism (Rozas et al. 2003). Um dos métodos mais utilizados para quantificar a diferenciação genética entre populações é baseado na estatística F implementada por Sewal Wright (1949,1965). A Estatística F de Wright quantifica o efeito de endocruzamento da subdivisão populacional denominado índice de fixação. Esse índice é um excelente indicador de diferenciação genética, pois permite uma comparação objetiva do efeito geral da estrutura populacional entre diferentes organismos (Hartl e Clark 2010). Segundo Wright (1978) os valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam uma baixa estruturação genética, entre 0,05 e 0,15 estruturação moderada, entre 0,15 e 0,25 alta e acima de 0,25 uma forte estruturação genética.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) produz estimativas dos componentes da variância molecular refletindo a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (entre populações, entre as populações dentro de um grupo e entre grupos). A AMOVA foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005) utilizando a estatística F de Wright (1949, 1965), sendo a significância estatística do F_{ST} determinada pelas permutações não-paramétricas

(Excoffier et al. 1992), com 1000 permutações. As amostras com localizações geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e entre pares de regiões.

A rede de haplótipos foi elaborada com critério de parcimônia estatística utilizando o programa Network 4.1.1.2 (Bandelt et al. 1999). Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997) também foram feitos utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005) para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle. Para avaliar a história demográfica das espécies foi utilizado o teste “Mismatch Distribution” (Rogers e Harpending 1992).

4. Resultados e Discussão

Considerando a relevância das informações genéticas para o conhecimento biológico do tubarão galha-branca expostas neste trabalho, sua potencial aplicação em planos de conservação e sua larga abrangência geográfica conferida pela área de estudo explorada, apresenta-se o item “Resultados e Discussão” na forma de um manuscrito completo em língua inglesa. Assim, espera-se ampliar o alcance da Dissertação, acelerar os procedimentos para sua publicação em revista científica de impacto internacional, contando ainda, com seu aprimoramento com base nas recomendações da Banca Avaliadora.

Connectivity, structure genetic variability of the oceanic whitetip shark, *Carcharhinus longimanus*, determined using mitochondrial DNA

Abstract

Elasmobranch stocks have suffered drastic declines in recent years as a result of targeted and bycatch fisheries. Among large species of sharks, the oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* has declines estimated up to 90 percent in parts of its range. Currently, this highly migratory pelagic is listed by the IUCN Red List as "vulnerable" throughout its range and "critically endangered" in the western north Atlantic. Gathering information about population structure and genetic connectivity is an effective way to contribute to the establishment of operative strategies to conserve threatened species. Considering the limited information about population dynamics of the oceanic whitetip shark, were used partial sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region to determine its population genetic structure across the Atlantic Ocean and the Indian Ocean. Were sampled 215 specimens of *C. longimanus* and obtained 724 base pairs (bp), identifying nine polymorphic sites, which resulted in 12 distinct haplotypes. The total nucleotide diversity was $\pi = 0.0013$ and haplotype diversity $h = 0.5953$. These results show a genetic variability slightly below the observed average among other species of pelagic sharks. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) evidenced moderate levels of population structure ($F_{ST} = 0.1039$, $P < 0.001$) with restriction of gene flow between the Western and Eastern Atlantic Ocean with a strong relationship of this latter with the Indian Ocean. Thus, for the expansion of conservation plans of the species, also for the maintenance of their genetic stocks, should be considered at least

two populations in the Atlantic Ocean and more attention to areas where the greatest genetic diversity indexes were found.

Introduction

The impact of fishing on populations of sharks and rays (elasmobranchs) are widely debated globally (Stevens et al. 2000). Some large species commonly caught in marine fisheries in the Atlantic Ocean have already demonstrated significant population declines of more than 50% in the last 10 years (Baum et al. 2003). The International Union for Conservation of Nature (IUCN), which provides measures for conservation for all taxa (Camhi et al. 1998), lists more than a thousand species of elasmobranchs, being 32 of which belong to the genus *Carcharhinus* (IUCN 2014).

The oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* is a pelagic species of worldwide distribution, found in tropical and subtropical open waters (Bonfil 2008, Compagno 1984). This formerly abundant large oceanic shark is subject to widespread fishing pressure throughout its range. Often caught in large numbers as bycatch in pelagic fisheries (pelagic longlines, probably pelagic gillnets, handlines, pelagicand, bottom trawls) combined with exposure to the international fin trade have led to estimated declines of up 90% (Baum et al. 2006). Together with *C. falciformis* and *Prionace glauca*, *C. longimanus* was once considered one of the most abundant ocean sharks (Bonfil 1994, Castro et al. 1999, Compagno 1984, Hoenig et al. 1990). However, recent population information suggests that the whitetip shark, which was formerly almost ubiquitous in water depths greater than 180 m, and temperatures exceeding 20°C (Castro et al. 1999) is now only occasionally recorded. Thus in the IUCN Red List denotes *C. longimanus* as "Vulnerable" and "Critically Endangered" in the Northwest and Central Atlantic (Baum et al. 2006). *Carcharhinus longimanus* is one of the five species listed in the Appendix II of the CITES in 2013, which means that its fishing and commerce need licensing and regulation.

Fundamental to sustainable use of resources and quantification of productivity of ocean ecosystems is the identification and maintenance of distinct stocks (Carvalho and Hauser 1994). Conservation of genetic variability is one of the basic objectives in regulatory programs assisting in the recovery of endangered species (Lindenmayer and Lacy 1995). As such, the sequencing of the mitochondrial DNA control region (D-loop) is one of the most commonly applied method to population genetic studies of vertebrates, including sharks (Clarke et al. 2015, Mendonca et al. 2013, Karl et al. 2011, Portnoy et al. 2010, Ovenden et al. 2009, Hoelzel et al. 2006).

Drastic population declines, such as that observed in the oceanic whitetip in the last 50 years, raises questions about the maintenance of genetic variability and the putative loss of evolutionary lineages. These issues are more relevant in species with population structure where the distribution of genetic characteristics is geographically limited. Therefore, this study aimed to describe the genetic variability and population structure of *Carcharhinus longimanus* from the Atlantic and Indian Oceans by using control region of mitochondrial DNA.

Material and Methods

Sampling

Samples of *Carcharhinus longimanus* were collected by onboard observers from the Portuguese Institute for the Ocean and Atmosphere (IPMA), Portugal, within the scope of the European Data Collection framework (PNAB/DCF Plano Nacional de Recolha de Dados da Pesca), the SELECT-PAL project and by fishery observers placed onboard commercial pelagic longline vessels from Brazilian and American fleets in several regions of

the Atlantic and Indian Oceans. Tissue samples were collected opportunistically during the normal fishing operations of the vessels, taking small muscle or fin fragments (<1cm³) which were subsequently frozen in 95% ethanol. Tissue samples from the north Atlantic were collected as part of an ongoing study of oceanic whitetip movement and life history in The Bahamas. All samples were collected under the Cape Eleuthera Institute research permit (MAF/FIS/17 and MAF/FIS/34) and in accordance with Stony Brook University and Cape Eleuthera Institute regulations developed within the guidelines for Animal Behaviour and the Animal Behaviour Society (Howey-Jordan et al. 2013). No specific permissions was required for collecting samples of *C. longimanus* until the species effectively became part of CITES in 2014.

A total of 215 specimens were sampled, 206 collected from different regions of the Atlantic Ocean (28 samples from Northwest Atlantic, 51 samples from the Western Equatorial Atlantic, 54 samples from the Northeast Tropical Atlantic, 50 samples from the Mezo Atlantic, 17 samples from the Southeast Atlantic and six samples from the Southwest Atlantic. An additional nine samples were collected from the Indian Ocean (Figure 1).

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted using the NucleoSpin® Tissue XS Kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany). Partial sequences of the control region of the mitochondrial DNA were attained according to Mendonça et al. (2009). Individual reactions were performed with approximately 30 ng DNA template, 3.2 pmol primer, 1 µl terminator mix, and 5 µl Better Buffer (The Gel Co.) in a total volume of 15 µl. PCR sequencing profiles consisted of an initial denaturation step of 4min at 96°C, followed by 30 cycles of 30s at 96°C, 15s at 50°C,

and 4 min at 60°C. Cycle sequencing was performed with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequencing was completed on an automated sequencer, ABI 3130, manufactured by Applied Biosystems. The consensus sequences were assembled and edited using Geneious 4.8.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012) and aligned with Muscle algorithm implemented within Geneious 4.8.5. The generated haplotypes were deposited in GenBank under accession numbers KT160318-KT160329.

Population genetics analyses

The relative nucleotide composition, number of polymorphic sites, haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π), and number of pairwise nucleotide differences among populations were calculated using ARLEQUIN 3.5.1.3 software (Excoffier and Lischer 2010). To estimate levels of genetic divergence among populations of *C. longimanus* diversity index Φ_{ST} was calculated using the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) under the nucleotide evolution model of Tamura-Nei (Tamura and Nei 1993). The Φ_{ST} estimates were tested with 1.000 non-parametric bootstrap pseudoreplicates using the ARLEQUIN 3.5.1.3 software, and the values were adjusted for simultaneous pairwise comparisons using the sequential Bonferroni correction (Rice 1989). A minimum-spanning haplotype network was estimated using the Network 4.611 program (Bandelt et al. 1999). Evidence of population expansion was tested using Fu's F test (Fu 1997) and Tajima's D (Tajima 1989) in ARLEQUIN 3.5.1.3. The mismatch analysis in ARLEQUIN 3.5.1.3 included a raggedness index to determine goodness-of-fit to a unimodal distribution (Harpending 1994).

Results

Among the 215 analyzed specimens of *Carcharhinus longimanus* we obtained a total matrix with 724 bp with 9 polymorphic sites, yielding 12 haplotypes (Table 1). The total nucleotide frequencies were observed as Adenine = 30.12%, Thymine = 36.92%, Cytosine = 20.12% and Guanine = 12.84%.

Table 1. Polymorphisms found in the twelve haplotypes of *Carcharhinus longimanus*.

Haplotypes	Polymorphic sites								
	1	2	2	2	2	2	3	4	5
	9	1	3	5	7	9	9	0	2
	2	0	0	0	6	4	9	0	9
1	G	C	T	A	T	G	T	C	T
2	C	.	.
3	.	.	C	.	.	.	C	.	.
4	.	.	C	.	.	A	C	.	.
5	.	.	C	.	C	.	C	.	.
6	.	.	C	G	.	.	C	.	.
7	.	.	C	.	.	.	C	.	C
8	C
9	A	C	.	.
10	A	.	C	.	.	.	C	.	.
11	.	T	C	.	.	.	C	T	.
12	.	T	C	.	C	.	.	T	.

In the overall analyses were found low relative levels of haplotype diversity $h = 0.5953$ and nucleotide diversity $\pi = 0.0013$, with the greatest diversities found in the Southwest Atlantic Ocean ($h = 0.8000$, $\pi = 0.1481$), and in the Mezo Atlantic Ocean ($h = 0.7567$, $\pi = 0.1545$). The haplotypes of number three (H3=131 individuals) and one (H1=32 individuals) were the most common haplotypes and were found in all sampled regions, representing 75.8% of the specimens of whitetip shark analyzed. Numbers of polymorphic

sites, haplotypes, nucleotide diversity and haplotypic diversity for different samples are shown in Table 2 and 3.

Table 2. Geographical distribution of haplotypes of *Carcharhinus longimanus* delimited by areas in the Atlantic and Indian Ocean.

Haplotypes	Northwest Atlantic (n=28)	Western Eq. Atlantic (n=51)	Southwest Atlantic (n=6)	Mezo Atlantic (n=50)	Northeast Atlantic (n=54)	Southeast Atlantic (n=17)	Indian Ocean (n=9)	Total (215)
1	8	13	1	8	1	1	.	32
2	4	7	.	3	1	1	1	17
3	13	22	3	22	50	15	6	131
4	1	3	1	6	.	.	.	11
5	1	4	1	7	1	.	1	15
6	1	1
7	.	1	1	2
8	.	1	1
9	.	.	.	1	1	.	.	2
10	.	.	.	1	.	.	.	1
11	.	.	.	1	.	.	.	1
12	.	.	.	1	.	.	.	1

Table 3. Population statistics of *Carcharhinus longimanus* - n, number of individuals; P polymorphic sites; Nh, number of haplotypes; h, haplotype diversity; π , nucleotide diversity.

	n	P	Nh	h	π
Northwest Atlantic	28	5	6	0,7037	0,00177
WesternEquatorial Atlantic	51	5	7	0,7431	0,00170
Southwest Atlantic	6	4	4	0,8000	0,00184
Mezo Atlantic	50	7	9	0,7567	0,00192
Northeast Atlantic	54	4	5	0,1440	0,00034
Southeast Atlantic	17	2	3	0,2279	0,00047
Indian Ocean	9	3	4	0,5833	0,00092

The AMOVA test was adopted following hypothetical groups of population structure that consider the possibilities of a maximum and minimum number of populations. In these

hypotheses, the most structured index was obtained in the simulation considering the sampling groups separated into Eastern and Western Atlantic Ocean, obtaining an index of $F_{ST} = 0.1039$ ($P < 0.001$). This greatest genetic differentiation was observed among groups willing to East Atlantic (Northeast Atlantic, Southeast Atlantic and Mezo Atlantic) and the West Atlantic (Northwest Atlantic, Western Equatorial Atlantic and Southwest Atlantic). In this case, the indices related to genetic variability were $h = 0.716$ and $\pi = 0.00165$ in West Atlantic, and $h = 0.471$ and $\pi = 0.00104$ in the East Atlantic. Due to the low sampling from the Indian Ocean, in the AMOVA, no statistically significant levels were found when left it as a distinct group. However, in the F_{ST} pairwise is observed the absence of the structure between the Indian group and the groups of the East Atlantic. Considering the sample groups of Indian Ocean and eastern Atlantic forming a single population, the genetic variability indices were $h = 0.476$ and $\pi = 0.00103$.

Table 4. Differentiation index (F_{ST}) between pairs of sampled regions in the Atlantic and Indian Oceans. Pairwise F_{ST} numbers are in below diagonal and significance p-values are in above diagonal.

	Northwest Atlantic	Western Eq. Atlantic	Southwest Atlantic	Mezo Atlantic	Northeast Atlantic	Southeast Atlantic	Indian Ocean
Northwest Atlantic	0	-	-	-	+	+	-
Western Eq. Atlantic	- 0.0228	0	-	-	+	+	-
Southwest Atlantic	- 0.0005	-0.0224	0	-	-	-	-
Mezo Atlantic	0.0309	0.0201	-0.0943	0	+	-	-
Northeast Atlantic	0.2716	0.2085	0.1352	0.0965	0	-	-
Southeast Atlantic	0.1170	0.0949	0.0081	0.0290	-0.0137	0	-
Indian Ocean	0.1092	0.0814	-0.0623	0.0019	0.0237	-0.0224	0

The haplotype network was drawn up criteria of statistical parsimony using the Network 4.611 program that group the close related mitochondrial DNA lineages. More than 60% analyzed sequences share a single haplotype (H3) found in all sampled regions. Thus, the haplotype network elucidated genetic relationships between sampling areas but do not show correlations among different branches and their geographic distributions (Figure 1).

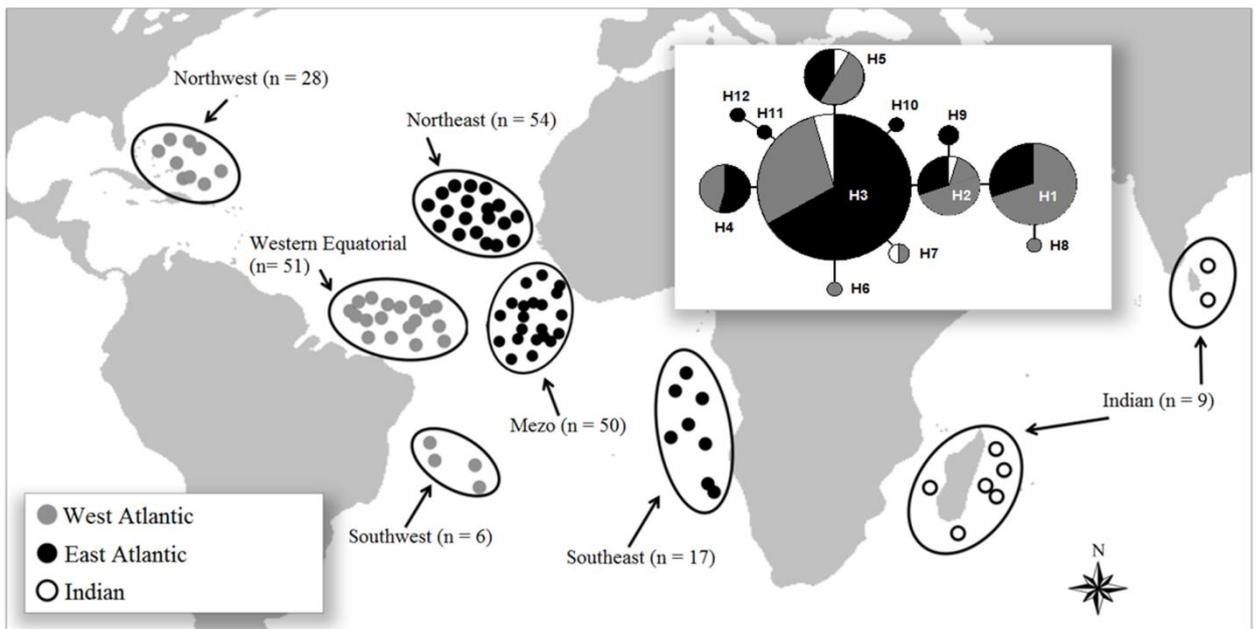


Figure 1. Geographic distribution of samples of *Carcharhinus longimanus* with the network haplotypes analyzed and compiled from the sequences of the mitochondrial DNA control region.

The neutrality test of Fu F_s , resulted in negative indexes in the East Atlantic $Fu F_s = -4.0629$ ($P = 0.0440$) and in the West Atlantic $Fu F_s = -1.5613$ ($P = 0.2470$) with significant deviations from the null hypothesis of neutrality, suggesting the occurrence of population expansion (Table 5). The Mismatch Distribution's showed an unimodal pattern in all analyzed groups herein, which confirms our hypothesis of recent population expansion (Figure 2).

Table 5. Values of Tajima's D test and Fu's F_s with their respective p values.

	West Atlantic	East Atlantic	Indian Ocean
Tajima's D	0.0010	-0.9574	-1.5129
Tajima's p - value	0.5790	0.1470	0.0590
Fu's F_s	-1.5613	-4.0629	-1.8916
Fu's F_s p - value	0.2470	0.0440	0.0110

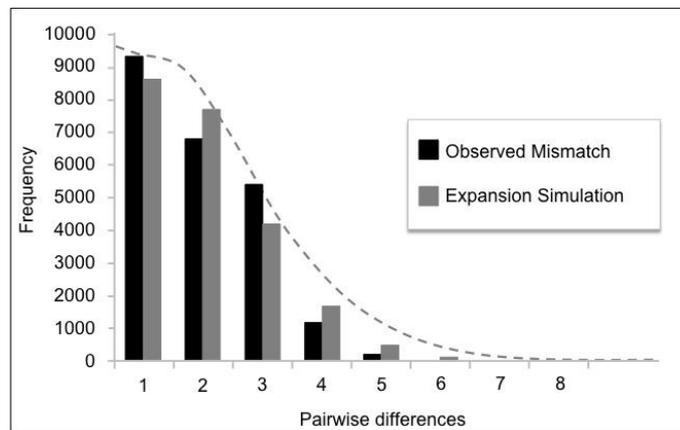


Figure 2. Pairwise mismatch distributions for all sampled regions in the Atlantic and Indian Oceans. Dotted line represents the trend line of the pairwise differences.

Discussion

Population genetics of the whitetip shark

The results show low levels of genetic diversity for the oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* in the Atlantic, as in the Indian Ocean, although the latter has been evaluated with a small number of individuals. Population genetic studies with marine vertebrates, such as bony fishes, cetaceans and other elasmobranchs (including pelagic sharks) also report low values of nucleotide and haplotypic diversity in the Atlantic Ocean (Bradman et al. 2011, Karl et al. 2012, Mesnick et al. 2011, Phillips et al. 2011, Proietti et al. 2012). Pelagic species with wide oceanic distribution and similar habits to the oceanic whitetip shark also present low nucleotide diversity, such as the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai* (Ferrette et al. 2015), the basking shark *Cetorhinus maximus* (Hoelzel et al. 2006), the blue shark *Prionace glauca* (Teixeira 2011) and the whale shark *Rhincondon typus* (Castro et al. 2007, Schmidt et al. 2009).

Although low levels of nucleotide diversity of the mtDNA control region are not considered standard for elasmobranchs, similar results to those obtained here for *C. longimanus* have been found in other species, particularly in highly migratory species (Blower et al. 2012, Castro et al. 2007, Hoelzel. et al. 2006). The combination of low haplotypic diversity with a single haplotype shared by most of individuals is uncommon for sharks. Examples of these exceptions are *Negaprion acutidens* (Schultz et al. 2008), *Ginglymostoma cirratum* (Karl et al. 2012) and *Carcharodon carcharias* (O'Leary et al. 2015).

Considering two distinct groups in the Atlantic Ocean and based on the hypothetical population groupings and genetic structuring simulations, were observed restrictions to gene

flow with moderate genetic divergence through the AMOVA analysis ($F_{ST} = 0.1039$), with one population from the West Atlantic and other the population from the East Atlantic. Population genetic studies of this type can, however, often show absence of structure for highly migratory Atlantic species, such as the whale shark *Rhincodon typus* (Castro et al. 2007), the tuna *Thunnus obesus* (Martínez et al. 2006) and the blue marlin *Makaira nigricans* (Buonaccorsi et al. 2001). Other migratory species as the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai* (Ferrette et al. 2015) and the white marlin *Tetrapturus albidus* (Graves and McDowell 2006) also showed no structured distribution of distinct populations throughout the Atlantic Ocean using the mtDNA control region. However, in the latest study on population genetic structure of the white shark, presented by O'Leary et al. (2015), was observed the same configuration of the present study, being the $\Phi_{ST} = 0.10$ with sequences of mtDNA control region and $F_{ST} = 0.1057$ with microsatellite marker, between the northwest Atlantic (N = 35) and southern Africa (N = 131).

Considering the migration potential of *C. longimanus*, as well as of the white shark, it would not be surprising to observe panmictic populations. However, the first evidence of philopatry, which consists in the return of individuals to their birthplace, home range, or elsewhere adopted locality (Mayr 1963) by females was recently described for *C. longimanus* (Howey-Jordan et al. 2013), probably could influence the reduction of gene flow, at least for the females.

The haplotype network denotes genetic differences among individuals without showing correlations between the different branches and their geographic distributions, with a characteristic pattern of an unstructured population. Although recent dispersion of fishes between the Indian and Atlantic Oceans are rare, mtDNA data show that some species of

tropical and sub-tropical fish found in the Indian Ocean may cross the barrier of Benguela (Rocha et al. 2005). A strong genetic connectivity between the Indian Ocean group and the Eastern Atlantic groups through the pairwise F_{ST} (Table 4), despite low values of statistical significance, was demonstrated a putative absence of barriers restricting the population diversification of *C. longimanus*.

In addition to the results of population expansion, the haplotype network in star contraction generated from the haplotype H3 also suggests an expansion event, possibly from the individuals of the eastern Atlantic, where the highest rates were observed in diversity with higher frequency on the H3.

More genetic studies and their importance in the evolutionary history of elasmobranchs with oceanic distribution, as well as for the management of commercially exploited shark species is needed. Phylogeographic studies presenting extensive sampling and appropriate geographic scales including habitats with different ecological characteristics (such as oceanic and continental, tropical or subtropical) have a greater chance of detecting evolutionarily significant units, which would facilitate the development and application of appropriate conservation measures (Rocha et al. 2007).

Conservation of the whitetip shark

Many researchers argue that sharks are currently subjected to sustainable fishing pressure, which has caused drastic population declines in several species, putting many in danger of extinction. Among these species impacted by fishing, the *C. longimanus*, occurring in all tropical oceans, is ranked globally as "vulnerable" by the IUCN Red List. Considering the important relation between the sustainability of a natural population and their genetic

configuration, it turns evident the rapid necessity to uncover information about global levels of genetic diversity and geographical distribution as well as patterns of gene flow and the detection of significant evolutionary units, becomes evident. Herein, present the genetic population structure of the whitetip shark *Carcharhinus longimanus* with information for the biological knowledge of the species and its application in conservation.

Here we present evidence of the two populations of whitetip shark between the western and eastern portions of the Atlantic. This should mean for Organs of conservation that despite the migration potential of the species, there are barriers to gene flow, making them genetically distinct and demographically independent. Still, it is observed that the forces that prevent unrestricted gene flow in the Atlantic are not effective between east Atlantic and at least in part of the Indian Ocean.

In addition to the low levels of genetic variability found for whitetip shark in throughout the study area, considering two populations in the Atlantic, was observed an important difference in these levels, being the haplotype diversity of the eastern population 34.2% minor than the western population. This difference was even more striking for nucleotide diversity being 36.9% minor than eastern population. Low genetic variability rates found may represent a dramatic risk to the adaptive potential of the species leading to a weaker ability to respond to environmental changes, and consequently, could promote lineage extinction in the future. The observation of populations with differential indices of genetic diversity raises a question about the priority of conservation plans. These should focus on the population with the highest index, so that the species does not lose its evolutionary potential, or in the population with the lowest genetic variability, so that it does not reach further critical levels, causing inbreeding and reduced reproductive success? The conservation of genetic

diversity should be maintained as major global conservation goals and their maintenance must be pursued diligently in each of the populations of a species.

Acknowledgments

The authors thank all collaborators who contributed with samples for this study. Edd Brooks, Annabelle Brooks, Sean Williams, Debra Abercrombie, Lance Jordan, The Moore Foundation, Save our Seas Foundation. Thanks are also due to the technicians from IPMA for collecting and carefully handling samples during the fishery observer program. R. Coelho is supported by an Investigador-FCT contract from the Portuguese Foundation for Science and Technology (*FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia*) supported by the EU European Social Fund and the *Programa Operacional Potencial Humano* (Ref: IF/00253/2014). This work was funded by FAPESP (Ref: BIOTA 2011/23787-0).

5. Bibliografía completa

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. *Basic local alignment search tool*. Journal of molecular biology 215: 403-410.
- Ashe JL, Feldheim KA, Fields AT, Reyier EA, Brooks EJ, O'Connell MT, Skomal G, Gruber SH, Chapman DD. 2015. *Local population structure and context-dependent isolation by distance in a large coastal shark*. Marine Ecology Progress Series 520: 203-216.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. *Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics*. Annual review of ecology and systematics 18: 489-522.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press 447 p.
- Backus RH, Springer S, Arnold EL. 1956. *A contribution to the natural history of the white-tip shark, Pterolamiops longimanus (Poey)*. Deep Sea Research (1953) 3: 178-188.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. Molecular biology and evolution 16: 37-48.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA. 2003. *Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic*. Science 299: 389-392.
- Baum JK, Myers RA. 2004. *Shifting baselines and the decline of pelagic sharks in the Gulf of Mexico*. Ecology Letters 7: 135-145.
- Baum JK, Medina E, Musick JA & Smale M. 2006. *Carcharhinus longimanus*. In: IUCN Red List of Threatened Species 2010. Version 2010.1.
- Bermingham E, Martin AP. 1998. *Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America*. Molecular Ecology 7: 499-517.
- Blower DC, Pandolfi JM, Bruce BD, Gomez-Cabrera MD, Ovenden JR. 2012. *Population genetics of Australian white sharks reveals fine-scale spatial structure, transoceanic dispersal events and low effective population sizes*. Marine Ecology Progress Series 455: 229-244.
- Bonfil R. 1994. *Overview of world elasmobranch fisheries*. FAO Technical Paper 341:119.

- Bonfil R, Clarke S, Nakano H. 2008. *The biology and ecology of the oceanic whitetip shark, Carcharhinus longimanus*. Sharks of the open ocean: Biology, fisheries and conservation 128-139
- Bradman H, Grewe P, Appleton B. 2011. *Direct comparison of mitochondrial markers for the analysis of swordfish population structure*. Fisheries Research 109: 95-99.
- Brown WM, George M, Wilson AC. 1979. *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences 76: 1967-1971.
- Buonaccorsi V, McDowell J, Graves J. 2001. *Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (Makaira nigricans)*. Molecular Ecology 10: 1179-1196.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Bräutigam A, S. F. 1998. *Sharks and their relatives*. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission 20:39.
- Camhi M, Pikitch E, Babcock E. 2008. *Sharks of the open ocean: biology, fisheries and conservation*. John Wiley & Sons 128-137
- Carvalho GR, Hauser L. 1994. *Molecular genetics and the stock concept in fisheries*. Reviews in Fish Biology Fisheries 4: 326-350.
- Castro JI, Woodley CM, Brudek RL. 1999. *A preliminary evaluation of the status of shark species*. Food & Agriculture Org Paper 380:1-72
- Castro A, Stewart B, Wilson S, Hueter R, Meekan M, Motta P, Bowen B, Karl S. 2007. *Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (Rhincodon typus)*. Molecular Ecology 16: 5183-5192.
- Chapman DD, Pinhal D, Shivji MS. 2009. *Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks Sphyrna lewini*. Endangered Species Research 9: 221-228.
- Clarke CR, Karl SA, Horn RL, Bernard AM, Lea JS, Hazin FH, Prodöhl PA, Shivji MS. 2015. *Global mitochondrial DNA phylogeography and population structure of the silky shark, Carcharhinus falciformis*. Marine Biology 162 (5): 945-955.
- Coelho R, Hazin FH, Rego M, Tambourgi M, Oliveira P, Travassos P, Carvalho F, Burgess G. 2009. *Notes on the reproduction of the oceanic whitetip shark, Carcharhinus longimanus, in the southwestern Equatorial Atlantic ocean*. Collective Volume of Scientific Papers ICCAT 64: 1734-1740.

- Compagno LJV. 1984. Species Catalogue. *Sharks of the World. A, Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes*. FAO Fish. Synopsis 4(125): 251-655.
- Compagno LJV. 2001. *Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date*. FAO Species Catalogue for Fisheries Purposes (1):1-269.
- Danovaro R, Gambi C, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Fraschetti S, Vanreusel A, Vincx M, Gooday AJ. 2008. *Exponential decline of deep-sea ecosystem functioning linked to benthic biodiversity loss*. Current Biology 18: 1-8.
- Dudgeon C, Blower D, Broderick D, Giles J, Holmes B, Kashiwagi T, Krück N, Morgan J, Tillett B, Ovenden J. 2012. *A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays*. Journal of Fish Biology 80: 1789-1843.
- Dulvy NK, et al. 2014. *Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays*. Elife 3: e00590.
- Erlandson JM, Rick TC. 2010. *Archaeology meets marine ecology: the antiquity of maritime cultures and human impacts on marine fisheries and ecosystems*. Annual Review of Marine Science 2: 231-251.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary bioinformatics online 1: 47-50 .
- Excoffier L, Lischer HE. 2010. *Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. Molecular ecology resources 10: 564-567.
- FAO. 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ferrette BL, Mendonça FF, Coelho R, de Oliveira PGV, Hazin FHV, Romanov EV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F. 2015. *High Connectivity of the Crocodile Shark between the*

- Atlantic and Southwest Indian Oceans: Highlights for Conservation*. PLoS One 10: e0117549.
- Ferris SD, Berg WJ. 1987. *The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery. Population Genetics, Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, WA: 277-299.
- Fourmanoir P. 1961. *Requins de la côte ouest de Madagascar*. Memoires de Institut Scientifique de Madagascar. Série F: Océanographie 4: 3-81.
- Fu Y-X. 1997. *Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection*. Genetics 147: 915-925.
- Gallagher AJ, Orbesen ES, Hammerschlag N, Serafy JE. 2014. *Vulnerability of oceanic sharks as pelagic longline bycatch*. Global Ecology and Conservation 1: 50-59.
- Gissi C, Reyes A, Pesole G, Saccone C. 2000. *Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA*. Molecular Biology and Evolution 17: 1022-1031.
- Gouletquer P, Gros P, Boeuf G, Weber J. 2014. *The Importance of Marine Biodiversity. Biodiversity in the Marine Environment*. Springer 1-13.
- Graves JE, McDowell JR. 2006. *Genetic analysis of white marlin (Tetrapturus albidus) stock structure*. Bulletin of Marine Science 79: 469-482.
- Harpending H. 1994. *Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution*. Human biology 66 (4): 591-600.
- Hartl D, Clark AG. 2010. *Princípios de genética de populações*. Artmed. Porto Alegre-RS, Brasil.
- Heist EJ. 2005. *Genetics: stock identification*. Management techniques for elasmobranch fisheries. Singapore APEC Fisheries Working Group: (474) 62.
- Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. 2006. *Low worldwide genetic diversity in the basking shark (Cetorhinus maximus)*. Biology Letters 2: 639-642.
- Hoening J, Gruber S, Pratt H, Taniuchi T. 1990. *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries*. NOAA Technical Report NMFS 90: 1-16.
- Howey-Jordan LA, Brooks EJ, Abercrombie DL, Jordan LK, Brooks A, Williams S, Gospodarczyk E, Chapman DD. 2013. *Complex movements, philopatry and expanded*

- depth range of a severely threatened pelagic shark, the oceanic whitetip (Carcharhinus longimanus) in the western North Atlantic.* PLoS One 8: e56588.
- ICMBio. 2013. *Instrução Normativa interministerial MPA/MMA nº 01, de 12 de março de 2013.* Diário Oficial da União: 51.
- IUCN. 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species.* <http://www.iucnredlist.org>. Version 2014.3.
- Karl SA, Castro AL, Garla RC. 2012. *Population genetics of the nurse shark (Ginglymostoma cirratum) in the western Atlantic.* Marine biology 159: 489-498.
- Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH. 2011. *Phylogeography and conservation of the bull shark (Carcharhinus leucas) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA.* Conservation Genetics 12: 371-382.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C. 2012. *Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.* Bioinformatics 28: 1647-1649.
- Lack M, Sant G. 2006. *World shark catch, production and trade 1990-2003.* Department of the Environment and Heritage.
- Lessa R, Santana FM, Paglerani R. 1999. *Age, growth and stock structure of the oceanic whitetip shark, Carcharhinus longimanus, from the southwestern equatorial Atlantic.* Fisheries Research 42: 21-30.
- Li W, Dai X, Xu Q, Wu F, Gao C, Zhang Y. 2014. *The complete mitochondrial genome sequence of Oceanic whitetip shark, Carcharhinus longimanus (Carcharhiniformes: Carcharhinidae).* Mitochondrial DNA: 1-2.
- Lindenmayer D, Lacy R. 1995. *A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum Trichosurus caninus Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia) in south-eastern Australia. I. Demographic stability and population persistence.* Biological Conservation 73: 119-129.
- Martínez P, González EG, Castilho R, Zardoya R. 2006. *Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (Thunnus obesus).* Molecular phylogenetics and evolution 39: 404-416.

- Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press: 797p.
- McCauley DJ, Pinsky ML, Palumbi SR, Estes JA, Joyce FH, Warner RR. 2015. *Marine defaunation: Animal loss in the global ocean*. *Science* 347 (6219): 1255641.
- Mendes N, Cruz V, Mendonça FF, Pardo B, Coelho R, Ashikaga F, Camargo S, Martínez P, Oliveira C, Santos M. 2015. *Microsatellite loci in the oceanic whitetip shark and cross-species amplification using pyrosequencing technology*. *Conservation Genetics Resources* 7: 585-589.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. 2009. *Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences*. *Neotropical Ichthyology* 7: 213-216.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OB, Foresti F. 2011. *Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus**. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21: 799-814.
- Mendonca FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. 2013. *Diversity and genetic population structure of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii**. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 23: 850-857.
- Mesnick SL, Taylor BL, Archer FI, Martien KK, Trevino SE, HANCOCK-HANSER BL, Moreno Medina SC, Pease VL, Robertson KM, Straley JM. 2011. *Sperm whale population structure in the eastern and central North Pacific inferred by the use of single-nucleotide polymorphisms, microsatellites and mitochondrial DNA*. *Molecular Ecology Resources* 11: 278-298.
- O'Leary SJ, Feldheim KA, Fields AT, Natanson LJ, Wintner S, Hussey N, Shivji MS, Chapman DD. 2015. *Genetic Diversity of White Sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northwest Atlantic and Southern Africa*. *Journal of Heredity*, esv001.
- Ortí G, Petry P, Porto JI, Jégu M, Meyer A. 1996. *Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas*. *Journal of Molecular Evolution* 42: 169-182.

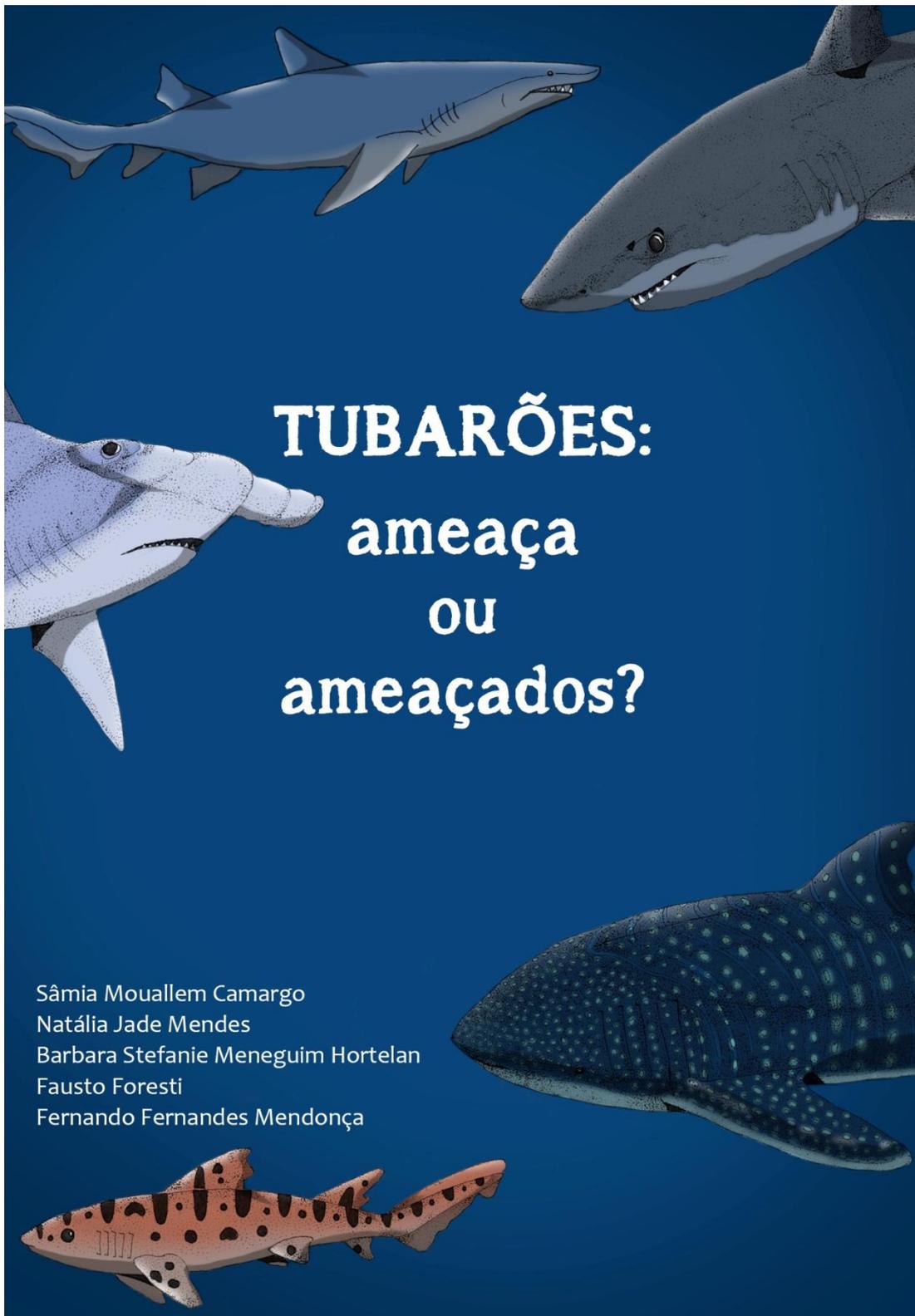
- Ovenden JR, Kashiwagi T, Broderick D, Giles J, Salini J. 2009. *The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago*. BMC Evolutionary Biology 9: 1-15.
- Patarnello T, Marcato S, Zane L, Varotto V, Bargelloni L. 2003. *Phylogeography of the Chionodraco genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean*. Molecular phylogenetics and evolution 28: 420-429.
- Perdices A, Cunha C, Coelho M. 2004. *Phylogenetic structure of Zacco platypus (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences*. Molecular phylogenetics and evolution 31: 192-203.
- Phillips NM, Chaplin JA, Morgan DL, Peverell SC. 2011. *Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered Pristis sawfishes in Australian waters*. Marine Biology 158: 903-915.
- Portnoy DS, McDowell JR, Heist EJ, Musick JA, Graves JE. 2010. *World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, Carcharhinus plumbeus*. Molecular Ecology 19: 1994-2010.
- Portnoy D, Hollenbeck C, Belcher C, Driggers W, Frazier B, Gelsleichter J, Grubbs R, Gold J. 2014. *Contemporary population structure and post-glacial genetic demography in a migratory marine species, the blacknose shark, Carcharhinus acronotus*. Molecular ecology 23: 5480-5495.
- Proietti MC, Reisser JW, Kinan PG, Kerr R, Monteiro DdS, Marins LFF. 2012. *Green turtle (Chelonia mydas) mixed stocks in the southwestern Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories*. Marine Ecology Progress Series 447: 195-209
- Rice WR. 1989. *Analyzing tables of statistical tests*. Evolution: 223-225.
- Rocha LA, Robertson DR, Rocha CR, Van Tassell JL, Craig MT, Bowen BW. 2005. *Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish*. Molecular Ecology 14: 3921-3928.
- Rocha L, Craig M, Bowen B. 2007. *Phylogeography and the conservation of coral reef fishes*. Coral Reefs 26: 501-512.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. *Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences*. Molecular Biology and Evolution 9: 552-569.

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. *DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods*. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schmidt JV, Schmidt CL, Ozer F, Ernst RE, Feldheim KA, Ashley MV, Levine M. 2009. *Low genetic differentiation across three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus**. *PLoS One* 4: e4988.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW. 2008. *Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*)*. *Molecular Ecology* 17: 5336-5348.
- Seki T, Taniuchi T, Nakano H, Shimizu M. 1998. *Age, Growth and Reproduction of the Oceanic Whitetip Shark from the Pacific Ocean*. *Fisheries Science* 64: 14-20.
- Selig ER, Turner WR, Troëng S, Wallace BP, Halpern BS, Kaschner K, Lascelles BG, Carpenter KE, Mittermeier RA. 2014. *Global Priorities for Marine Biodiversity Conservation*. *PLoS One* 9: e82898.
- Smith CL. 1997. *National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda*. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720.
- Stevens JD. 1984. *Biological observations on sharks caught by sport fisherman of New South Wales*. *Marine and Freshwater Research* 35: 573-590.
- Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA. 2000. *The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems*. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 57: 476-494.
- Tajima F. 1989. *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Nei M. 1993. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Molecular biology and evolution* 10: 512-526.
- Teixeira AF. 2011. *Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu: 37p.

- Toledo Filho S, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Galhardo E, Donola E. 1992. *Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios*. São Paulo USP: 39p.
- Worm B, et al. 2006. *Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services*. Science 314: 787-790.
- Worm B, et al. 2009. *Rebuilding global fisheries*. Science 325: 578-585.
- Wright S. 1949. *The genetical structure of populations*. Annals of eugenics 15: 323-354.
- Wright S. 1965. *The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating*. Evolution: 395-420.
- Wright, S. 1978. *Variability Within and Among Natural Populations*. Evolution and the Genetics of Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

6. Material complementar

O presente trabalho teve como objetivo adicional o desenvolvimento de material didático sobre os tubarões, sua conservação e seu papel ecológico, direcionado aos estudantes do ensino básico. Seu resultado é apresentado no Apêndice I e originou a cartilha com o ISBN: 9798-85-919272-0-3, intitulada “Tubarões: ameaça ou ameaçados?”. Ainda, com o intuito de aprimorar os dados relacionados à genética populacional do tubarão galha-branca a autora colaborou com o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites para esta espécie (Apêndice II), publicado com o título “Microsatellite loci in the oceanic whitetip shark and cross-species amplification using pyrosequencing technology” (DOI 10.1007/s12686-015-0435-5). Tais marcadores poderão ser aplicados em abordagens do DNA nuclear para avaliações da variabilidade genética, estruturas populacionais, fluxo gênico, além de questões parentais, tais como identificações de paternidade múltipla e partenogênese.



Sâmia Mouallem Camargo
Natália Jade Mendes
Barbara Stefanie Meneguim Hortelan
Fausto Foresti
Fernando Fernandes Mendonça

Tubarões: ameaça ou ameaçados

1ª Edição

Sâmia Mouallem Camargo et al.
ISBN 978-85-919272-0-3

São Paulo
2015

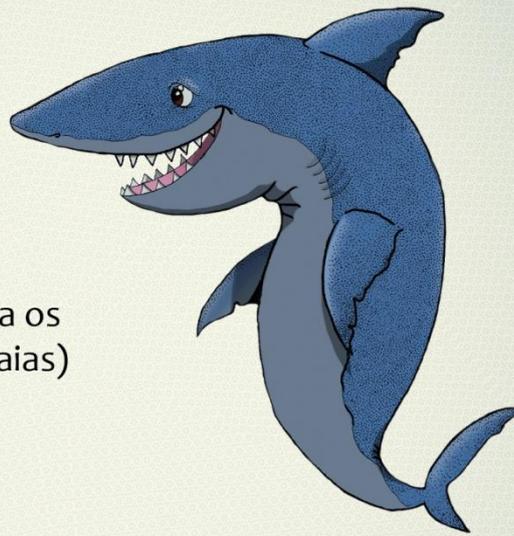
ÍNDICE

Quem são os tubarões?	4
Você sabia que...	5
Tubarões em perigo: principais causas	6
Porque preservar os tubarões?	10
E os incidentes com os tubarões?	11
Você sabe o que está comendo?	12
Identificação genética	13
Quem protege os tubarões no Brasil?	14
Venha também fazer parte desse grupo! Como?	15

QUEM SÃO OS TUBARÕES?

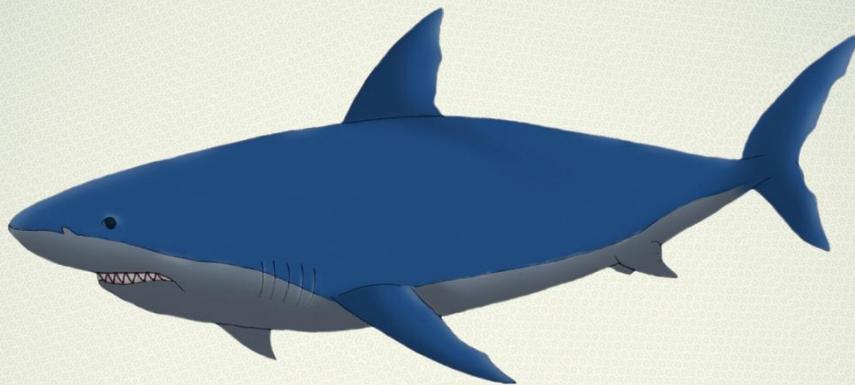
Os tubarões são peixes cartilaginosos que existem há cerca de 400 milhões de anos, isto quer dizer, a mais tempo que os dinossauros.

Na biologia existe uma classificação que denomina os tubarões e as raias (ou arraias) como elasmobrânquios.

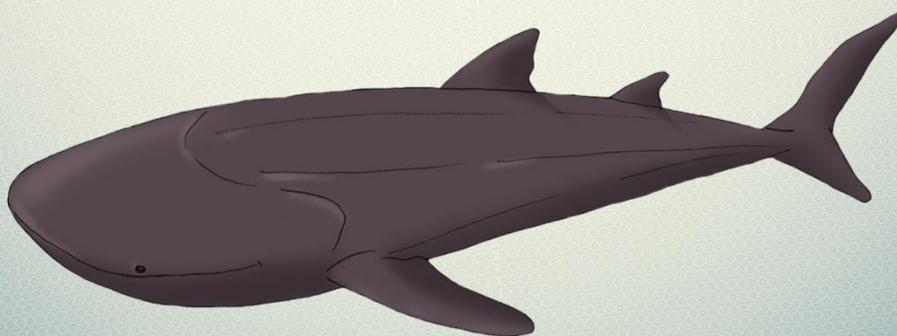


Você sabia que...

Os tubarões ainda tem uma reputação assustadora, porém estatisticamente você tem mais chance de ser atingido por um raio do que ser atacado por um tubarão (ISAF)*.



Outro fato importante, é que a cada dia o ser humano está diminuindo as populações de tubarões. Em alguns casos, esse declínio populacional já chegou a até a 90%.



* International Shark Attack File

TUBARÕES EM PERIGO: Principais causas

A redução das populações de tubarões ocorre principalmente devido ao:

“Comércio de Nadadeiras”

Atualmente milhares de tubarões são pescados todos os dias em todo o mundo, principalmente para a utilização de suas nadadeiras. As nadadeiras são muito valiosas pois são usadas para fazer um prato típico do Extremo Oriente, principalmente na China.



TUBARÕES EM PERIGO:

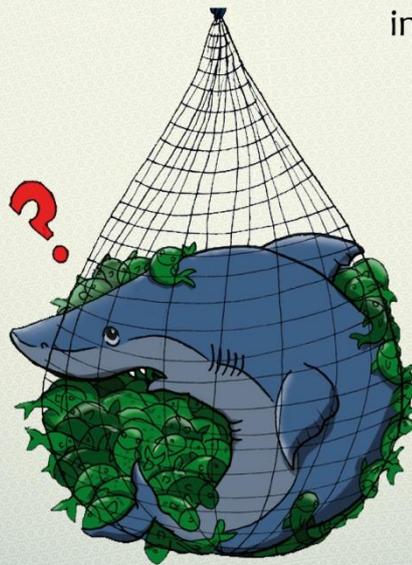
Principais causas

Pesca excessiva

Cada vez mais os barcos são maiores, mais rápidos e permanecem mais tempo pescando, aumentando excessivamente a captura de tubarões em todos os oceanos provocando graves desequilíbrios ecológicos.

Pesca acidental

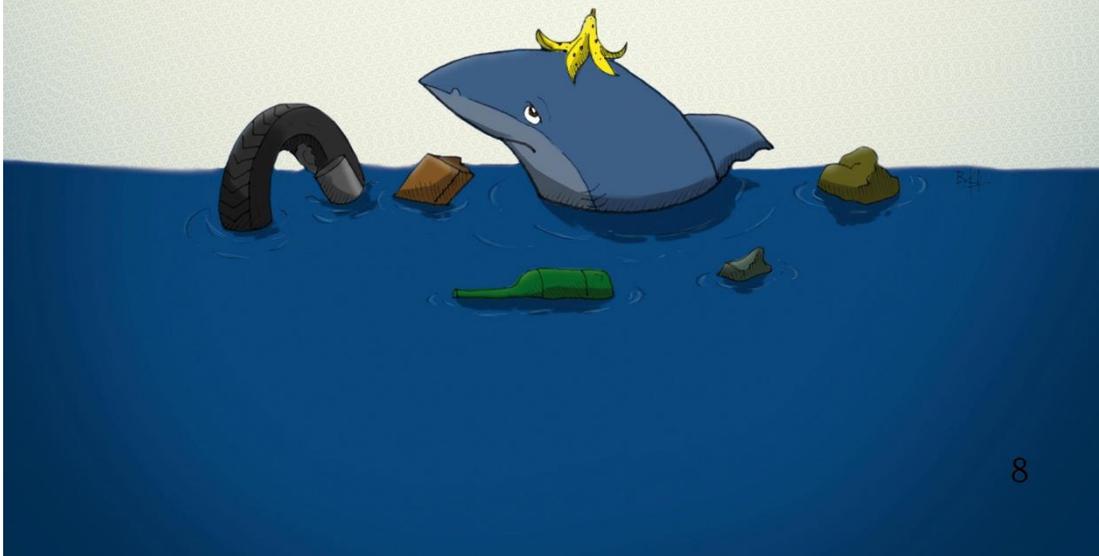
Além de serem afetados pela pesca direcionada, os tubarões também são alvos da pesca acidental pois vivem na mesma área do mar onde são pescados outros animais, sendo difícil capturar apenas as espécies de maior interesse comercial.



TUBARÕES EM PERIGO: Principais causas

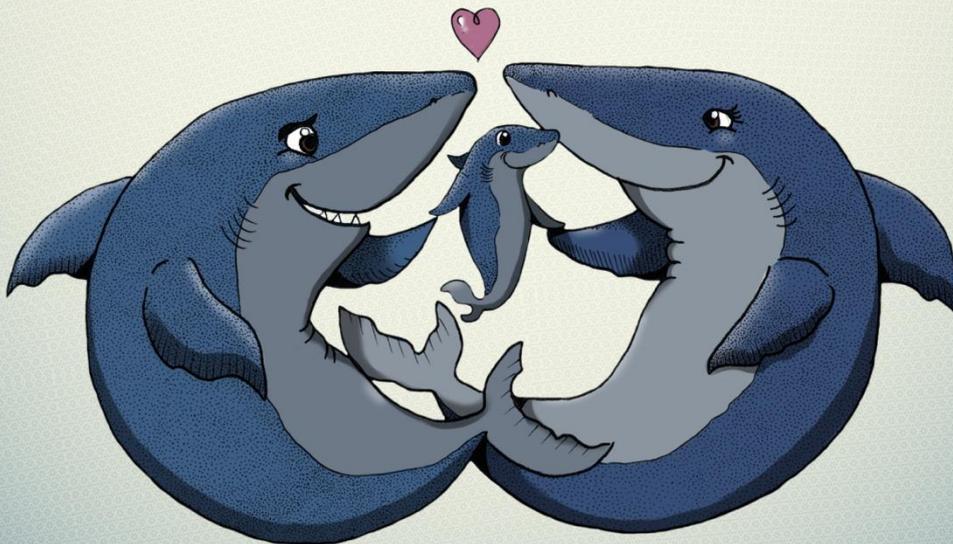
Destruição de habitat

A poluição é uma das maiores ameaças para os oceanos em todo o mundo, pois causam danos a todo o ecossistema marinho. Quando o habitat dos tubarões é danificado ou destruído, os animais tem dificuldade para sobreviver, uma vez que há menos recursos disponíveis (tais como alimento e oxigênio).



TUBARÕES EM PERIGO: Principais causas

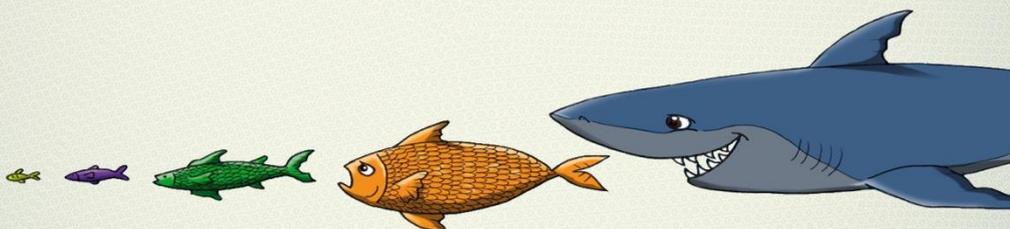
Além das causas citadas anteriormente para a diminuição das populações de tubarões (pesca, poluição e desequilíbrios ecológicos) a maioria de suas espécies possuem uma série de características biológicas que dificultam a recuperação populacional por gerarem poucos filhotes. Essas características são: maior tempo para atingir a fase adulta, longos períodos de gestação e a produção de um pequeno número de filhotes. Algumas destas espécies produzem apenas dois filhotes por ano.



PORQUE PRESERVAR OS TUBARÕES?

Apesar dos tubarões serem vistos como vilões, eles exercem um papel fundamental no ambiente marinho ocupando o topo da cadeia alimentar.

Os tubarões são os principais reguladores do tamanho das populações de outras espécies, possibilitando o equilíbrio ecológico nos oceanos.

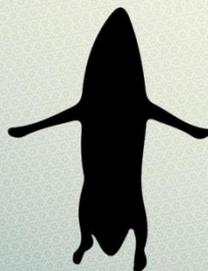


Além disso, alguns tubarões são considerados “lixeiros do mar” por se alimentarem de animais mortos, o que contribui com a saúde de todas as outras espécies marinhas.

E os incidentes com os tubarões?

A cada ano, cerca de 100 milhões de tubarões são mortos pelo homem, enquanto que menos de 70 pessoas têm algum tipo de incidente provocado por tubarões em todo o planeta.

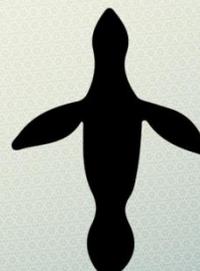
Na maioria das vezes, esses incidentes ocorrem porque os tubarões confundem os humanos, principalmente surfistas e mergulhadores, com algum de seus itens alimentares. A alimentação de muitos tubarões é composta principalmente por focas, tartarugas, peixes e diversos outros animais pequenos, como lulas, camarões e lagostas.



SURFISTA



TARTARUGA
MARINHA



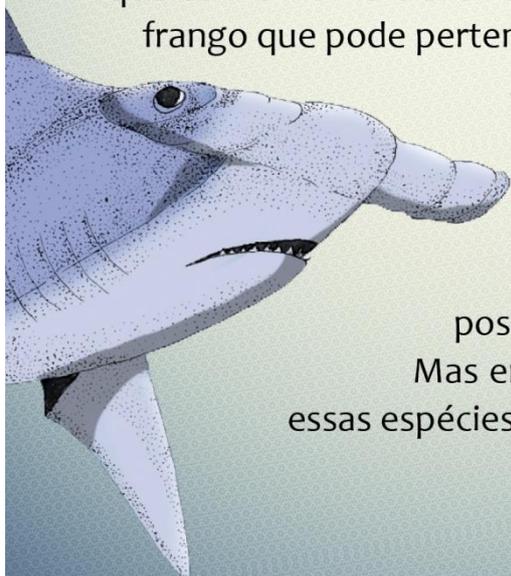
LEÃO
MARINHO

Você sabe o que está comendo?

Quando vamos a um supermercado ou peixaria frequentemente vemos anúncios vendendo cação. Você sabia que cação é o nome popular que a maioria dos tubarões recebem na sua comercialização?



Um ponto importante em nossa alimentação é que o cação que compramos pode pertencer a uma espécie que já está desaparecendo do planeta. Assim, podemos estar contribuindo com o seu fim, sem que saibamos. Isso ocorre, porque quase ninguém se importa em colocar o verdadeiro nome das espécies, como o tubarão-azul que tem o nome científico de *Prionace glauca*, o cação-frango que pode pertencer às espécies *Rhizoprionodon*



lalandii ou *Rhizoprionodon porosus*, além de muitos outros tubarões que nem poderiam ser mais pescados, como o tubarão-martelo que possui diferentes nomes científicos.

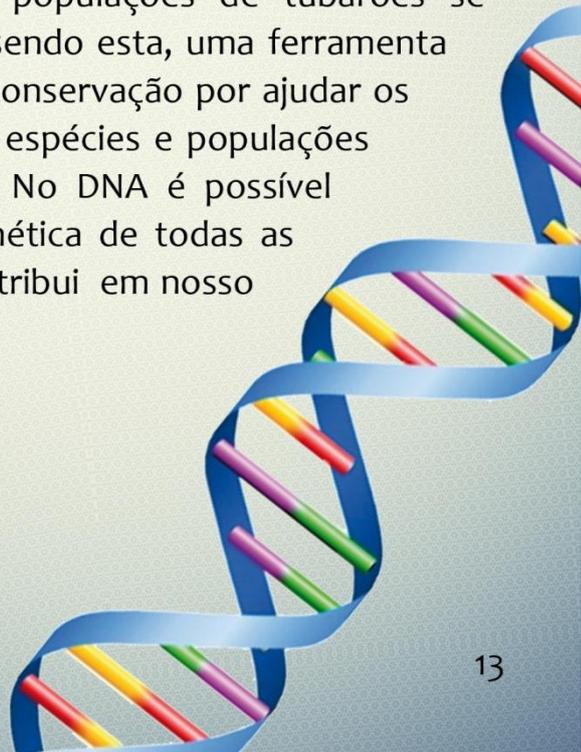
Mas então como podemos identificar essas espécies?

Identificação genética

Você sabia que a identificação das espécies de tubarões pode ser realizada através de uma análise genética?

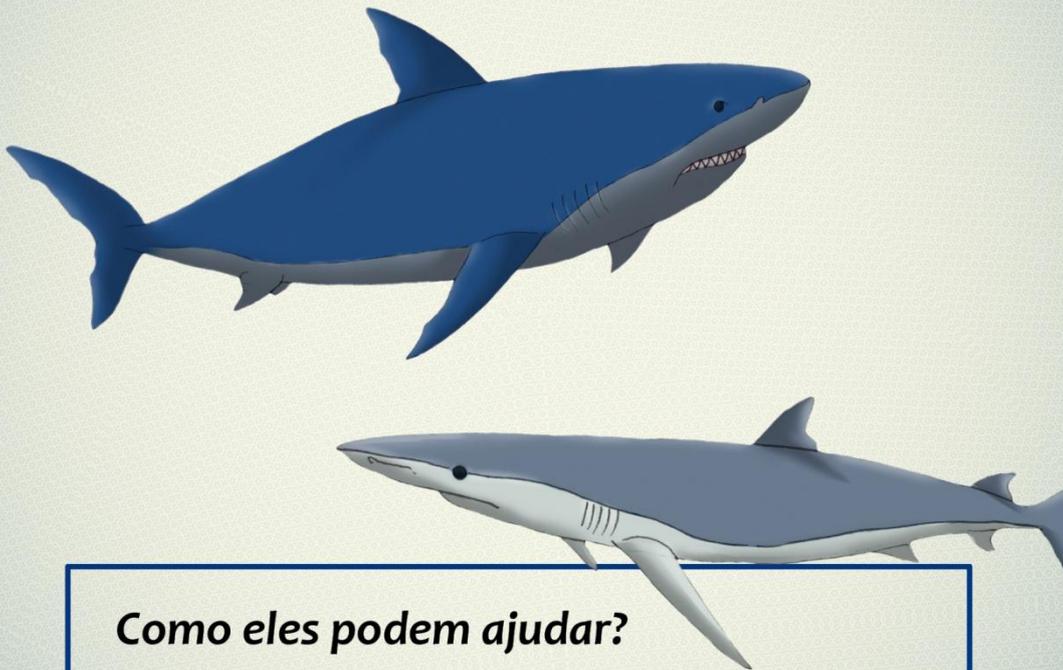
No DNA, existem regiões que possuem diferenças entre uma espécie e a outra, permitindo a distinção entre elas e possibilitando a fiscalização e controle da pesca de tubarões e raias protegidas por leis, mesmo que estes já estejam cortados, limpos e preparados para o consumo.

A genética também é utilizada pelos pesquisadores para entender como as populações de tubarões se relacionam nos oceanos, sendo esta, uma ferramenta muito importante para a conservação por ajudar os cientistas a identificarem espécies e populações ameaçadas de extinção. No DNA é possível avaliar a variabilidade genética de todas as espécies e como ela se distribui em nosso planeta.



Quem protege os tubarões no Brasil?

Muitas instituições, Universidades, ONGs, estudantes e pesquisadores ajudam a proteger os tubarões no Brasil.



Como eles podem ajudar?

Fiscalizando, monitorando e estabelecendo critérios para a gestão de recursos pesqueiros. Além de promover discussões e planos de manejo das espécies.

Venha também fazer parte desse grupo! Como?

- Exigindo que os comerciantes informem ao consumidor, os nomes das espécies e onde elas foram pescadas;
- Não comprando os cações ou tubarões que não possuam estas informações;
- Conhecendo quais são as espécies em maior perigo de extinção;
- Cobrando dos governos maior empenho em preservar os tubarões e toda a vida marinha

Realização

Sâmia Mouallem Camargo
Natália Jade Mendes
Fausto Foresti
Fernando Fernandes Mendonça

Ilustrações

Barbara Stefanie Meneguim Hortelan

Diagramação

Patrick Karassawa

APOIO

BIOTA - FAPESP: Biodiversidade molecular e
conservação de tubarões. Processo 2011/237870-0
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo



6.2. *Apêndice II*. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para estudos a partir do DNA nuclear da espécie *Carcharhinus longimanus* publicado durante o período do mestrado. Sua aplicação em um novo estudo populacional ainda será efetuada.

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-015-0435-5

MICROSATELLITE LETTERS

Microsatellite *loci* in the oceanic whitetip shark and cross-species amplification using pyrosequencing technology

N. J. Mendes · V. P. Cruz · Fernando Fernandes Mendonça · B. G. Pardo ·
R. Coelho · F. Y. Ashikaga · S. M. Camargo · P. Martínez · C. Oliveira ·
M. N. Santos · F. Foresti

Received: 12 January 2015 / Accepted: 11 February 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Among the pelagic shark species most impacted by fisheries, the oceanic whitetip shark (*Carcharhinus longimanus*) has shown signs of population declines. In this study, we developed 12 microsatellite markers using next generation sequencing (454 pyrosequencing) in *C. longimanus* for further use in population screening. The genetic diversity of these *loci* was assessed in 28 individuals and a total of 35 alleles were identified, ranging from four to eight alleles per *locus* (5.9 alleles on average). Cross-species amplification of these markers was successful in five *loci* for *C. acronotus*, *C. perezi* and *Galeocerdo cuvier*. The developed microsatellite markers will be useful in analyzing the population genetics structure of the oceanic whitetip shark and other Carcharhinidae species.

N. J. Mendes · V. P. Cruz · F. F. Mendonça ·
F. Y. Ashikaga · S. M. Camargo · C. Oliveira · F. Foresti
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP 18618-970,
Brazil

F. F. Mendonça (✉) · S. M. Camargo
Laboratório Genética Pesqueira e Conservação, Instituto do Mar,
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Av. Almirante
Saldanha da Gama, 89. Ponta da Praia, Santos,
SP CEP 11030-400, Brazil
e-mail: fernando.mendonca@unifesp.br

B. G. Pardo · P. Martínez
Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad
de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

R. Coelho · M. N. Santos
Instituto Português do Mar e da Atmosfera, IPMA, I.P., Olhão,
Portugal

R. Coelho
Centro de Ciências do Mar, CCMAR, Universidade Algarve,
Faro, Portugal

Keywords Conservation · Population genetics · Next generation sequencing · *Carcharhinus*

The oceanic whitetip shark *Carcharhinus longimanus* is a pelagic species distributed worldwide, usually found in open waters and around oceanic islands. *C. longimanus* is currently assessed by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) Red List as globally “Vulnerable” (Baum et al. 2006), with the main causes for concern being due to commercial fisheries and in particular to the high value of whitetip shark fins in international markets. Due to the evidence of declining populations in recent years, the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT) and the Indian Ocean Tuna Commission (IOTC) have established no retention measures, with mandatory discards of all captured specimens, either dead or alive. In September 2014 the oceanic whitetip shark was included in Appendix of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES).

In this study, we report the use of new generation sequencing (Roche 454 technology) in the development of the first molecular microsatellite markers (or simple sequence repeats—SSRs) for *C. longimanus* and their cross-amplification in other shark species of family Carcharhinidae.

A total of 28 samples of *C. longimanus* was collected in the northeast tropical Atlantic by onboard observers from the Portuguese Institute for the Ocean and Atmosphere (IPMA) within the scope of the European Data Collection framework and the SELECT-PAL project. The samples were collected from specimens accidentally caught. Cross-species transferability was conducted using samples taken from *C. acronotus*, *C. perezi* and *G. cuvier* specimens, which were collected from off the north Brazilian coast.

Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit protocol (Qiagen). A 100 ng sample of the highest quality DNA from two individuals was pooled for sequencing on a Roche 454 GS FLX sequencer. The details of the pyrosequencing procedure have been described by Margulies et al. (2005). All sequences of the SSR were compiled using BatchPrimer3 (You et al. 2008) and checked for redundancy by clustering using Clustal X (Thompson et al. 1997). Primers were designed for amplification and the fluorochrome colors were defined for multiplexing according to the microsatellite size ranges so that *loci* of different lengths could be labeled with the same dye. The following cycling conditions were used: an initial denaturing for 10' at 95 °C; 34 cycles of 94 °C for 45"; the primer annealing temperature for 50"; and 72 °C for 50"; and a 10' final extension at 72 °C. The total reaction volume was 12.5 µl and consisted of 1X PCR Gold Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 1.0 pmol each of the primer, and 30 ng of DNA. Allele sizes were determined by using the LIZ 500 and the peak scoring software GeneMapper 3.7 (both Applied Biosystems). The number of alleles per *locus*, expected and observed heterozygosities, and conformance to Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) were estimated and tested using Arlequin 3.0 (Excoffier and Lischer 2010). Cross-species amplification was conducted using samples from seven specimens of each tested species (*C. acronotus*, *C. perezii* and *G. cuvieri*) with the same protocols.

Among the 69,601 sequences reads obtained, 2,769 perfect SSR-containing sequences were detected (Table 1). Twelve microsatellite *loci*, including nine dinucleotide and three trinucleotide that showed consistent amplification with polymorphisms were confirmed after evaluation in an ABI3730 sequencer using labeled primers. The number of alleles ranged from 4 to 8, averaging 5.9 alleles per *locus* and the expected heterozygosity ranged between 0.472 and 0.818 (Table 2). Cross-amplification of *C. longimanus* microsatellites was successful in the three related Carharinidae species (Table 2).

In this study, we report the first successful use of new generation sequencing (Roche 454-pyrosequencing) technology and enlarged genomic resources for *C. longimanus* to develop microsatellite polymorphic markers that will be used in future population screens to obtain relevant information for the conservation and management. An increasing number of shark species are being added to the lists of endangered species and new genetic technologies are enabling the development of markers with greater sequence data production at reduced costs.

Acknowledgments The authors thank the entire staff of the Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain for their help on development of the microsatellite markers and to Manuel Vera, Universidad de Girona, Spain, for his help with the analyses of the microsatellite markers. Thanks are also due to the observers from IPMA I.P. for their collection and careful handling of the samples. R. Coelho was supported by a grant from FCT, the Portuguese Foundation for Science and Technology (Ref: SFRH/BPD/93936/2013). N.J. Mendes was supported by a grant from the Foundation for Research Support of the São Paulo State—FAPESP (Ref: 2013/14555-4). This work was funded by FAPESP (Ref: BIOTA 2011/23787-0 and 2010/51903-2).

Appendix

OCS_1

OCS_F_1_CCATAGTGTCCAGGGGGTGT
OCS_R_1_ATCGGAGAGGGTTTGCATC
>CATGCTAAATTGTCCCATAGTGTCCAGGGGGTGT
TTACTTGTGAATATGAATGGGGTTACTGGCGATAG
CGCCTGGGTGGGTTTGTGGTCCAGTACAGACCTGAT
GGGCTGAATGGCACCTCCTGCACTGTAGGAGTTAT
CTGATTCTGTCCAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGT
GGATGCAAACCTCTCCGATCCCTGTACACACACA
CACAGATACACACAGACACACGCACACACACACA
CACACACACACACAGACACACACACAGACACA
CG

OCS_5

OCS_F_5_CAAGCAAAGTGCAGGTTCAA
OCS_R_5_TGTCAGTCCCCACACCAATA

Table 1 Microsatellite information from 454 pyrosequencing

Analysis	No. of sequences
Number of reads	69,601
Total bases (bp)	21,311,563
SSR sequences identified	2,769
Selection of microsatellites (using BatchPrimer3)	432
Secondary selection of microsatellite (using primer 3.0)	135
Amplification and control of PCR product on agarose gel	31
Microsatellite loci to synthesize with fluorescent dye	12
Polymorphism test with capillary sequencer	12

Table 2 Genetic diversity of the ten microsatellite developed in *Carcharhinus longimanus* and their cross-amplification in *C. acronotus*, *C. perezi* and *G. cuvier*

Locus	Primer sequence (5' → 3')	Motif	Multiplex dye	N	Na	Range	Ho	He	HWE	PIC	F (Null)	Number of samples in success of cross-species amplification					
												<i>C. acronotus</i>		<i>G. cuvier</i>		<i>C. perezi</i>	
												N	Range	N	Range	N	Range
OCS_01	F_CCATAGTGTGTCAGGGGTGTT R_ATCGGAGAGGGTTTGCATC	(AG)9	NED	28	5	154–180	0.178	0.704	0.000	0.640	0.596	–	–	–	–	–	–
OCS_05	F_CAAGCAAAGTGCAGGTTCAA R_TGTCAGTCCCACACCAATA	(AC)9	VIC	28	8	78–128	0.607	0.780	0.000	0.738	0.103	3/ 7	72–100	–	–	3/ 7	96
OCS_06	F_TGTTGCTGGATTTCGGTGTTA R_TCGTCCCAAGAGGAAACTA	(TC)9	NED	28	6	302–342	0.357	0.663	0.000	0.606	0.321	–	–	–	–	–	–
OCS_08	F_TTGGATTCAGCAAATGGTAGG R_TCCCTCCTCGTGTCTCTCAC	(GA)17	FAM	28	7	90–110	0.714	0.679	0.000	0.607	–0.043	–	–	–	–	–	–
OCS_09	F_TTGGATGCTGCCTTTCTCTT R_TCTCTCTCTCCCCCTGCT	(CA)11	VIC	26	6	72–102	0.423	0.818	0.000	0.773	0.314	6/ 6	76–82	–	–	6/ 7	76–84
OCS_10	F_GACTGCACCTTGTGGGATCT R_TGCTGTGAGACCTTTCCTCA	(CA)11	PET	28	4	162–184	0.785	0.589	0.000	0.501	–0.188	–	–	–	–	–	–
OCS_13	F_GCACTCACACATAGCAAACCA R_AGCATCACTTCACTGTCTGGAG	(AC)12	FAM	27	6	78–92	0.518	0.774	0.000	0.725	0.169	–	–	–	–	–	–
OCS_17	F_CAAGATTATGGTGCCCTGCT R_TGTGACTGGAACAGGACTGG	(TG)11	NED	26	4	150–164	0.538	0.750	0.000	0.687	0.161	4/ 7	148–150	6/ 7	140–158	4/ 7	138–152
OCS_19	F_GCAGGAGAGACTGAGGGAAA R_TGCATGGACAAATACACACATG	(TG)14	PET	27	7	175–281	0.444	0.758	0.000	0.704	0.226	7/ 7	272	4/ 7	272–278	7/ 7	272–296
OCS_26	F_GGACCCAAAACAGAGCATCAC R_CAAAAGGCATGACAAATCCA	(ATT)8	FAM	28	6	148–184	0.535	0.615	0.011	0.531	0.056	–	–	–	–	–	–
OCS_28	F_GGAACAATCAAAGGGGACT R_ATGCTGAGGTTATGGCAAGG	(GCA)9	PET	28	8	138–153	0.785	0.800	0.000	0.755	–0.029	–	–	–	–	–	–
OCS_30	F_CGAGAGGGACACAGGGTTTA R_ACCCCCAATCCCATTAGATC	(GGT)5	VIC	26	4	173–188	0.615	0.472	0.376	0.409	–0.166	6	179–185	7	185	6	176–185

N number of individuals analyzed, Na number of alleles, He expected heterozygosity, Ho observed heterozygosity, HWE probability of departure from Hardy–Weinberg equilibrium, PIC polymorphism information content, F (Null) null alleles

>AACACACAAACTCTCAGAGCGCAGAGTTCCA
GCATTTCCATTCAAATCCATTTCAGCATCATATCCA
CACAAGCAAAGTGCAGGTTCAAAGCGGATTGAG
ACACACACACACACACTGAATCAGAGTGGGAA
TGTGTTCACTACAGGGGATTATTGGTGTGGGGA
CTGACAACACTCAGACTCCCATTTATCCTGAGTG
AGCTGGATAACC

OCS_6

OCS_F_6_ TGTGCTGGATTTCGGTGTTA
OCS_R_6_ TCGCTCCCAAGAGGAAACTA

>GATCTCGGAGGCTGGGAATTTGGAGGAGGGA
CAAGGCCACGGAGGGATGAGAATATTTGAATCCA
GGTGTGCTGGATTTCGGTGTACTGACGGAAAGG
GGCAGAATGGCAAACGGAACCTTGCTGCCAACTGG
GTTACAGTGATAGGGAGGGGGAGGGCAAATGAC
CTGTGGGCAAGGGTCAACCTTTGGAGATGCCGGG
ATAAGGGTCAAGGGTCAGGAAGGTATGACCCTGT
GGATCAAGGTCTATGGTTCGAGGGTCAGGGAAGT
ACGTAGGGGTGACCCAGTAACAGTTGTCTCTCTCT
CTCTCTCTGTCTCAGCCAGGACTGAATCCCATT
CGAGCAGCAGGAAGCTGAGCTTCTCATTGTTTGT
TGTCACAGTATTTCTCTTGGGAGCGACTGCC
TCCCCCTCTCCCCCTCTCA

OCS_8

OCS_R_8_ TTGGATTACGAAATGGTAGG
OCS_F_8_ TCCCTCTCGTGTCTCTCAC

>CCGAGATAGATGGTAAGTTCTCAATCATTTAA
AGTTTGCAGAATGGGCTATTTCTGATGTTAAAAT
AAATTAATTCATTGGATTTCAGCAAATGGTAGGTG
AGGATTTAAATGACAGAGGGAGAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGAAGACAGACAG
TGAGAGACACGAGGAGGGAGGGAGGGAGGAGG
GAGAGGAGGGAGGGAGGAGGAGGGAGGGAGGA
GAGAGAGAGAGATAGACACAGACAGAC

OCS_9

OCS_F_9_ TTGGATGCTGCCTTTCTCTT
OCS_R_9_ TCTCTCTCTCTCCCCCTGCT

>GAAGTTTATTTAAGAATACAGTTAATGTATAG
CAATAACTTTTGCCAATGGCAAACAAGGAAAAAA
TCCATGATATTACATAATCTTAGATAAATATATGA
AATGTTCCAACCAAACAACCTCCCTGTAGAAAA
CCCTTGACACAGGGTTAGCACAGGAAATATGAAT
GCTCATAACGATGCTAGAGCTTAGTCCTTTTCATTGG
ATGCTGCCTTTCTCTTCACACACACACACACACAC
ACAGACAAGCTTAGAGTCAGGACAGCTTTCAAAA
ACAGCAGGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGACAGAGACAGAGAGACAGAGAGAGACAGAGA
GAGAGA

OCS_10

OCS_F_10_ GACTGCACCTTGTGGGATCT
OCS_R_10_ TGCTGTGAGACCTTTCTCTCA
>CAACACAGCTGACTGCACCTTGTGGGATCTTG
CTGTGCACCACTGGGATTTTTGTTTTAAAAAGGA

TTTGGCTTCATTTAAGAGAGTTCAGCCTTTCTG
GAGGTTTGGGATGACGTAGACACACACACACACA
CACACACGCGTAGTGAGTGAGGAAAGGTCTCAC
AGCAGGCCGAAAGGGTGGGAGCACTGGTGGGGGA
GGGCAGGACTGGTGTCCCATCTGATTTCAGGTTCA
CATACCTACTGCTGCTGTGGATCTTGCTGTGCACA
CACTGGGCCTGT

OCS_13

OCS_F_13_ GCACTCACACATAGCAAACCA
OCS_R_13_ AGCATCACTTCACTGTCTGGAG

>ATTAGCACGTTGGTAAACACAGAAGCACTCA
CACATAGCAAACCATGAATATAACACACACACACA
ACACACACACACATACATAAATATTCTACTCCAG
ACAGTGAAGTGATGCTGTTTGTGATGGAGCTGGT
TGATGCTGTTTGTGATGGAGCTGGTTGATGCTGT
TTGCTGATGGAGC

OCS_17

OCS_F_17_ CAAGATTATGGTGCCTGCT
OCS_R_17_ TGTGACTGGAACAGGACTGG

>GGAGGAATCTGCGAATCCTTTCCCAAAATGG
AGCAGGTGAACAGTTTCTCCCCAGTGTGACGGCG
TCGATGTGTTTCCAGCCCAGACGGTCTTTTGCAA
CCTTCCACAGTCCGCACATTTCCACAGTTTTTCC
ATGTTGGAGATGTCCTTGTGTTGCTCCAGGTTGA
CTATCAGTAGAAGTCTCACACAGAACAAGATTAT
GGTGCCTGCTGTGATGGGGCAATATTTTTACAG
CTATGTTTATGGCTGTGTAACCTGGGAAGCTCTTC
CACAGTCAATGCATGGGAAAAATCAGTTAATTTT
TGATGTGTGTGTGTGTGTGTGCCAGTCTTGTCCA
GTCACACTGATATTCAAGACTGCAAAGCAGACA
GAACAGAGAAACTATTTTTCTTCTAGATTCGAAA
GGCCGAATAGCATTACAGTCTGATGATTTGAGTG
ACTGTCAGATGTGATGTGATGTTTGATT

OCS_19

OCS_F_19_ GCAGGAGAGACTGAGGGAAA
OCS_R_19_ TGCATGGACAAATACACACATG

>TTTATCCCTGTCCATGATTGTTTGATTCTCTCC
GTGTACGGCAGAGAGAGATTTTTAAAGTGAGCAC
GCAGCTGTGTCTCCAGAAGAACGGATCGATCATC
CATCTGCAGTTTAAAGTCACTTTAATGCAGGAGA
GACTGAGGGAAAGCAGCCAGACGCTGGATTACAG
CTGAAGCAACCCAGTCAATTCCCTTCCCCCACT
GCTCTGTGTGTGTGTGTTTGTGCGTTTGTCTTGTG
CATGTTTGTGTGTGTGTATGCATACTTATATGTGC
GCGTGTAGGCATTTGTATGTCTATGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGCATGTATGTGTGTGTCTAT
ATGTACAAATCTATGTGTGTTTGTGATGTTTGTCA
TGTGTGATTTGTCCATGCATGTGTTGTCACTNTG
TGTGTGTGTGTGTGTG

OCS_26

OCS_F_26_ GGACCCAAACAGAGCATCAC
OCS_R_26_ CAAAAGGCATGACAAATCCA

