

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética

**Diversidade e estrutura populacional do tubarão-raposa nos oceanos
Atlântico e Índico utilizando marcadores genéticos moleculares**

Millke Jasmine Arminini Morales



Botucatu/SP

Outubro de 2016

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética

Diversidade e estrutura populacional do tubarão-raposa nos oceanos

Atlântico e Índico utilizando marcadores genéticos moleculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Genética, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Millke Jasmine Arminini Morales

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Botucatu/SP

Outubro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Morales, Millke Jasmine Arminini.

Diversidade e estrutura populacional do tubarão-raposa nos oceanos Atlântico e Índico utilizando marcadores genéticos moleculares / Millke Jasmine Arminini Morales.- Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Fernando Fernandes Mendonça Capes:
20204000

1. Tubarão. 2. Biodiversidade-Conservação. 3. Estoques.
4. Dinâmica populacional. 5. Marcadores genéticos.

Palavras-chave: Alopiidae; Delimitação de estoques; Genética da conservação; Manejo pesqueiro; SSR.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



Dedico esta tese às minhas avós, Lygia e Salvadora.

“Essa pessoa tão linda, feita de sonho e de luz.

É amiga, é confidente, é porto seguro da gente.

É exemplo, é orgulho, é calor. É colo, é alegria, é consolo.

É Fada, é Anjo, É Ternura. (...) É a vovó – nosso amor.”

Lygia Peregrino Morales

Agradeço,

Ao Professor Dr. Fausto Foresti, que tive a honra e o prazer de ter como orientador durante minha pós-graduação. Muito obrigada pela oportunidade e confiança. Agradeço a orientação, suporte teórico, incentivo, apoio e compreensão nestes seis anos. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Professor Dr. Fernando F. Mendonça pela confiança e oportunidade para continuar o trabalho com o tubarão-raposa, e pelo suporte durante a execução deste estudo.

Ao Professor Dr. Claudio Oliveira pelas oportunidades no laboratório e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Professor Dr. Rui Coelho – Universidade do Algarve (Portugal) pelas contribuições teóricas e viabilização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (processo 2011/23787-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pelo suporte financeiro do projeto.

À FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do Projecto THRESHER (Ref. PTDC/MAR/109915/2009) pelo co-financiamento do trabalho por Fundos Nacionais Portugueses.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu pelos auxílios teóricos e práticos, cafés e parcerias. Obrigada!

Às amigas Cristiane Shimabukuro, Daniela Oliveira e Silvana Melo. Vocês foram essenciais e sou muito feliz por saber que além de parceiras de trabalho as tenho como amigas. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos, que de longe ou de perto estiveram ao meu lado nesses anos. Lillian de Oliveira, Sergianne Frison, Daniele Almeida, Ottilie Forster, Maria Rita Gilli, Dael Vasques, Rafael Tavares, Paula Severo e Alexandre Mansano. Muito obrigada! Amo vocês. (:

Ao meu companheiro, namorado e amigo Angelo Granai. Obrigada pela força, pelo carinho e por fazer a caminhada ser bem mais leve nesses meses.

Por fim agradeço à minha família. Nenhuma conquista vale à pena se não tenho vocês para dividir. Cada pedacinho do que faço de bom carrega vocês junto. Obrigada pelo apoio incondicional. Tudo isso é por vocês.

Muito obrigada!

Resumo

Populações de elasmobrânquios têm sofrido declínios severos nas últimas décadas devido à massiva pressão pesqueira. Com características de vida que tornam a espécie mais suscetível à pesca, o tubarão-raposa *Alopias superciliosus* está classificado atualmente como vulnerável na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN. A espécie apresenta maturação sexual tardia e somente dois (raramente quatro) filhotes a cada gestação, que dura aproximadamente 12 meses. Estas características evidenciam a necessidade de sistemas de manejo pesqueiro adequados à estruturação populacional da espécie, que se apresenta como um instrumento fundamental para sua conservação. Com o advento de novas tecnologias atualmente é viável utilizar ferramentas moleculares para elucidar questões evolutivas e genético-populacionais em organismos não modelos, gerando informações que podem auxiliar na elaboração de planos de manejo. Tendo em vista à escassez de informações sobre a dinâmica populacional do tubarão-raposa, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares em amostras de *A. superciliosus* provenientes de diferentes localidades dos oceanos Atlântico e Índico. Um total de 12 marcadores moleculares do tipo microssatélite, sendo 11 polimórficos e 1 monomórfico, foram identificados e, a partir desta identificação, *primers* espécie-específicos foram desenvolvidos e padronizados. Para acessar a diversidade genética e populacional de *A. superciliosus* foram genotipados quatro destes marcadores, além da realização do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial, em cerca de 200 amostras de tubarão-raposa coletados ao longo de todo o Oceano Atlântico e parte do Oceano Índico. Os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica encontrados nas sequências do DNAm foram baixos, sendo $\pi=0.0012 \pm 0.0009$ e $h=0.127 \pm 0.030$, respectivamente. Duas linhagens mitocondriais distintas foram identificadas, porém o DNAm não demonstrou evidências de ocorrência de estruturação populacional, com valores de Φ_{ST} negativos e não significativos. Já

com a utilização de microssatélites foi possível identificar diferenciação genética entre algumas populações, com um F_{ST} global de 0,072 (p-valor < 0,001), sendo identificada uma estruturação forte entre as populações do centro-sudoeste do Atlântico e as demais populações, bem como uma moderada estruturação entre a população do sudeste desta bacia oceânica e os indivíduos coletados na parte centro-nordeste. Mesmo não sendo incomum em elasmobrânquios a identificação de baixos valores de diversidade genética entre populações, os resultados aqui obtidos evidenciaram valores que estão entre os mais baixos já registrados para elasmobrânquios. A complexa dinâmica populacional do tubarão-raposa identificada no presente estudo pode ser explicada devido a uma baixa variabilidade causada provavelmente pela ação de efeito fundador, migrações inter-oceânicas recentes e uma forte estruturação populacional no Atlântico sul. Neste contexto, dois clados distintos foram identificados, estando separados por um mínimo de 8 passos mutacionais, sendo que o clado menos frequente é composto por apenas cerca de 4% dos indivíduos analisados e encontrado somente no Atlântico leste. Fatores como indícios de endogamia, estruturação populacional evidenciada principalmente na região centro sudoeste do Oceano Atlântico e a identificação de um clado aparentemente raro e com distribuição limitada impõem a necessidade de maiores esforços nas estratégias de conservação, sobretudo na região leste do Oceano Atlântico, onde a diversidade genética ainda é menos reduzida.

Palavras-chave: Alopiidae, manejo pesqueiro, tubarões, delimitação de estoques, genética da conservação, SSR.

Abstract

Elasmobranch populations have suffered severe declines during the last decades due to massive fisheries pressure. The bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* is currently classified as vulnerable according to the IUCN Red List since its life characteristics make this fish prone to fisheries. This species shows late sexual maturity and only two (rarely four) young born per gestation, which lasts approximately 12 months. Due to the natural vulnerability of this shark, elaborating a fisheries management system adequate to the species population structure is fundamental to its conservation. New technologies enable the usage of molecular tools to answer evolutionary questions in non-model organisms. Considering the lack of information about the population genetics of this species, the aim of this study was to develop and apply molecular markers for samples of *A. superciliosus* from the Indian and Atlantic oceans. Species-specific primers have been developed and standardized from 12 microsatellite markers, being 11 polymorphic and one monomorphic. Four of these microsatellite markers were genotyped and the mitochondrial DNA control region was sequenced, for approximately 200 samples of bigeye thresher shark from the Atlantic Ocean and part of the Indian Ocean, to understand the population dynamics and the genetic diversity of this species. Low values of nucleotide and haplotype diversity were found in the mtDNA ($\pi=0.0012 \pm 0.0009$ e $h=0.127 \pm 0.030$, respectively). Although the mtDNA has not demonstrated a significant population structure (negative and non-significant values of Φ_{ST}) two distinct mitochondrial lineages were found. On the contrary, the microsatellite markers showed a significant population structure ($F_{ST} = 0.072$, p-value <0.001) and a strong genetic structure was identified between the populations of the central-southwest of the Atlantic and other populations, as well as a moderate structuring between the southeastern population of this ocean basin and individuals collected in the central-northeast. Despite not being unusual

for elasmobranchs to identify low values of genetic diversity among populations, the results obtained in this study show values that are among the lowest values for elasmobranchs. The complex population dynamics of the bigeye thresher shark identified in the present study can be explained due to a low variability probably caused by the action of founding effect, recent inter-oceanic migrations and a strong population structure in the South Atlantic. In this context, two distinct clades were identified, being separated by a minimum of 8 mutational steps, and the less frequent clade is composed by only around 4% of the individuals analyzed and found only in the eastern Atlantic. Factors such as evidence of inbreeding, population structuring evidenced mainly in the southwest central region of the Atlantic Ocean and identification of an apparently rare clade with limited distribution impose the need for greater efforts in conservation strategies, especially in the eastern Atlantic region, where genetic diversity is still less reduced.

Keywords: Alopiidae, fisheries management, sharks, conservation genetics, SSR.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica da espécie de tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i>.....	14
Figura 2. Distribuição da espécie <i>Alopias superciliosus</i>.	15
Figura 3. Mapa de distribuição das áreas amostras e caracterização dos haplótipos e suas frequências encontradas em cada localidade	37
Figura 4. Rede de haplótipos do tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i>.	42
Figura 5. Árvore Neighbor-Joining de haplótipos gerada utilizando distâncias Tamura-Nei.....	42
Figura 6. Distribuição Mismatch dos haplótipos da região controle do DNAm_t do <i>Alopias superciliosus</i> encontrados no presente estudo..	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Loci</i> de microssatélites identificados para <i>Alopias superciliosus</i>	28
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para análise dos microssatélites no presente estudo.	37
Tabela 3. Posição em pares de bases de cada sítio polimórfico da região controle do DNAm com 858 pares de bases analisáveis, nas sequências obtidas das amostras de tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> e número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição geográfica.....	40
Tabela 4. Índices de diversidade genética para cada população de tubarão-raposa.	41
Tabela 5. Valores estimados de Φ_{ST} (DNA mitocondrial) e F_{ST} (microssatélites) par a par entre as oito populações do tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> (abaixo da diagonal) e valores de P (acima da diagonal).....	43
Tabela 6. Valores de Φ e F calculados na AMOVA com as quatro simulações realizadas.....	44
Tabela 7. Dados de quatro <i>loci</i> microssatélites (Asup06, Asup07, Asup08, Bth_27) utilizados nas análises de cada grupo de <i>A. superciliosus</i>	45

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução	14
2. Objetivos	23
3. Resultados e discussão	24
3.1 Capítulo 1 - Identificação de 12 loci de microssatélites espécie-específicos em <i>Alopias superciliosus</i> (Lamniformes, Alopiidae), espécie listada como Vulnerável pela IUCN.....	25
3.2 Capítulo 2 - Diversidade genética e estruturação populacional do vulnerável tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> (Lamniformes, Alopiidae) nos oceanos Atlântico e Índico: implicações para conservação.	31
4 Considerações finais	59
5 Referências	61

1. Introdução

1.1 Características gerais da espécie

O tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lowe, 1841) é um lamniforme representante da família Alopiidae (Figura 1) e pode ser distinguido das outras duas espécies do gênero *Alopias*, *A. vulpinus* e *A. pelagicus* por possuir olhos grandes e um sulco incomum em forma de “V” na região dorsal da cabeça (Compagno 2001, Smith *et al.* 2008). A espécie *A. superciliosus* está distribuída circunglobalmente, podendo ser encontrada em águas tropicais e temperadas (Figura 2) (Compagno 2001). Possui distribuição semelhante à outra espécie do gênero, *Alopias vulpinus*, que é geralmente é capturada mais próximo à costa, enquanto *A. superciliosus* é capturada em regiões oceânicas (Preti *et al.* 2008).

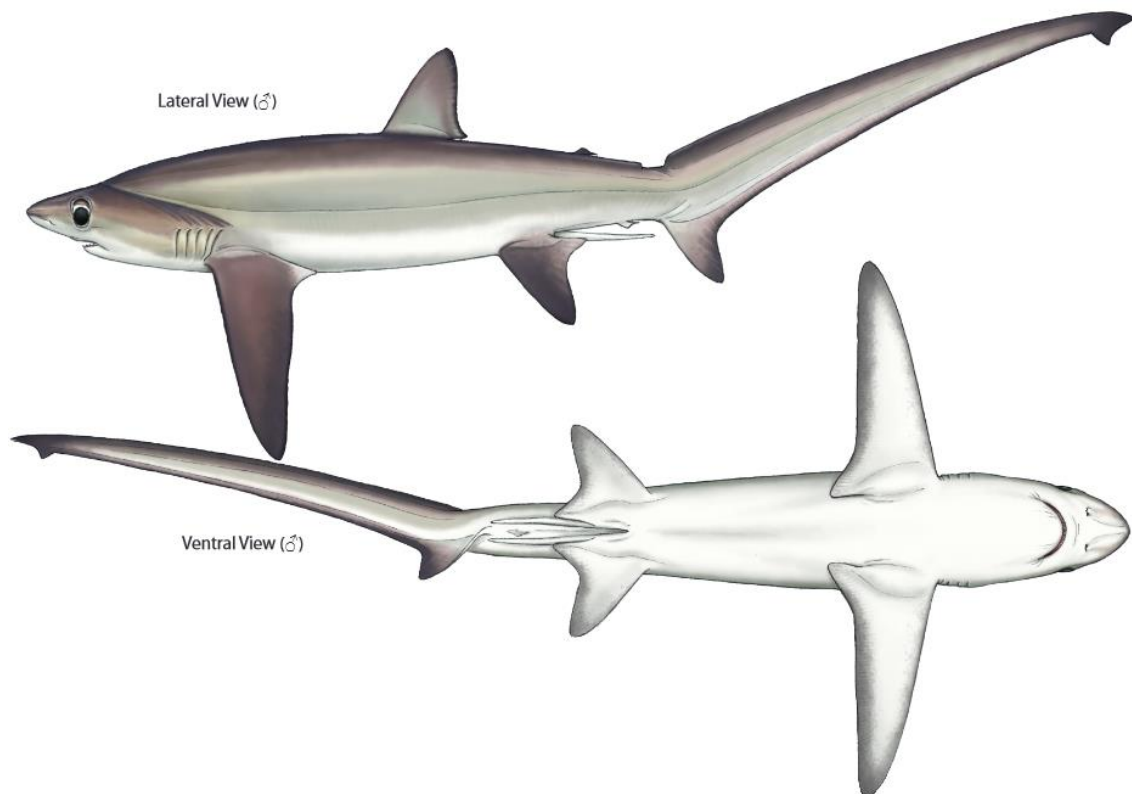


Figura 1. Representação gráfica da espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Ebert 2014)

Tubarões da espécie *A. superciliosus*, assim como os demais membros da ordem Lamniformes, apresentam viviparidade aplacentária com oofagia embrionária e dentre as três espécie que compõem a família é a que apresenta maturação sexual mais tardia (Smith *et al.* 2008). As fêmeas atingem a maturidade sexual entre 12 e 13 anos, com cerca de 340 cm (Comprimento Total - CT), tendo um período de gestação de aproximadamente 12 meses e produzem geralmente apenas dois e raramente quatro filhotes por ninhada, enquanto os machos começam a se reproduzir entre nove e 10 anos, com aproximadamente 280 cm (CT) (Chen *et al.* 1997, Liu *et al.* 1998). Também conhecida popularmente no Brasil como tubarão-raposa-olhudo, *A. superciliosus* apresenta características comuns a organismos K-estrategistas, como a já citada maturação tardia, baixa fecundidade e crescimento lento (Soto 2001, Smith *et al.* 2008).

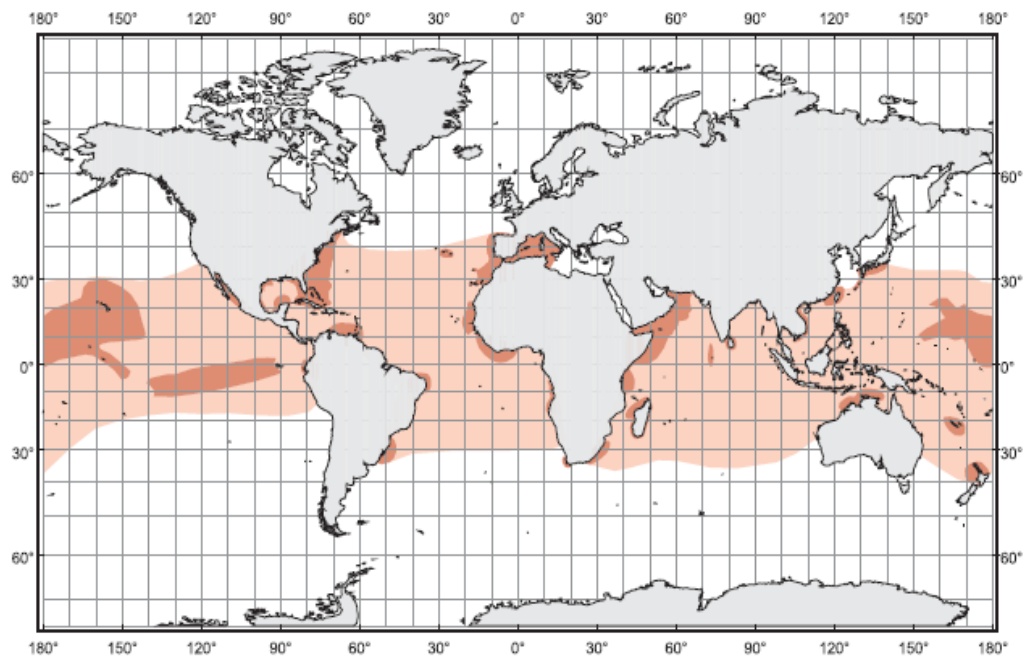


Figura 2. Distribuição da espécie *Alopias superciliosus*. A faixa marcada representa áreas onde a espécie já foi encontrada (Compagno 2001)

Atualmente *A. superciliosus* é listada como espécie globalmente vulnerável e embora ainda sejam insipientes as avaliações de grande escala, esta vem apresentando fortes indícios da fragilidade populacional frente à pressão pesqueira, constatada pelo acentuado

declínio populacional que vem sendo observado. Além da avaliação de globalmente vulnerável pela IUCN, uma série de avaliações regionais também tem sido levantadas para esta espécie, sendo relacionada como vulnerável no leste do Pacífico central, em perigo no noroeste e na região centro-oeste do Atlântico, quase ameaçada no sudoeste do Atlântico e vulnerável no oeste do Indo-Pacífico (Amorim *et al.* 2009).

1.2 Exploração Pesqueira

Tubarões *Alopias superciliosus* são pescados principalmente com a utilização de espinhéis e aparecem como fauna acompanhante na pesca dirigida para peixes teleósteos de alto valor comercial em todo o mundo (Compagno 2001). A captura do tubarão-raposa-olhudo é comum na pesca do espadarte *Xiphias gladius*, espécie que parece ocupar nicho ecológico semelhante ao de *A. superciliosus*, que difere, porém daqueles ocupados por outras espécies pelágicas (Nakano *et al.* 2003).

Visando aspectos relacionados à proteção e conservação da espécie, a captura de *A. superciliosus* é atualmente proibida em águas territoriais dos EUA desde o ano de 2000, pelo Plano de Gestão dos Tunídeos, Espadartes e Tubarões (Amorim *et al.* 2009). Em 2008, na resolução 08-07 da ICCAT (Comissão para a Conservação do Atum no Atlântico), ficou determinado que exemplares de *A. superciliosus* capturados no Oceano Atlântico, em áreas que a ICCAT administra a pesca, devem ser soltos vivos ou mortos. Se os animais estiverem vivos no momento de verificação das armadilhas, estes deverão ser devolvidos ao mar sem ferimentos e todas as capturas incidentais e solturas de tubarões vivos deverão ser reportadas à ICCAT, de acordo com as normas determinadas (ICCAT 2008). Mais recentemente, pela Instrução Normativa Interministerial número 5 do Ministério do Meio Ambiente (IBAMA) de 15 de abril de 2011, a espécie *A. superciliosus* passou a ser protegida por lei em todo o

território brasileiro, sendo proibida sua captura, desembarque, armazenamento e comercialização (MMA 2011).

Até meados da década de 70 as barbatanas de tubarões eram consideradas artigo de luxo na China, o que impedia o consumo pela grande maioria da população. No início dos anos 1980, mudanças políticas e econômicas ocorridas em todo o mundo afetaram os mercados consumidores, o que possibilitou o aumento do poder de compra das populações principalmente graças à diminuição de impostos sobre a importação de nadadeiras de tubarões no mercado oriental (Castro *et al.* 1999). Mesmo com o baixo valor da carne, parte da pesca marinha mundial nas últimas décadas foi então direcionada para a captura de elasmobrânquios devido principalmente ao valor elevado atribuída às nadadeiras e consequente aumento do consumo pelo mercado asiático (Castro *et al.* 1999, Bonfil 1994).

A maioria dos tubarões possui uma rara combinação de características biológicas que determinam o baixo potencial reprodutivo de muitas espécies (Castro *et al.* 1999), e por serem organismos K-estrategistas, são mais suscetíveis à sobrepesca que os peixes teleósteos (Bonfil 1994, Stevens *et al.* 2000). Devido às características naturais do grupo e ao aumento contínuo das capturas, a vulnerabilidade das espécies põe em risco à sustentabilidade da pesca de elasmobrânquios, já que após esgotamentos graves causados por fenômenos naturais ou pela ação humana, a recuperação das populações pode levar muitos anos para a maioria das espécies (Bonfil 1994), que já estão demonstrando indícios de diminuições populacionais drásticas em algumas regiões do planeta e, em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias vem sendo progressivamente incluídas nas listas de risco iminente de extinção pela IUCN (Camhi *et al.* 1998, Compagno 2001; Baum *et al.* 2003).

O real impacto da sobrepesca sobre os elasmobrânquios é ainda pouco conhecido (Castro *et al.* 1999, Dulvy *et al.* 2008). Grande parte da dificuldade em determinar este impacto deve-se ao conhecimento biológico restrito dos componentes do grupo, à escassez de

estatísticas pesqueiras espécie-específicas e à falta de modelos de avaliação demográfica específicos para elasmobrânquios. (Castro *et al.* 1999). Adicionalmente à falta de dados biológico-pesqueiros sobre os tubarões e raias mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento das populações devido à sua distribuição abrangendo vastas áreas geográficas, chegando a ser muitas vezes circunglobal (Baum *et al.* 2003).

1.3 Identificação de estoques

O conhecimento da estruturação populacional é essencial para a gestão eficaz de uma espécie, uma vez que estoques diferenciados geograficamente podem exigir manejo diferenciado (Keeney 2004). Neste sentido a identificação dos estoques constitui o procedimento básico para a criação e implementação de programas que utilizem os recursos pesqueiros de forma sustentável (Bonfil 2005).

No Atlântico Norte, onde a disponibilidade de informações tem sido um pouco mais consistente, pode-se destacar a existência de diversas espécies que já apresentam drásticos declínios populacionais. Para as espécies de tubarão-martelo *Sphyrna zygaena*, *Sphyrna lewini* e *Sphyrna mokarran* foram constatadas reduções populacionais de até 89%. Entre as espécies de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* e *A. vulpinus* observa-se uma redução de cerca de 80% em seus estoques. E a espécie *Carcharhinus longimanus*, conhecida como tubarão galha-branca, apresenta redução populacional de 70% (Compagno 2001, Baum *et al.* 2003).

Quando indivíduos de uma mesma espécie são segregados em diferentes unidades reprodutivas é possível detectar diferenças genéticas que refletem a magnitude do isolamento entre essas populações. A partir das diferenças entre populações que ocupam localidades

distintas é possível estimar indiretamente padrões de fluxo gênico e, conseqüentemente, os níveis da estruturação da espécie na área amostrada (Heist 2004).

A existência de poucas barreiras à migração faz com que a estruturação genética em espécies marinhas seja menos pronunciada do que em espécies de água doce (Ward *et al.* 1994). Além disso, a estruturação parece ser ainda menos pronunciada em espécies pelágicas com capacidade de migrar grandes distâncias (Waples 1998). Porém, a generalização sobre a idéia da existência de homogeneidade genética em ambientes marinhos pode muitas vezes estimular a sobreexploração das espécies, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade e possibilitar a eliminação de estoques locais (Smith *et al.* 1990, Kuusipalo 1999).

1.3 Marcadores moleculares

1.3.1 DNA mitocondrial

O material genético mitocondrial é utilizado há aproximadamente duas décadas para estabelecer a ligação genealógica entre os indivíduos e seus ancestrais comuns (Avice 2000). A observação de que haplótipos de DNA mitocondrial de populações de muitas espécies estão agrupados e que estes agrupamentos acompanham padrões biogeográficos introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avice *et al.* 1987, Avice 2000). Desta maneira, com base na distribuição geográfica dos haplótipos identificados e na divergência encontrada entre eles, Avice (2000) discute a possibilidade de determinar taxas de migração, existência de barreiras ao fluxo gênico, extinção de haplótipos intermediários, ocorrências de zonas híbridas e de realizar inferências cladísticas sobre as espécies.

Com base em algumas características 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, o DNA mitocondrial tornou-se também uma

ferramenta comum e eficiente para elucidar as relações entre os indivíduos nos vertebrados, em diferentes escalas evolutivas (Brown *et al.* 1979, Grissi *et al.* 2000).

Embora o DNAMt seja relativamente bem conservado entre distintas espécies animais, sua ordem e estrutura gênica têm mostrado variação em diferentes grupos. Um exemplo dessas diferenças está relacionado à região controladora deste segmento genômico (Heist 2004). A região controle do DNAMt é caracterizada por apresentar alta variabilidade devida principalmente à ocorrência de substituições de nucleotídeos, presença de curtas deleções e inserções e variação no número de repetições em tandem. Esta região genômica é dividida em três principais domínios: Domínio I - rico em adenina e citosina, corresponde à região adjacente ao RNAt, possui sequências associadas com o término de replicação da fita H e frequentemente inclui repetições em tandem de números variáveis (VNTRs - Variable Number of Tandem Repeats); Domínio II - rico em citosina e guanina, é caracterizado por ser o domínio mais conservado; e Domínio III - rico em adenina e timina, localizado próximo ao RNAtPhe (Baker & Marshal, 1997).

1.3.2 DNA nuclear

Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os microsatélites, também chamados de SSR (Simple Sequence Repeats) apresentam uma série de características desejáveis em estudos genéticos, por serem de característica codominante, ou seja, permitem a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que os tornam altamente informativos; são multialélicos devido ao processo recorrente de expansão e contração no número de unidades repetitivas ao longo das gerações, possibilitando a discriminação de indivíduos geneticamente distintos (Powell 1996).

O alto polimorfismo observado neste tipo de marcador é decorrente das altas taxas de mutação presentes nas regiões microsatélites, com cerca de 10^{-6} a 10^{-2} nucleotídeos por

loco por geração, resultando em uma ampla variação no número de unidades repetidas (Ellegren 2004). São também amplamente utilizados na construção de mapas genéticos, análises de paternidade e estudos forenses (Zhao & Kochert 1993, Ferdig & Su 2000, Melo *et al.* 2008). Apresentam-se como sequências de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* e estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, em maior ou menor abundância, podendo ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma (Chambers & Macavoy 2000, DeWoody & Avise 2000).

A grande aplicabilidade dos microssatélites em tubarões pode ser evidenciada primeiramente pela quantidade de artigos recentes disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização desses marcadores entre os representantes deste grupo (e.g., Boomer *et al.* 2010, Chabot *et al.* 2011, Kang *et al.* 2012, Chabot *et al.* 2012, O’Leary *et al.* 2013)

1.4 Estudos genéticos em espécies de tubarões

Em estudos genéticos com amostras globais do tubarão frade *Cetorhinus maximus*, Hoelzel e colaboradores (2006) encontraram poucos haplótipos e baixa diversidade nucleotídica, não sendo detectados valores de estruturação entre os indivíduos capturados em diferentes oceanos; sugeriram, assim, a existência de um possível gargalo populacional, ocorrido possivelmente no Holoceno como fator determinante da homogeneidade genética encontrada atualmente.

Karl e colaboradores (2011), ao analisar indivíduos de tubarão-cabeça-chata *Carcharhinus leucas* de três locais do sul dos EUA e de um ponto próximo à região norte do Brasil, encontraram menor variabilidade na região controle do DNA mitocondrial do que nos *loci* de microssatélites analisados. Tal diferença foi interpretada como uma indicação de provável filopatria das fêmeas. Além disso, com o auxílio do marcador mitocondrial, foi

evidenciada uma forte estruturação entre os tubarões *C. leucas* encontrados nas localidades do norte e sul dos EUA e os tubarões amostrados nas localidades mais ao sul, próximas ao Brasil. Os níveis de estruturação identificados parecem indicar que as regiões de berçário da espécie podem ser geneticamente mais isoladas do que se pensava (Karl *et al.* 2011).

A análise populacional utilizando marcadores nucleares e mitocondriais com o tubarão-lixia *Ginglymostoma cirratum* no Atlântico Ocidental evidenciou uma moderada estruturação populacional na área analisada, indicando que para esta espécie as regiões de mar aberto formam barreiras muito mais efetivas do que longas distâncias em águas rasas, sendo, então, refutada a hipótese de filopatria, já que os padrões encontrados foram similares para todos os marcadores utilizados (Karl *et al.* 2012). Contudo, não é possível determinar um padrão, principalmente em espécies com alta capacidade migratória. Populações significativamente diferenciadas foram observadas em tubarão branco, um lamniforme pelágico com ocorrência no Atlântico, com ao menos duas populações separadas ao leste e oeste desta bacia oceânica (O’Leary *et al.* 2015).

Em populações de tubarão baleia *Rhincodon typus*, a diferenciação genética detectada foi classificada como relativamente alta entre localidades nos oceanos Atlântico e Indo-Pacífico (Vignaud *et al.* 2014). Cardeñosa e colaboradores (2014) analisaram 351 indivíduos da espécie *Alopias pelagicus* e detectaram forte estruturação populacional para a espécie, sendo que duas unidades foram identificadas através do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I. Porém, estudos com outras espécies pelágicas demonstraram a ocorrência de estruturação populacional fraca ou ausente, como em *Cetorhinus maximus* (Hoelzel *et al.* 2006), *Rhincodon typus* (Taguchi *et al.* 2014) e *Pseudocarcharias kamoharai* (Silva Ferette *et al.* 2015). A ausência de estruturação populacional também foi detectada em um estudo anterior com o tubarão-raposa-olhudo *Alopias superciliosus* (Trejo 2005).

2. Objetivos

Considerando-se a urgente necessidade da proposição e efetivação de medidas de conservação para um grande número de espécies de tubarões e a atual falta de informações em escala global que poderiam viabilizar estas medidas, o presente estudo visou gerar informações sobre a dinâmica populacional da espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* com a aplicação de técnicas de genética molecular utilizando como marcadores sequências da região controle do DNA mitocondrial e microssatélites.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram listados os seguintes objetivos específicos:

- Construir bibliotecas genômicas a partir da técnica de pirosequenciamento e desenhar pares de iniciadores que flanqueiam as regiões microssatélite nucleares do genoma de *Alopias superciliosus*;
- Padronizar as condições de amplificação dos pares de iniciadores desenvolvidos para cada uma das regiões de microssatélites, selecionando marcadores que apresentem polimorfismos;
- Caracterizar a diversidade genética do tubarão-raposa-olhudo *Alopias superciliosus* ao longo de sua distribuição utilizando marcadores microssatélites e sequências da região controle do DNA mitocondrial;
- Identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial de *Alopias superciliosus* nos oceanos Atlântico e Índico;
- Propor hipóteses filogeográficas estabelecendo as relações entre as populações da espécie nas áreas estudadas;
- Gerar informações para subsidiar programas de manejo adequado e exploração sustentável dos estoques pesqueiros de *Alopias superciliosus* na totalidade de sua distribuição.

3. Resultados e discussão

As informações obtidas dos estudos efetuados sobre a dinâmica populacional da espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* foram organizadas na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir.

3.1 Capítulo 1

Caracterização de 12 *loci* de microssatélites espécie-específicos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lamniformes, Alopiidae).

3.2 Capítulo 2

Diversidade genética e estruturação populacional do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lamniformes, Alopiidae) nos oceanos Atlântico e Índico: implicações para conservação.

3.1 Capítulo 1

Caracterização de 12 *loci* de microssatélites espécie-específicos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lamniformes, Alopiidae).

Resumo

O tubarão-raposa é uma espécie com distribuição circunglobal que tem apresentado declínios populacionais severos, sendo atualmente apontada como a espécie com maior risco nas atividades que resultam em sobrepesca no Oceano Atlântico. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores do tipo microssatélite para a espécie *Alopias superciliosus* utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração. De um total de 12 *loci* de microssatélites que foram identificados, sendo dez dinecleotídeos e um hexanucleotídeo, onze se apresentaram polimórficos. Com a utilização destes marcadores, estudos genéticos populacionais poderão identificar possíveis estoques distintos e auxiliar diretamente na elaboração de planos de manejo para a espécie ao longo de toda sua distribuição.

Introdução e metodologia

O tubarão-raposa *Alopias superciliosus* é uma espécie de elasmobrânquio de distribuição circunglobal que habita regiões tropicais e subtropicais principalmente em oceano aberto, podendo, contudo, ser encontrado também em áreas costeiras (Compagno 2001). Possui maturação sexual tardia, com uma gestação de aproximadamente 12 meses e nascimento comum de dois e raramente de quatro filhotes por ninhada (Chen *et al.* 1997, Liu *et al.* 1998, Compagno 2001). Com evidências de declínios populacionais severos, atualmente é listado como vulnerável na Lista Vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) e é apontado por Cortés e colaboradores (2010) como a espécie com

maior risco de sobre-pesca do Atlântico (Baum *et al.* 2003, Dulvy *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009). Considerando a necessidade de ferramentas que possam auxiliar na geração de dados acerca da dinâmica populacional da espécie, além de fornecer informações de relações familiares e evolutivas, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de *primers* de microssatélites espécie-específicos para *Alopias superciliosus*.

O material genômico total foi extraído de um indivíduo de *Alopias superciliosus* proveniente da região equatorial leste do Oceano Atlântico utilizando kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Uma amostra de aproximadamente 100 ng de DNA de alta qualidade foi sequenciada através da técnica de pirosequenciamento em sequenciador Roche 454 GS FLZ, com procedimentos descritos por Margulies e colaboradores (2005). A partir de 48959 sequências geradas, o software MSATCOMMANDER versão 0.8.2 (Faircloth 2008) foi utilizado para selecionar sequências com número mínimo de repetições (sendo 8, 6, 3, 3 e 3 para di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos, respectivamente). *Primers forward* e *reverse* foram desenhados em regiões genômicas que flanqueiam as sequências microssatélite utilizando o software BatchPrimer3 (You *et al.* 2008). Para o desenho dos *primers*, os seguintes parâmetros foram considerados: (1) tamanho do *primer* entre 18 e 22 pares de bases (pb); (2) conteúdo de GC 40-60%; (3) temperatura de anelamento entre 50°C e 60°C (ótimo em 55°C) e (4) tamanho esperado do fragmento amplificado entre 100 e 500 pb.

O material genômico das amostras de tecido dos 32 indivíduos foi extraído com a utilização de um protocolo de extração em placa “Glass-fiber protocol” (Ivanova *et al.* 2006). Uma cauda M13 foi adicionada à extremidade 5’ de cada *primer forward* ou *reverse* para permitir a marcação com fluorescência, conforme o protocolo descrito por Schuelke (2000). A reação foi feita em um volume final de 12,5 µl contendo 1,0µl de DNA genômico (50-100 ng/µl), 1,25µl de tampão 10x (phONEUTRIA), 0,2µl de *primer F* (10uM), 0,2µl de *primer R*

(10 μ M) e 0,05 μ l de *primer* M13 marcado com a fluorescência (FAM ou VIC), 1,25 μ l de dNTPs (2mM), 0,5 μ l de MgCl₂ (50mM) e 0,1 μ l de Taq (5U/ μ l, phONEUTRIA). A amplificação dos *loci* foi realizada com as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial a 94°C (10 min) seguida de 20 ciclos a 94°C (45 seg), 55°C (50 seg) e 68°C (50 seg); anelamento do *primer* M13 com fluorescência por 20 ciclos a 94°C (30 seg), 53°C (45 seg) e 68°C (45 seg); seguidos de uma etapa de extensão final a 68°C (40 min). Posteriormente, 3,0 μ l dos produtos de PCR obtidos foram adicionados a 6,3 μ l de formamida e a 0,2 μ l de GeneScan™ 500 LIZ® Dye Size Standard v2.0 e genotipados num sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). O número de alelos por *locus*, heterozigidade observada e esperada e o teste exato para verificar eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados pelo software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Resultados e discussão

Um total de 12 *loci* de microssatélites, sendo onze dinucleotídeos e um hexanucleotídeo foram genotipados e confirmados. Onze destes *loci* apresentaram polimorfismos, com número de alelos variando entre 2 e 13 e número médio de 6 alelos. Cinco marcadores (Asup06, Asup07, Asup08, Asup16 e BTH_27) não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 1).

Os dados obtidos reforçam a aplicação do sequenciamento de nova geração utilizando a técnica de pirosequenciamento no desenvolvimento de marcadores microssatélites espécie-específicos em elasmobrânquios. Os resultados obtidos no presente estudo se apresentam como ferramentas importantes para análises populacionais em tubarão-raposa, contribuindo assim para a geração de informações que podem ser utilizadas diretamente na elaboração de planos de manejo para a espécie e possibilitam a identificação de características evolutivas e

estratégias de manutenção da variabilidade genética para esta espécie, como a ocorrência de paternidade múltipla, ainda não testada para a *A. superciliosus*.

Tabela 1. *Loci* de microssatélites identificados para *Alopias superciliosus*. N = número de indivíduos analisados; K = número de alelos; Ho = Heterozigosidade Observada; He = Heterozigosidade esperada; EHW = valor de P no teste exato; * p-valor <0,05; ^a = sequência TGT AAA ACG ACG GCC correspondente à cauda M13.

Primer	Sequência 5' - 3'	Motivo	Tamanho (pb)	Tamanho				
				N	K	Ho	He	EHW
Asup06	F ^a GAATACAAGCACCAGGTTTC R CACCCCTAAAATCCATGTC	(AC)10	210-226	28	8	0,464	0,798	0,000*
Asup07	F ^a TCAGACAGAGTAAAGGTCACAC R TCTGGCCTGTTTAGATATGG	(AT)10	180-204	28	13	0,286	0,908	0,000*
Asup08	F CCTCAATGAAGCTAGAGGAC R ^a TATTCAAGAGGGAGGTTGG	(CT)10	198-208	28	4	0,214	0,605	0,000*
Asup12	F ^a CTCAGGGTACAGAGTGTCTCA R GGCGAAGAGAGAAAGATAGAG	(TC)12	204	28	1	-	-	-
Asup16	F ^a GATGAGTCAAAGCCACCA R GACCCATTTATCCCTACTCTC	(CA)12	188-208	12	7	0,750	0,830	0,008*
Asup17	F ^a ACTGCCTTCCTGTTTCTGT R GATCTCAGAGGGTTGTAGGAT	(TC)11	203-213	12	6	0,583	0,772	0,098
Asup19	F ^a ACTGCCTTCCTGTTTCTGT R GATCTCAGAGGGTTGTAGGAT	(TC)11	203-213	12	6	0,583	0,714	0,414
Asup20	F ^a ACTGCCTTCCTGTTTCTGT R GATCTCAGAGGGTTGTAGGAT	(TC)11	203-213	12	6	0,750	0,750	0,411
Asup21	F ^a GGCTTCTCTTTGAATCAGG R CTGACAACCAGGGACTATTCT	(TG)12	197-208	12	5	0,750	0,801	0,057
Asup24	F ^a TAAACTGAGCAGCCAGAGAT R ACCACACTGGAAAACAGGT	(AT)12	206-208	12	2	0,833	0,522	0,077
Asup26	F TACATGGCTCTACCACTTCTC R ^a GTGTTCTGCTCAGGCTATTC	(TC)14	242-257	11	5	0,545	0,797	0,260
BTH_27	F ^a AGT TCC TCC TCG CCT TTC AC R CCC AAT GTC AGG TCA CTC AA	(GGGAGG)3	239-284	28	5	0,179	0,636	0,000*

Referências

- Amorim A, Baum J, Cailliet GM, Clò S, Clarke SC, Fergusson I, Gonzalez M, Macias D, Mancini P, Mancusi C, Myers R, Reardon M, Trejo T, Vacchi M & Valenti SV. 2009. *Alopias superciliosus*. 2009. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Available at <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/161696/0>. Accessed 22 May 2016.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA. Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. *Science*. 2003;299(5605): 389-392.
- Chen CT, Liu KM, Chang YC. Reproductive biology of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Lowe, 1839) (Chondrichthyes: Alopiidae), in the northwestern Pacific. *Ichthyological Research*. 1997;44(2-3): 227-235.
- Compagno L. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Vol. 2. Bullhead, mackerel, and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). No 1, Vol. 2. Rome: FAO Species Catalogue for Fishery Purposes; 2001.
- Cortés E, Arocha F, Beerkircher L, Carvalho F, Domingo A, Heupel M, ... & Simpfendorfer C. Ecological risk assessment of pelagic sharks caught in Atlantic pelagic longline fisheries. *Aquatic Living Resources*. 2010;23(1): 25.
- Dulvy NK, Baum JK, Clarke S, Compagno LJ, Cortes E, Domingo A, Fordham S, Fowler S, Francis MP, Gibson C, Martínez J. You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2008;18(5):459-482.
- Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010;10(3): 564-567.
- Faircloth BC. Msatcommander, detection of microsatellite repeat arrays and automated, *locus-specific primer* design. *Mol. Ecol. Resour*. 2008;8:92–94.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PD. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular ecology notes*. 2006;6(4): 998-1002.

- Liu KM, Chiang PJ, Chen CT. Age and growth estimates of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus*, in northeastern Taiwan waters. *Fishery Bulletin*. 1998;96(3): 482-491.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braveman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Shally HW, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376-380.
- Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*. 200;18(2):233-234.
- You F M, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, ... & Anderson OD. *BatchPrimer3*: a high throughput web application for PCR and sequencing *primer* design. *BMC bioinformatics*. 2008;9(1): 253.

3.2 Capítulo 2

Diversidade genética e estruturação populacional do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lamniformes, Alopiidae) nos oceanos Atlântico e Índico: implicações para conservação.

Resumo

O tubarão-raposa *Alopias superciliosus* é uma espécie pelágica altamente migratória com distribuição circunglobal, ocorrendo em áreas oceânicas e costeiras, particularmente em regiões tropicais. Atualmente é avaliada como “Vulnerável” pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) devido ao forte declínio populacional verificado nos últimos anos, sendo apontada como a espécie com maior risco de sobrepesca no Oceano Atlântico. Considerando a escassez de informações acerca da diversidade genética e dinâmica populacional da espécie, o presente estudo teve como objetivo avaliar os padrões de estruturação genético-populacional em *Alopias superciliosus* e gerar informações acerca da variabilidade genética da espécie no Oceano Atlântico e parte do Oceano Índico. Um total de 212 indivíduos do oceano Atlântico e 16 indivíduos do Oceano Índico foram analisados utilizando sequências da região controle do DNA mitocondrial e quatro *loci* de microssatélites. Apenas dez haplótipos foram identificados, sendo o mais frequente compartilhado por cerca de 90% dos tubarões analisados. Os valores para diversidade nucleotídica e haplotípica foram $\pi=0.00118 \pm 0.00089$ e $h=0.127 \pm 0.030$, respectivamente. Os valores de diversidade encontrados foram baixos, estando entre os menores já registrados em elasmobrânquios com esse mesmo marcador. As comparações realizadas com as sequências da região controle não evidenciaram estruturação populacional para as amostras analisadas, enquanto o valor de F_{ST} global foi de 0,072 com p-valor $< 0,001$ utilizando os marcadores microssatélites. Considera-se que este padrão pode ser devido a uma baixa

variabilidade causada pelo efeito fundador, por migrações interoceânicas recentes e mesmo por uma forte estruturação populacional no Atlântico sul. As análises revelaram também a existência de dois clados distintos separados por um mínimo de 8 passos mutacionais. O clado menos frequente foi compartilhado por apenas cerca de 4% dos indivíduos analisados, sendo encontrado somente no leste Atlântico. Características específicas como indícios de endogamia, estruturação populacional evidenciada principalmente na região centro sudoeste do Oceano Atlântico e a identificação de um clado aparentemente raro e com distribuição limitada certamente impõem a necessidade de maiores esforços em estratégias de conservação, sobretudo na região leste do oceano Atlântico, onde encontra-se a maior representatividade da diversidade genética da espécie, resguardando seu já limitado potencial evolutivo

Palavras-chave: elasmobrânquios, Alopiidae, manejo pesqueiro, delimitação de estoques, genética da conservação.

Introdução

A contínua pressão pesqueira direcionada ou não sobre muitas espécies de elasmobrânquios tem provocado declínios populacionais drásticos em diversas regiões do planeta. Invariavelmente, estratégias de manejo e conservação de elasmobrânquios, sobretudo de espécies pelágicas oceânicas, têm sido dificultadas pela escassez de informações populacionais, dados de captura espécie-específicos e informações sobre a delimitação e estado dos estoques ao longo das áreas de distribuição das espécies.

A maior parte dos oceanos não exibe barreiras óbvias à migração e dispersão das espécies (Waples 1998). Neste sentido, diversos métodos têm sido utilizados para identificar estoques pesqueiros com delimitações populacionais distribuídas geograficamente, incluindo

tagging, medições de calcificação de algumas estruturas e avaliações genéticas (Kumar *et al.* 2012). Em espécies marinhas de grande porte altamente migratórias, diversos estudos utilizando ferramentas genéticas demonstraram algum grau de estruturação populacional nos oceanos em diferentes escalas, tais como nos tubarões *Rhincodon typus* (Castro *et al.* 2007, Vignaud *et al.* 2014), *Carcharodon carcharias* (Jorgensen *et al.* 2009, O'Leary *et al.* 2015), nos peixes ósseos *Xiphias gladius* (Bremer *et al.* 1996, Lu *et al.* 2006), *Thunnus obesus* (Martínez *et al.* 2006), *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro *et al.* 2008) e em espécies costeiras com menores índices de migração, como os tubarões *Carcharhinus falciformis* (Clarke *et al.* 2015), *Carcharhinus plumbeus* (Portnoy *et al.* 2010), *Cacharias taurus* (Ahonen *et al.* 2009), *Carcharhinus limbatus* (Keeney & Heist 2006) e *Rhizoprionodon lalandii* (Mendonça *et al.* 2013).

Dentre as espécies que já foram fortemente impactadas pela pesca, o tubarão-raposa *Alopias superciliosus*, pertencente à família Alopiidae, distribui-se globalmente e possui alta capacidade migratória, sendo encontrado nas regiões Tropical e Subtropical, em áreas costeiras, mas principalmente em áreas de oceano aberto (Compagno 2001). A espécie atinge tardiamente a maturação sexual, sendo entre 9 e 10 anos em machos e 12 e 13 anos para fêmeas (Liu *et al.* 1998) e em cada ninhada, com período de gestação de aproximadamente 12 meses, nascem apenas dois ou raramente quatro filhotes (Chen *et al.* 1997, Compagno 2001), determinando, assim, uma taxa de crescimento populacional anual excepcionalmente baixa (0,002) (Liu *et al.* 1998, Camhi *et al.* 2009).

Alopias superciliosus é uma espécie comumente capturada como *bycatch* na pesca dirigida a atuns e espadartes e possui de moderada a alta mortalidade nesse tipo de pesca (Camhi *et al.* 2009, Coelho *et al.* 2012). Embora ainda sejam escassas as avaliações em toda a sua escala de distribuição, a espécie vem apresentando fortes indícios identificadores de fragilidade populacional frente à pressão pesqueira, constatada pelo acentuado declínio de

capturas que vem sendo observado nos últimos anos (Baum et al 2003). Uma série de avaliações regionais tem sido levantada para esta espécie, que se encontra relacionada na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) como “Vulnerável” no leste do Pacífico central, “Em Perigo” no noroeste e na região centro-oeste do Atlântico, como “Quase Ameaçada” no sudoeste do Atlântico e “Vulnerável” no oeste do Indo-Pacífico (Amorim *et al.* 2009). Globalmente *A. superciliosus* é listada como “Vulnerável”, apresentando declínios populacionais severos (Baum *et al.* 2003, Dulvy *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009). A combinação de características de vida de baixa produtividade com a alta suscetibilidade à pesca de espinhel confere à espécie uma baixa capacidade de recuperação frente à exploração pesqueira, levando *A. superciliosus* a ser apontada como espécie com maior risco de sobre-pesca no oceano Atlântico (Simpfendorfer *et al.* 2008, Cortés *et al.* 2010).

Sendo o estudo da genética de populações um componente essencial para a caracterização da diversidade genética, identificação de unidades evolutivas diferenciadas e sua distribuição, a delimitação de estoques genéticos, a existência de fluxo gênico e suas inferências em conservação, este estudo teve como objetivo avaliar tais parâmetros utilizando marcadores do tipo microssatélite e sequências da região controle do DNA mitocondrial da espécie *A. superciliosus*, utilizando amostras obtidas nos oceanos Atlântico e Índico.

Material e Métodos

Amostragem e procedimentos de laboratório

De 2008 a 2012 foram coletadas amostras de 228 indivíduos do tubarão *Alopias superciliosus* por observadores de bordo do Instituto Português de Mar e Atmosfera (IPMA), Portugal, em embarcações comerciais que utilizam espinhel de superfície como arte de pesca

e que atuam em diversas áreas dos oceanos Atlântico e Índico. Pequenos fragmentos de tecido muscular entre 1 e 2 cm³ foram coletados durante operações rotineiras de pesca efetuadas pelas embarcações, que foram armazenados a -20°C em etanol 95%.

Os agrupamentos amostrais compondo populações hipotéticas foram estabelecidos de acordo com a proximidade geográfica, sendo identificados como Atlântico Nordeste (ANE), com ponto médio do grupo amostral em 16°30'N / 26°34'O; Equatorial Leste 1 (EE1), com ponto médio em 2°30'S / 16°20'O; Equatorial Leste 2 (EE2) 2°30'S / 6°50'L; Atlântico Sudeste (ASE) 17°10'S / 0°30'L; Atlântico Sul (AS) 37°10'S / 12°50'O; Equatorial Oeste (EW) 2°40'S / 32°20'O; Atlântico Sudoeste (ASW) 25°20'S / 35°50'O; Atlântico Noroeste (ANW), próximo à costa leste da Flórida (EUA) e Sudoeste do Índico (ISW), próximo à ilha de Madagascar (Figura 3).

O DNA genômico total foi extraído com a utilização de um protocolo de extração em placa “Glass-fiber protocol” (Ivanova *et al.* 2006). A amplificação da região controladora do DNA mitocondrial de 228 amostras (ANE n=74; EE1 n=23; EE2 n=51; ASE, n=26; AS n=3; EW n=19; ASW n=13; ANW n=3 e ISW n=16) foi realizada utilizando-se um par de *primers* externos Pro-L (5' - AGG GRA AGG AGG GTC AAA CT - 3') e 282 (5' - AAG GCT AGG ACC AAA CCT - 3') (Keeney & Heist 2006), que flanqueiam a região genômica de interesse. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 12,5 µl com 1X de PCR Buffer minus Mg, 0.2mM de cada dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 1µl de DNA template e 2 unidades de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®).

O programa para a PCR foi realizado pela denaturação inicial do material a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos com denaturação a 94°C durante 1 minuto; permanência a 58°C durante 30 segundos para anelamento e extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos, seguindo-se a extensão final durante 7 minutos a 72°C. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando o corante BlueGreen

sob luz azul. Os produtos de PCR foram purificados utilizando ExoSap-IT® (USB Corporation), sequenciadas em sequenciadores automáticos, modelos 3130 e 3500 (Applied Biosystems) utilizando kit para sequenciamento Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), sendo realizada a purificação via precipitação com etanol. Para as reações de sequenciamento foram utilizados dois *primers* internos, sendo F 5' - CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG – 3' (Mendonça et al 2009) e um *primer* desenvolvido para o presente estudo CR-AloS 5' - CCT CTA GTT CCC TTT AAT GG – 3', já que a presença de uma região repetitiva impede o sequenciamento utilizando o mesmo *primer* reverse que foi utilizado na amplificação.

Para amplificação dos microssatélites foram utilizados *primers* para quatro *loci* diferentes (Tabela 2) em 209 amostras (ANE n=57; EE1 n=25; EE2 n=34; ASE n=19; AS n=20; EW n=28; ASW n=9; ANW n=6 e ISW n=11). Uma cauda M13 foi adicionada à extremidade 5' de cada *primer* forward ou reverse para permitir a marcação com fluorescência, como descrito por Schuelke (2000). A reação foi feita em um volume final de 12,5µl, contendo 1µl de DNA genômico (50 -100 ng/µl), 1,25µl de tampão 10x (phONEUTRIA), 0,2µl de *primer* F (10µM), 0,2µl de *primer* R (10µM) e 0,05µl de *primer* M13 marcado com a fluorescência (FAM ou VIC), 1,25µl de dNTPs (2mM), 0,5µl de MgCl₂ (50mM), e 0,1µl de Taq (5U/µl, phONEUTRIA).

A amplificação dos *loci* foi realizada com as seguintes condições de termociclagem: denaturação inicial a 94°C (10 min); seguida de 20 ciclos a 94°C (45 seg), 55°C (50 seg) e 68°C (50 seg); seguidos do anelamento do *primer* M13 com fluorescência por 20 ciclos a 94°C (30 seg), 53°C (45 seg) e 68°C (45 seg); seguidos de uma etapa de extensão final a 68°C (40 min). Posteriormente, 3,0µl dos produtos de PCR obtidos foram adicionados a 6,3 µl de formamida e a 0,2µl de GeneScan™ 500 LIZ® Dye Size Standard v2.0 e genotipados num sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

Tabela 2. *Primers* utilizados para análise dos microssatélites no presente estudo. a : sequência TGT AAA ACG ACG GCC correspondente à cauda M13.

<i>Primer</i>		Sequência 5' - 3'	Motivo
Asup06	F	^a GAATACAAGCACCAGGTTTC	(AC)10
	R	CACCCCTAAAATCCATGTC	
Asup07	F	^a TCAGACAGAGTAAAGGTCACAC	(AT)10
	R	TCTGGCCTGTTTAGATATGG	
Asup08	F	CCTCAATGAAGCTAGAGGAC	(CT)10
	R	^a TATTCAAGAGGGAGGTTGG	
BTH_27	F	^a AGT TCC TCC TCG CCT TTC AC	(GGGAGG)3
	R	CCC AAT GTC AGG TCA CTC AA	

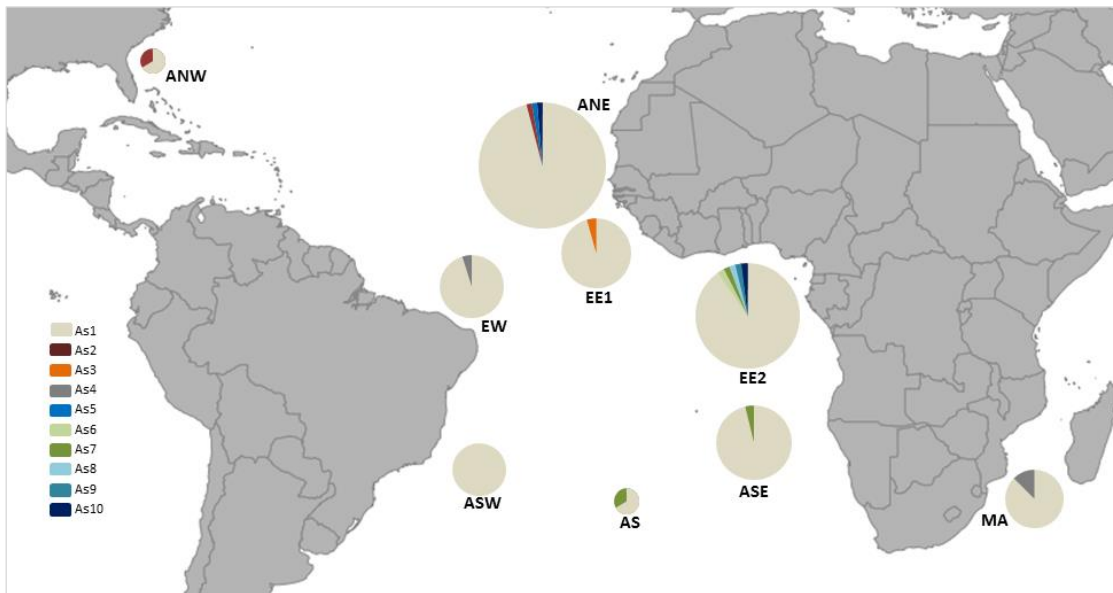


Figura 3. Mapa de distribuição das áreas amostras e caracterização dos haplótipos e suas frequências encontradas em cada localidade. Os círculos têm tamanho proporcional à quantidade de indivíduos analisados em cada local. As cores indicam a ocorrência de cada haplótipo na população proporcionalmente. As cores dos haplótipos (As1-As10) estão representadas na figura. ANE: Atlântico Nordeste, EE1: Equatorial Leste 1, EE2: Equatorial Leste 2, ASE: Atlântico Sudeste, AS: Atlântico Sul, EW: Equatorial Oeste, ASW: Atlântico Sudoeste, ANW: Atlântico Noroeste, ISW: Sudoeste do Índico.

Análise de dados

DNA mitocondrial

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (Edgar 2004). O número e frequência dos haplótipos, sítios polimórficos, transições e transversões, além da determinação dos valores de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h), foram determinados com o software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O índice de fixação Φ_{ST} par a par com aplicação do modelo evolutivo de sequência Tamura e Nei (Tamura & Nei 1993, Excoffier & Lischer 2010) considerando-se 10.000 permutações foi utilizado para determinar a diferenciação genética entre as populações. Para determinar o índice de fixação global, bem como uma possível estruturação entre agrupamentos de populações determinados *a priori*, foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992). Esta análise gera estatísticas Φ (Φ_{ST} , Φ_{SC} , Φ_{CT}), sendo a significância estatística dada considerando-se 10.000 permutações. Quatro simulações distintas foram realizadas, considerando dois agrupamentos no Atlântico segundo os hemisférios - norte X sul + Índico e norte X sul X Índico (norte - ANE, EE1, EW; sul - ASE, ASW, EE2; Índico - ISW) e considerando-se as porções leste e oeste. Duas outras simulações também foram feitas, considerando-se as combinações leste X oeste + Índico e leste X oeste X Índico (leste - EE1, ANE, EE2, ASE; oeste - ASW, EW; Índico - ISW), também utilizando o software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer 2010)

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1989) e F_S de Fu (Fu 1996) foram utilizados para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle do DNAm. Estes testes foram desenvolvidos para verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma, mas considerando-se um desvio significativo, também é possível detectar expansão ou redução (*bottleneck*) populacional recente (Fu & Li 1993, Tajima 1996, Rand & Kann 1998). A história demográfica também foi avaliada utilizando a

Distribuição *Mismatch* (Rogers & Harpending 1992, sendo que para análise da Distribuição *Mismatch* e para o cálculo dos testes de neutralidade foi utilizado o software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Network 4.6 (Bandelt *et al.* 1999). A distância genética entre as linhagens e a árvore de haplótipos foram calculadas utilizando o software MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013).

Microsatélites

A inferência acerca do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi feita por teste exato utilizando o software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). A diversidade genética foi estimada utilizando número de alelos por *locus*, riqueza alélica, coeficiente de endogamia (FIS), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e), calculados com a aplicação do Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O mesmo software foi usado para análises de estruturação populacional através do cálculo de valores de F_{ST} par a par (com base na estatística F de Wright) e da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com 10.000 permutações (Excoffier *et al.* 1992, Excoffier & Lischer 2010). Os agrupamentos delimitados *a priori* para a AMOVA foram os mesmos definidos para as análises de DNA mitocondrial (norte X sul + Índico, norte X sul X Índico, leste X oeste + Índico e leste X oeste X Índico).

Resultados

DNA mitocondrial

O fragmento gerado apresentou 858 pares de bases, abrangendo quase a totalidade da região controle do DNA mitocondrial (cerca de 80%) descrito para a espécie, que contém 1062 pares de bases (Chang *et al.* 2014). Nos 228 indivíduos de *A. superciliosus* sequenciados foi observado um conjunto gênico composto em média por 32.53% de timina, 31.94% de adenina, 22.02% de citosina e 13.52% de guanina. Um total de dez haplótipos (As1 – As10)

foi gerado a partir de 14 sítios segregantes, sendo 5 transições e 10 transversões (Tabela 3). Dentre os haplótipos encontrados, o mais frequente (As1) é compartilhado por 217 indivíduos, representando 93,5% dos exemplares analisados. Todos os 9 haplótipos restantes foram considerados raros, com frequência máxima de 1.3% (Tabela 3). Os valores totais dos índices de diversidade encontrados foram baixos, sendo $\pi = 0.00118 \pm 0.00089$ e $h = 0.127 \pm 0.030$ para diversidade nucleotídica e haplotípica, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3. Posição em pares de bases de cada sítio polimórfico da região controle do DNAm com 858 pares de bases analisáveis, nas sequências obtidas das amostras de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* e número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição geográfica. As letras indicam nucleotídeos (A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina) que variam de acordo com as mudanças encontradas em cada haplótipo. Os pontos indicam a não variação da base, em relação ao primeiro haplótipo listado (As1). ANE: Atlântico Nordeste; EE1: Equatorial Leste 1; EE2: Equatorial Leste 2; ASE: Atlântico Sudeste; AS: Atlântico Sul; EW: Equatorial Oeste; ASW: Atlântico Sudoeste; ANW: Atlântico Noroeste; ISW: Sudoeste do Índico.

Sítios polimórficos (1-858)														Amostras por regiões e haplótipos									
Hap	0	0	1	1	1	2	2	2	2	3	4	6	7	8	ANE	EE1	EE2	ASE	AS	EW	ASW	ANW	ISW
	4	6	7	9	9	0	0	5	5	8	1	8	7	3	(74)	(23)	(51)	(26)	(3)	(19)	(13)	(3)	(16)
As1	C	T	T	T	A	A	A	G	T	A	C	C	A	C	71	22	46	25	2	18	13	2	14
As2	T	T	T	1	-	-	-	-	-	-	1	-
As3	G	C	C	A	T	T	.	A	A	T	A	.	.	.	-	1	-	-	-	-	-	-	-
As4	T	.	.	-	-	-	-	-	1	-	-	2
As5	T	1	-	-	-	-	-	-	-	-
As6	G	C	C	A	T	.	T	A	A	T	A	.	.	.	-	-	1	-	-	-	-	-	-
As7	G	C	C	A	T	.	T	A	A	T	A	T	T	T	-	-	1	1	1	-	-	-	-
As8	G	C	C	A	T	.	.	A	A	T	A	T	T	T	-	-	1	-	-	-	-	-	-
As9	G	C	C	A	T	.	.	A	A	T	A	.	T	T	-	-	1	-	-	-	-	-	-
As10	G	C	A	A	T	T	.	A	A	T	A	T	T	T	1	-	1	-	-	-	-	-	-

Dois haplogrupos, com oito mutações entre eles, foram formados na rede de haplótipos (Figura 4): o Clado A composto pelos haplótipos As1-As4 e o Clado B composto pelos haplótipos As5-As10. Essa filogenia foi confirmada na análise Neighbor-Joining (Figura 5), que apresentou uma topologia próxima à encontrada na rede de haplótipos. Nesta árvore foi possível verificar que o indivíduo do Oceano Pacífico de *A. superciliosus* coletado

próximo a Taiwan (Chang *et al.* 2014) é proveniente do Clado A. O Clado B é compartilhado por 3,9% das amostras analisadas e foi considerado como raro. A distância genética calculada entre as linhagens foi de $0,012 \pm 0,003$ e os índices de diversidade de cada uma delas estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Índices de diversidade genética para cada população de tubarão-raposa. SD – Desvio Padrão. ANE: Atlântico Nordeste, EE1: Equatorial Leste 1, EE2: Equatorial Leste 2, ASE: Atlântico Sudeste, AS: Atlântico Sul, EW: Equatorial Oeste, ASW: Atlântico

População	Diversidade haplotípica h	SD	Diversidade nucleotídica π (%)	SD (%)
EE1	0.087	0.078	0.010	0.020
EE2	0.188	0.074	0.205	0.132
ASE	0.077	0.070	0.111	0.086
AS	0.667	0.314	0.960	0.763
ANE	0.080	0.043	0.077	0.065
EW	0.105	0.092	0.116	0.090
ASW	0.000	0.000	0.000	0.000
ANW	0.667	0.314	0.220	0.207
ISW	0.233	0.126	0.258	0.166
Total	0.127	0.030	0.118	0.088
Clado A	0.054	0.021	0.011	0.021
Clado B	0.889	0.091	0.317	0.211

Os valores de Φ_{ST} par a par não representaram a existência de estruturas populacionais (Tabela 5). Da mesma forma, os resultados da Análise de Variância Molecular não revelaram diferenças significativas em nenhuma das simulações de hipóteses de estruturas populacionais (Tabela 6). O valor do Φ_{ST} global (considerando todas as populações como um único agrupamento no AMOVA) foi 0,0394 ($P= 0,0635$), não rejeitando assim a hipótese nula de panmixia com este marcador.

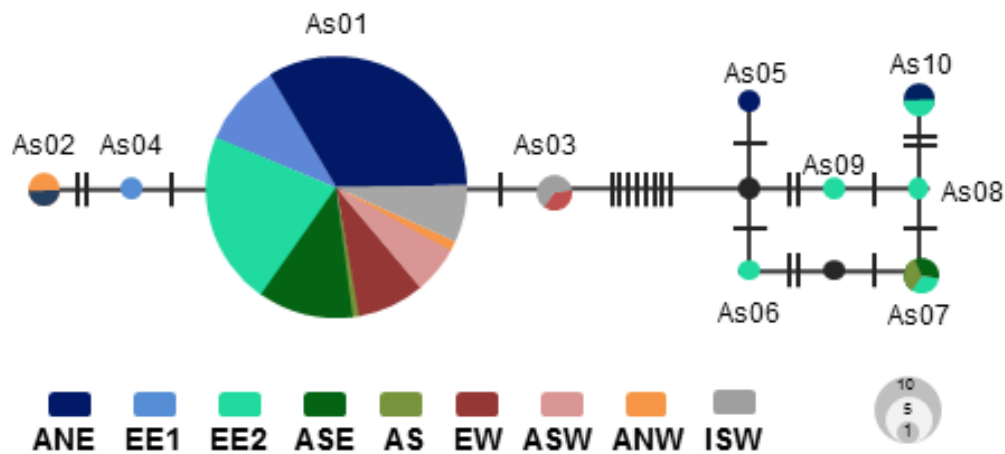


Figura 4. Rede de haplótipos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus*. Os círculos coloridos representam os haplótipos (As01 – As10) encontrados no presente estudo. Círculos pretos indicam haplótipos hipotéticos ancestrais ou não amostrados. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Populações diferentes são representadas com cores distintas e estão proporcionalmente mostradas dentro dos círculos. As linhas entre os haplótipos indicam diferença de 1 par de base (1 passo mutacional). ANE: Atlantic Northeast, EE1: Equatorial East 1, EE2: Equatorial East 2, ASE: Atlantic Southeast, AS: Atlantic South, EW: Equatorial West, ASW: Atlantic Southwest, ANW: Atlantic Northwest, ISW: Indian Southwest.

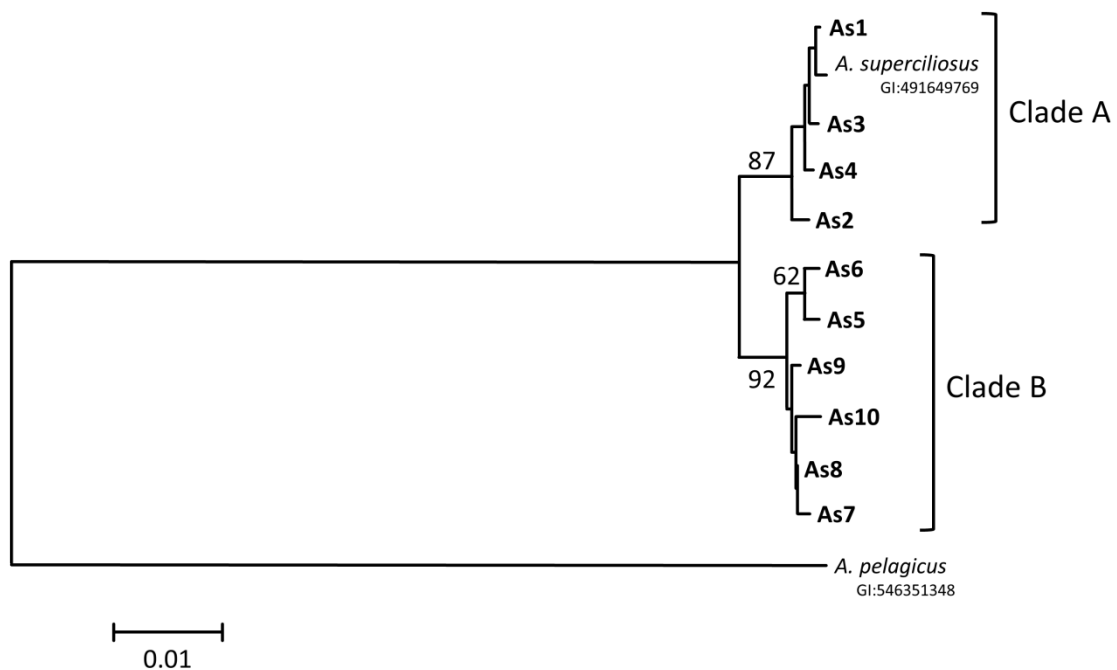


Figura 5. Árvore Neighbor-Joining de haplótipos gerada utilizando distâncias Tamura-Nei. Os dois haplogrupos estão indicados como Clado A e Clado B. Porcentagens de bootstrap são mostradas quando >50%. As1-As10 indicam os haplótipos encontrados no presente estudo. Sequências de D-loop obtidas no GenBank: *Alopias superciliosus*, identificação GI:491649769 (Chang *et al.* 2014) e *Alopias pelagicus*, identificação GI:546351348 (Chen *et al.* 2015).

Considerando tais valores, as análises relacionadas às expansões populacionais foram realizadas com um único grupo com todas as amostras. No gráfico de Distribuição *Mismatch* observou-se uma curva unimodal (Figura 6), sugerindo a ocorrência de um processo de expansão populacional recente. Porém, os valores das análises D de Tajima e F_S de Fu, $D = -1.427$ ($P = N.A$) e $F_S=0$ ($P=0$) respectivamente, e os valores de H_{rr} e SSD ($H_{rr}= 0,714$ $P= 0,753$ e $SSD= 0,006$ $P = 0.146$) não corroboraram uma possível expansão populacional recente do tubarão-raposa na área estudada.

Tabela 5. Valores estimados de Φ_{ST} (DNA mitocondrial) e F_{ST} (microssatélites) par a par entre as oito populações do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (abaixo da diagonal) e valores de P (acima da diagonal). ANE: Atlântico Nordeste, EE1: Equatorial Leste 1, EE2: Equatorial Leste 2, ASE: Atlântico Sudeste, AS: Atlântico Sul, EW: Equatorial Oeste, ASW: Atlântico Sudoeste, ANW: Atlântico Noroeste, ISW: Sudoeste do Índico.

<i>DNA mitocondrial</i>									
	ANE	AS	ASE	ASW	EE1	EE2	EW	ANW	ISW
ANE		0,042	0,855	1,000	1,000	0,091	1,000	0,125	0,346
AS	0,545		0,205	0,189	0,132	0,174	0,146	0,195	0,148
ASE	-0,021	0,349		1,000	1,000	0,573	1,000	0,191	0,696
ASW	-0,030	0,490	-0,030		1,000	0,516	1,000	0,185	0,489
EE1	-0,013	0,612	-0,010	-0,027		0,248	0,704	0,128	0,167
EE2	0,024	0,134	-0,009	0,011	0,033		0,321	0,279	0,335
EW	-0,017	0,561	-0,017	-0,021	0,001	0,023		0,133	0,581
ANW	0,181	-0,143	0,064	0,490	0,513	-0,043	0,487		1,000
ISW	-0,009	0,481	-0,015	0,048	0,063	0,014	-0,026	0,373	
<i>Microssatélites</i>									
	ANE	AS	ASE	ASW	EE1	EE2	EW	ANW	ISW
ANE		0,000	0,014	0,161	0,270	0,393	0,000	0,352	0,289
AS	0,340		0,000	0,000	0,000	0,000	0,952	0,000	0,000
ASE	0,092	0,677		1,000	0,320	0,108	0,000	1,000	0,230
ASW	0,049	0,659	-0,039		0,738	0,445	0,000	1,000	0,549
EE1	0,012	0,522	0,023	-0,011		0,807	0,000	0,788	0,408
EE2	0,002	0,442	0,035	-0,001	-0,010		0,000	0,805	0,460
EW	0,268	-0,039	0,533	0,481	0,402	0,350		0,000	0,000
ANW	0,027	0,702	-0,055	-0,085	-0,019	-0,029	0,470		0,834
ISW	0,020	0,527	0,058	0,008	0,022	0,002	0,367	-0,034	

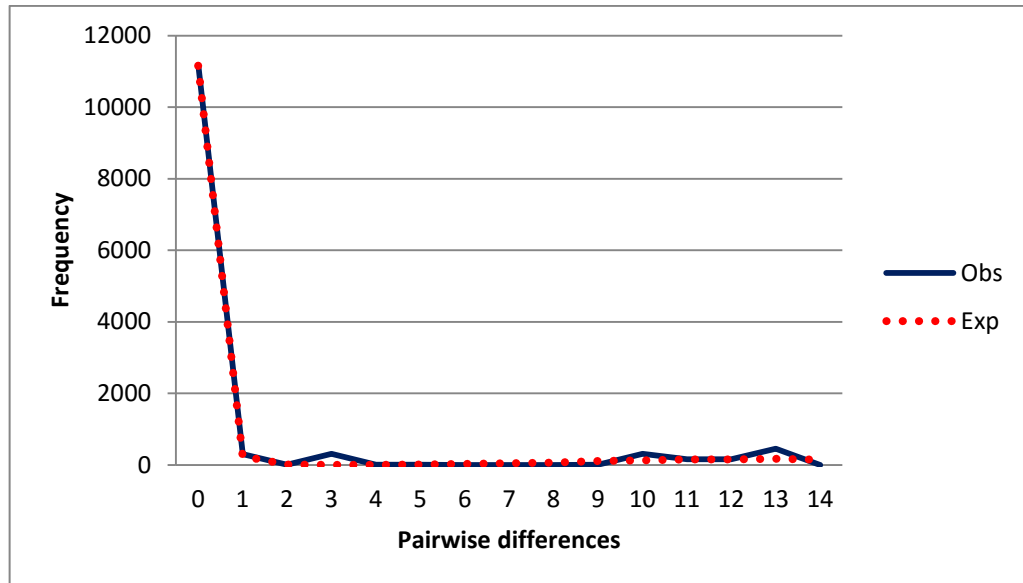


Figura 6. Distribuição *Mismatch* dos haplótipos da região controle do DNAmT do *Alopias superciliosus* encontrados no presente estudo. Obs.: distribuição observada, Exp.: distribuição esperada.

Tabela 6. Valores de Φ calculados pelo AMOVA com as quatro simulações realizadas. Φ_{ST} - estruturação global, Φ_{SC} - estruturação entre populações dentro dos grupos, Φ_{CT} - estruturação entre grupos. * = p-valor < 0,01.

<i>DNA mitocondrial</i>						
Simulações	Φ_{ST}	<i>p-valor</i>	Φ_{CT}	<i>p-valor</i>	Φ_{SC}	<i>p-valor</i>
Norte / Sul + Índico	0,011	0,253	0,010	0,315	0,001	0,486
Norte / Sul / Índico	0,012	0,254	0,015	0,188	-0,003	0,593
Oeste / Leste + Índico	0,007	0,261	0,000	0,526	0,007	0,236
Oeste / Leste / Índico	0,006	0,262	-0,003	0,563	0,009	0,213
<i>Microssatélites</i>						
Simulações	F_{IT}	<i>p-valor</i>	F_{CT}	<i>p-valor</i>	F_{SC}	<i>p-valor</i>
Norte / Sul + Índico	0,489	0,000*	0,024	0,878	0,073	0,000*
Norte / Sul / Índico	0,487	0,000*	-0,038	0,907	0,082	0,000*
Oeste / Leste + Índico	0,503	0,000*	0,037	0,021	0,041	0,000*
Oeste / Leste / Índico	0,502	0,000*	0,039	0,005*	0,039	0,000*

Tabela 7. Dados de quatro *loci* microssatélites (Asup06, Asup07, Asup08, Bth_27) utilizados nas análises de cada grupo de *A. superciliosus*. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Ne = número de alelos efetivos; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; FIS = coeficiente de endogamia; EHW = valor de p no teste exato para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *: P < 0,01. ANE: Atlântico Nordeste; EE1: Equatorial Leste 1; EE2: Equatorial Leste 2; ASE: Atlântico Sudeste; AS: Atlântico Sul; EW: Equatorial Oeste; ASW: Atlântico Sudoeste; ANW: Atlântico Noroeste; ISW: Sudoeste do Índico.

	N	Na	Ne	Ho	He	F _{IS}	EHW
<i>ANE</i>							
Asup06	55	9	3,94	0,64	0,75	0,15	0,83
Asup07	55	14	9,45	0,29	0,89	0,68	*
Asup08	48	5	2,71	0,31	0,63	0,51	*
Bth_27	56	5	2,27	0,32	0,56	0,43	*
<i>AS</i>							
Asup06	18	7	4,05	0,61	0,75	0,19	0,09
Asup07	17	11	7,51	0,35	0,87	0,59	*
Asup08	15	4	2,73	0,33	0,63	0,47	0,04
Bth_27	16	3	1,37	0,25	0,27	0,08	0,06
<i>ASE</i>							
Asup06	19	6	2,58	0,37	0,61	0,40	0,05
Asup07	16	8	4,88	0,31	0,80	0,61	*
Asup08	15	4	1,72	0,13	0,42	0,68	0,02
Bth_27	19	4	1,47	0,05	0,32	0,84	*
<i>ASW</i>							
Asup06	9	6	4,05	0,89	0,75	-0,18	0,72
Asup07	9	10	7,71	0,67	0,87	0,23	0,22
Asup08	9	3	2,42	0,56	0,59	0,05	0,51
Bth_27	9	4	1,60	0,22	0,38	0,41	0,16
<i>EE1</i>							
Asup06	23	9	4,46	0,87	0,78	-0,12	0,61
Asup07	22	11	8,27	0,18	0,88	0,79	*
Asup08	11	4	3,67	0,36	0,73	0,50	0,02
Bth_27	25	4	1,80	0,16	0,44	0,64	*
<i>EE2</i>							
Asup06	33	8	4,05	0,73	0,75	0,03	*
Asup07	33	13	9,55	0,21	0,90	0,76	*
Asup08	27	4	3,37	0,19	0,70	0,74	*
Bth_27	34	5	2,09	0,47	0,52	0,10	*
<i>EW</i>							
Asup06	23	7	3,30	0,48	0,70	0,31	*
Asup07	22	10	6,17	0,32	0,84	0,62	*
Asup08	18	4	2,76	0,50	0,64	0,22	0,26
Bth_27	27	4	1,89	0,37	0,47	0,21	*
<i>ANW</i>							
Asup06	6	5	3,60	0,50	0,72	0,31	0,31
Asup07	5	4	2,38	0,20	0,58	0,66	0,02
Asup08	5	3	2,78	0,00	0,64	1,00	0,02
Bth_27	5	2	1,47	0,00	0,32	1,00	0,03
<i>ISW</i>							
Asup06	10	6	4,65	0,90	0,79	-0,15	0,14
Asup07	9	8	7,04	0,11	0,86	0,87	*
Asup08	6	4	3,43	0,17	0,71	0,77	*
Bth_27	10	4	2,38	0,00	0,58	1,00	*

Microsatélites

Fragmentos de microsatélites de quatro loci polimórficos foram genotipados em amostras de 209 indivíduos. Valores relativos à diversidade genética, como heterozigosidade observada e esperada, bem como eventuais desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg variaram entre os loci e entre as populações analisadas (Tabela 7). Com relação à estruturação populacional, o valor global de F_{ST} (considerando todas as populações como um único grupo na AMOVA) encontrado foi 0,072 com p-valor $< 0,0001$ e os valores par a par estão relacionados na Tabela 5. Dentre os quatro cenários simulados na AMOVA, somente um apresentou índice de F_{CT} compatível com valores de estruturação entre grupos significativos, sendo assim considerados três grupos: Oeste (ANW, EW, ASW, AS), Leste (ANE, EE1, EE2, ASE) e Índico (ISW). Os valores gerados a partir da AMOVA podem ser visualizados na Tabela 6.

Discussão

Diversidade genética

Dentre os estudos já realizados utilizando a região controle do DNAmT em elasmobrânquios, a identificação de baixos índices de diversidade genética tem sido bastante comum (Schultz *et al.* 2008, Pereyra *et al.* 2010, Phillips *et al.* 2011, Karl *et al.* 2011, Portnoy *et al.* 2014, Andreotti *et al.* 2016, Camargo *et al.* 2016). Considerando as outras duas espécies da família Alopiidae, *Alopias superciliosus* apresentou a menor diversidade genética em um estudo anterior quando se utilizou a região controle do DNA mitocondrial como marcador (Trejo 2005). O valor de diversidade haplotípica encontrado para esta espécie no Oceano Índico por este autor foi mais alto, no único estudo já realizado da diversidade genética para a espécie quando comparado ao valor encontrado no presente estudo. Apesar desta diferença, a amostragem nos dois estudos foi pequena, o que impede uma discussão robusta acerca da

diversidade genética desta espécie na região. Por outro lado, considerando apenas o Oceano Atlântico, os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica encontrados no presente estudo foram maiores que os encontrados no estudo de Trejo (2005), no qual os 17 indivíduos analisados compartilharam o mesmo haplótipo. A amostragem no presente estudo foi maior e mais abrangente, sendo possível identificar haplótipos raros que garantiram uma maior variabilidade genética do que a encontrada naquele estudo. No presente estudo, além de os valores de diversidade nucleotídica serem baixos, o valor de diversidade haplotípica encontrado está entre os menores já registrados para este marcador entre elasmobrânquios (Schultz *et al.* 2008, Karl *et al.* 2012).

Nas análises utilizando marcadores do tipo microssatélite, os valores de diversidade genética não foram excepcionalmente baixos como aqueles encontrados com marcador mitocondrial. O número de alelos variou entre 2 e 14, mas a média foi de 12 alelos. Com exceção das populações ANW e ANW, as demais populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg com relação pelo menos a um *locus*. De um total de 18 valores significativos que demonstram este desequilíbrio, 16 são decorrentes de um excesso do número de homocigotos observado em relação ao de heterocigotos. Em consequência disto, os valores de F_{IS} foram majoritariamente positivos, indicando a presença de endogamia na maioria das populações analisadas.

Aspectos populacionais e filogeográficos

Em estudo realizado em *Alopias pelagicus* utilizando-se sete *loci* de microssatélites e sequências do gene COI do DNA mitocondrial na análise de 351 indivíduos capturados em quatro pontos do Oceano Pacífico, Cardeñosa *et al.* 2014 identificaram uma forte estruturação entre as regiões oeste e leste deste oceano. Contudo, diferentemente do que ocorre com esta espécie, as análises realizadas no presente estudo utilizando DNA mitocondrial para avaliar uma possível estruturação populacional entre os vários grupos amostrais do tubarão *Alopias*

superciliosus, apenas valores negativos e estatisticamente não significativos foram identificados, apresentando-se como forte indicativo da ausência de estruturação populacional da espécie no Oceano Atlântico. Neste sentido, estudos com espécies de teleósteos oceânicos altamente migratórios como *Thunnus obesus* (Martínez *et al.* 2006), *Makaira nigricans* (McDowell *et al.* 2007) e *Tetrapturus albidus* (Graves & McDowell 2006), também revelaram ausência de estruturação na bacia oceânica do Atlântico. Do mesmo modo, espécies pelágicas de elasmobrânquios também demonstraram a ocorrência de estruturação populacional fraca ou ausente nesta região, como em *Cetorhinus maximus* (Hoelzel *et al.* 2006) e *Pseudocarcharias kamoharai* (Silva Ferrette *et al.* 2015). Assim, parece tornar-se comum a observação de não são identificadas barreiras que atuem para o estabelecimento de estruturação genético-populacional no Oceano Atlântico entre algumas espécies pelágicas oceânicas de alguns peixes teleósteos e tubarões com capacidade de migrar longas distâncias (Dudgeon *et al.* 2012, Graves & McDowell 2003).

Diferentemente do marcador mitocondrial, as análises utilizando marcadores microsatélites demonstram que atualmente ocorre estruturação populacional significativa entre algumas populações de *A. superciliosus* analisadas no presente estudo, com um valor de F_{ST} global de 0,072 (p-valor < 0,001). As análises de F_{ST} par a par utilizando marcadores nucleares demonstraram estruturação em diferentes níveis, principalmente no Atlântico Sul. Excluindo-se as populações com número amostral reduzido (ANW, ISW, e ASW), não foi observada estruturação entre EW e AS, mas uma forte estruturação foi encontrada entre estas duas populações e as demais, com valores altos variando entre 0,142 e 0,293. A população ASE apresentou estruturação quando comparada com todas as populações, porém quando comparada com ANE, EE1 e EE2 revelou valor do índice de fixação que não ultrapassou 0,063. A partir destes resultados, é possível sugerir que não há barreiras que impeçam o fluxo gênico entre os indivíduos coletados na região centro-nordeste do Atlântico (ANE, EE1 e

EE2), mas que haja restrições no fluxo entre estes e os indivíduos encontrados na região próxima ao sul do continente africano.

Em estudos com outras duas espécies pelágicas de elasmobrânquios que apresentam comportamento migratório, também foi verificada a ausência de panmixia. Populações diferenciadas foram observadas no tubarão branco, com estruturação populacional significativa entre as regiões noroeste do Oceano Atlântico e África do Sul, além de três clados genéticos em um contexto global (O’Leary *et al.* 2015, Andreotti *et al.* 2016). Para o tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus*, foi identificada a ocorrência de estruturação populacional moderada entre populações capturadas nas regiões leste e oeste do Oceano Atlântico (Camargo *et al.* 2016). Já *C. longimanus* possui alta capacidade migratória e uma distribuição semelhante a de *A. superciliosus* (Compagno 1884, Compagno 2001). O resultado obtido no presente estudo é semelhante ao encontrado para *C. longimanus*, com diferenciação entre os indivíduos das regiões leste e do oeste do Atlântico Sul. Porém, para o galha-branca os autores atribuíram a estruturação identificada como um possível efeito do comportamento de filopatria de fêmeas nesta espécie, já que os resultados são baseados exclusivamente na análise do DNA mitocondrial (Camargo *et al.* 2016). Neste sentido, a ausência de estruturação encontrada para *Alopias superciliosus* utilizando DNA mitocondrial parece inviabilizar a indicação de um comportamento filopátrico para explicar a existência de estruturação populacional. Tendo o tubarão-raposa a capacidade de migrar longas distâncias, com um deslocamento de 1.125 km registrado em 27 dias (Weng & Block 2004), a distância geográfica pode não ser uma barreira física que reduza o fluxo gênico. Porém, em estudo recente utilizando tagging para acessar os padrões de migração do tubarão-raposa, Coelho e colaboradores encontraram um valor de distância média de migração de 13 km/dia, sendo o deslocamento máximo de um indivíduo de 1.439,9 km em 122 dias. Foi verificado que o principal processo migratório da espécie ocorre no sentido vertical, quando os indivíduos

chegam a atingir 400m de profundidade durante o período diurno, subindo para cerca de 100m durante a noite (Coelho *et al.* 2015). Assim, em algumas regiões do Atlântico, o tubarão-raposa pode ter um comportamento de migração horizontal menos evidenciado, o que contribuiria para os altos índices de estruturação populacional encontrados no presente estudo.

Neste sentido, ainda que o marcador mitocondrial não tenha evidenciado a existência de estruturação populacional entre as amostras coletadas em diferentes regiões no Atlântico, as análises revelaram a existência de dois clados (Figura 5), com uma distância genética de $0,012 \pm 0,003$ entre eles. Um destes clados pode ser considerado raro, sendo representado por apenas 3,9% da população investigada e encontrado em amostras do Atlântico Nordeste, Equatorial Leste 1, Equatorial Leste 2, Atlântico Sudeste e Atlântico Sul (Figura 4). A presença de dois clados bem definidos ao longo do Oceano Atlântico também já foi identificada ocorrer em algumas espécies pelágicas com distribuição semelhante à do tubarão-raposa, como *Thunnus obesus* (Martínez *et al.* 2006) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro *et al.* 2008). Nos estudos com estas espécies, os autores constataam a existência de uma linhagem genética exclusiva do Oceano Atlântico e outra compartilhada com indivíduos encontrados no Indo-Pacífico, sendo proposto que a ressurgência de Benguela poderia ter isolado a população do Atlântico. Contudo, deve ser ressaltado que eventos esporádicos de aquecimento desta barreira poderia ter permitido um fluxo migratório unidirecional dos indivíduos da linhagem do Indo-Pacífico para a bacia do Atlântico (Martínez *et al.* 2006, Brendtro *et al.* 2008).

Numa análise global através do AMOVA envolvendo 64 indivíduos da espécie *A. superciliosus* não foi evidenciada a existência de estruturação, mas na comparação entre a população do Atlântico e todas as populações do Pacífico foi detectada uma estruturação através do Φ_{ST} par a par, sendo que o haplótipo único encontrado no Atlântico também foi compartilhado com parte dos indivíduos das populações do Pacífico, incluindo a população da

África do Sul (Trejo 2005). Similarmente, o Clado A identificado no presente estudo está distribuído ao longo de toda a área amostrada e abrange 96,1% dos indivíduos analisados. Ao agregar sequências da região controle do DNAmT de *A. superciliosus* capturados no Pacífico, próximos a Taiwan aos resultados apresentados no estudo de Chang *et al.* (2014), foi possível identificar que o indivíduos analisados pelos autores também pertencem ao Clado A (Figura 5). Assim, considera-se que presença majoritária e a baixa diversidade do Clado A no Oceano Atlântico poderiam decorrer de um efeito fundador, através de um processo de colonização a partir de um número pequeno de indivíduos. A ocorrência de uma segunda linhagem mitocondrial desta espécie na bacia Atlântica poderia, então, estar ligada a eventos recentes de migração. Como ocorre em *Thunnus obesus* e *Lepidocybium flavobrunneum*, é possível que uma segunda linhagem mitocondrial de *A. superciliosus* ocorra em simpatria no Indo-Pacífico e que indivíduos desta linhagem possam migrar esporadicamente em direção ao Atlântico (Martínez *et al.* 2006, Brendtro *et al.* 2008). Ao analisar os indivíduos coletados no sudoeste do Oceano Índico (ISW), verificou-se que são todos pertencentes à linhagem do Clado A. Porém não se pode descartar a existência de uma segunda linhagem no Oceano Índico, tendo em vista as limitações de amostragem da região.

Implicações para conservação

Os resultados obtidos na presente análise indicam que estratégias efetivas para o manejo e conservação do tubarão raposa *A. superciliosus* exigem colaboração e atenção tanto local quanto internacional. Uma estruturação populacional moderada foi identificada entre populações da região centro-sudoeste do Atlântico e das demais populações analisadas, formando no mínimo dois estoques populacionais distintos nesta bacia oceânica. Apesar da constatação da possível inexistência de barreiras ao fluxo gênico na região centro-nordeste do Oceano Atlântico, há a presença de uma linhagem simpátrica rara quase restrita a esta região. Seis dos sete indivíduos desta linhagem foram encontrados em pontos amostrais próximos, o

que evidencia uma região com maior variabilidade genética, a partir de dados mitocondriais. A espécie possui uma diversidade genética mitocondrial excepcionalmente baixa e poucas localidades onde podem ser encontrados indivíduos geneticamente mais heterogêneos. Estes locais merecem uma maior atenção nas estratégias de manejo e conservação da espécie, já que estas populações podem garantir a manutenção da diversidade genética no Oceano Atlântico.

Referências

- Ahonen H, Harcourt RG, Stow AJ. Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Molecular Ecology*. 2009;18(21): 4409-4421.
- Amorim A, Baum J, Cailliet GM, Clò S, Clarke SC, Fergusson I, Gonzalez M, Macias D, Mancini P, Mancusi C, Myers R, Reardon M, Trejo T, Vacchi M & Valenti SV. 2009. *Alopias superciliosus*. 2009. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Available at <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/161696/0>. Accessed 22 May 2016.
- Andreotti S, Heyden S, Henriques R, Rutzen M, Meÿer M, Oosthuizen H, Matthee CA. New insights into the evolutionary history of white sharks, *Carcharodon carcharias*. *Journal of Biogeography*. 2016;43(2): 328-339.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. 1999;16(1): 37-48.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA. Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. *Science*. 2003;299(5605): 389-392.
- Bremer JRA, Mejuto J, Greig TW, Ely B. Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1996;197(2): 295-310.

- Brendtro KS, McDowell JR, Graves JE. Population genetic structure of escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*). *Marine Biology*. 2008;155(1): 11-22.
- Camargo SM, Coelho R, Chapman D, Howey-Jordan L, Brooks EJ, Fernando D, Mendes NJ, Hazin FHV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F, Mendonça FF. (2016). Structure and Genetic Variability of the Oceanic Whitetip Shark, *Carcharhinus longimanus*, Determined Using Mitochondrial DNA. *PloS one*. 2016;11(5): e0155623. doi:10.1371/journal.pone.0155623
- Camhi MD, Valenti SV, Fordham SV, Fowler SL, Gibson C. The conservation status of pelagic sharks and rays: report of the IUCN shark specialist group pelagic shark red list workshop. IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group. Newbury, UK. x+ 78p; 2009.
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG, Hueter RE, Meekan MG, Motta PJ, Bowen BW, Karl SA. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* 2007;16(24): 5183-5192.
- Chang CH, Shao KT, Lin YS, Ho HC, Liao YC. The complete mitochondrial genome of the big-eye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Chondrichthyes, Alopiidae). *Mitochondrial DNA*. 2014;25(4): 290-292.
- Chen CT, Liu KM, Chang YC. Reproductive biology of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Lowe, 1839) (Chondrichthyes: Alopiidae), in the northwestern Pacific. *Ichthyological Research*. 1997;44(2-3): 227-235.
- Clarke CR, Karl SA, Horn RL, Bernard AM, Lea JS, Hazin FH, Prodöhl PA, Shivji MS. Global mitochondrial DNA phylogeography and population structure of the silky shark, *Carcharhinus falciformis*. *Marine Biology*. 2015;162(5): 945-955.
- Coelho R, Fernandez-Carvalho J, Lino PG, Santos MN. An overview of the hooking mortality of elasmobranchs caught in a swordfish pelagic longline fishery in the Atlantic Ocean. *Aquatic Living Resources*. 2012;25(04): 311-319.
- Coelho R, Fernandez-Carvalho J, Santos MN. Habitat use and diel vertical migration of bigeye thresher shark: Overlap with pelagic longline fishing gear. *Marine environmental research*. 2015;112: 91-99.

- Compagno LJ. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Vol. 2, No. 1. Food & Agriculture Org; 2001.
- Cortés E, Arocha F, Beerkircher L, Carvalho F, Domingo A, Heupel M, Holtzhausen H, Santos MN, Ribera M, Simpfendorfer C. Ecological risk assessment of pelagic sharks caught in Atlantic pelagic longline fisheries. *Aquatic Living Resources*. 2010;23(1): 25-34.
- Dudgeon CL, Blower DC, Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., Krück NC, Morgan AT, Tillet BJ, Ovenden JR. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology* 2012;80(5): 1789-1843.
- Dulvy NK, Baum JK, Clarke S, Compagno LJ, Cortes E, Domingo A, Fordham S, Fowler S, Francis MP, Gibson C, Martínez J, You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2008;18(5): 459-482.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004;32(5): 1792-1797.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131(2): 479-491.
- Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010;10(3): 564-567.
- Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993;133(3): 693-709.
- Fu YX. Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics*. 1996;144(2): 829-838.
- Graves JE, McDowell JR. Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. *Marine and Freshwater Research*. 2003;54(4): 287-298.
- Graves JE, McDowell JR. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. *Bulletin of Marine Science*. 2006;79(3): 469-482.

- Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters*. 2006;2(4): 639-642.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PD. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular ecology notes*. 2006;6(4): 998-1002.
- Jorgensen SJ, Reeb CA, Chapple TK, Anderson S, Perle C, Van Sommeran SR, Fritz-Cope C, Brown AC, Klimley AP, Block BA. Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2009. doi: 10.1098/rspb.2009.1155
- Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*. 2011;12(2): 371-382.
- Karl SA, Castro AL, Garla RC. Population genetics of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) in the western Atlantic. *Marine Biology*. 2012;159(3): 489-498.
- Keeney DB, Heist EJ. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*. 2006;15(12): 3669-3679.
- Kumar G, Kunal SP, Menezes MR, Meena RM. Single genetic stock of kawakawa *Euthynnus affinis* (Cantor, 1849) along the Indian coast inferred from sequence analyses of mitochondrial DNA D-loop region. *Conservation Genetics*. 2012;13(4): 1119-1131.
- Liu KM, Chiang PJ, Chen CT. Age and growth estimates of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus*, in northeastern Taiwan waters. *Fishery Bulletin*. 1998;96(3): 482-491.
- Lu CP, Chen CA, Hui CF, Tzeng TD, Yeh SY. Population genetic structure of the swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the Indian Ocean and West Pacific inferred from the complete DNA sequence of the mitochondrial control region. *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI*. 2006;45(2): 269.

- Martínez P, González EG, Castilho R, Zardoya R. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2006;39(2): 404-416.
- Mcdowell JR, Carlsson JE, Graves JE. Genetic analysis of blue marlin (*Makaira nigricans*) stock structure in the Atlantic Ocean. *Gulf and Caribbean Research*. 2007;19(2), 75-82.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. 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*. 2009;7(2): 213-216.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. Diversity and genetic population structure of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2013;23(6): 850-857.
- Nakano H, Matsunaga H, Okamoto H, Okazaki M. Acoustic tracking of bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* in the eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*. 2003;265: 255-261.
- O'Leary SJ, Feldheim KA, Fields AT, Natanson LJ, Wintner S, Hussey N, Shivji MS, Chapman DD. Genetic diversity of white sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northwest Atlantic and southern Africa. *Journal of Heredity*. 2015. doi: 10.1093/jhered/esv001
- Pereyra S, García G, Miller P, Oviedo S, Domingo A. Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). *Fisheries Research*. 2010;106(3): 468-473.
- Petersen SL, Honig MB, Ryan PG, Underhill LG, Compagno LJ. Pelagic shark bycatch in the tuna-and swordfish-directed longline fishery off southern Africa. *African Journal of Marine Science*. 2009;31(2): 215-225.
- Phillips NM, Chaplin JA, Morgan DL, Peverell SC. Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered *Pristis* sawfishes in Australian waters. *Marine Biology*. 2011;158(4): 903-915.

- Portnoy DS, McDowell JR, Heist EJ, Musick JA, Graves JE. World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular Ecology*. 2010;19(10): 1994-2010.
- Portnoy DS, Hollenbeck CM, Belcher CN, Driggers WB, Frazier BS, Gelsleichter J, Grubbs RD, Gold JR. Contemporary population structure and post-glacial genetic demography in a migratory marine species, the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. *Molecular Ecology*. 2014;23(22): 5480-5495.
- Rand DM, Kann LM. Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. In Woodruff RC, Thomson JN. *Mutation and Evolution*. Springer Netherlands; 1998. pp. 393-407.
- Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*. 1992;9(3): 552-569.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*. 2008;17(24): 5336-5348.
- Simpfendorfer C, Cortés E, Heupel M, Brooks E, Babcock E, Baum J, McAuley R, Dudley S, Stevens JD, Fordham S, Soldo A. An integrated approach to determining the risk of overexploitation for data-poor pelagic Atlantic sharks. Expert Working Group Report, ICCAT; 2008.
- Silva Ferrette, B. L., Mendonça, F. F., Coelho, R., de Oliveira, P. G. V., Hazin FHV, Romanov EV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F. High Connectivity of the Crocodile Shark between the Atlantic and Southwest Indian Oceans: Highlights for Conservation. *PloS one*. 2015;10(2): 1-10.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3): 585-595.
- Tajima F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 1996;143(3): 1457-1465.

- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*. 1993;10(3): 512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013; 30 2725-2729.
- Trejo T. Global phylogeography of thresher sharks (*Alopias* spp.) inferred from mitochondrial DNA control region sequences. Doctoral dissertation, California State University Monterey Bay. 2005.
- Vignaud TM, Maynard JA, Leblois R, Meekan MG, Vázquez-Juárez R, Ramírez-Macías D, Pierce SJ, Rowat D, Berumen ML, Beeravolu C, Baksay S, Planes S. Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. *Molecular ecology* 2014;23(10): 2590-2601.
- Waples RS. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*. 1998;89(5): 438-450.
- Weng KC, Block BA. Diel vertical migration of the bigeye thresher shark (*Alopias superciliosus*), a species possessing orbital retia mirabilia. *Fishery Bulletin*. 2004;102(1): 221-229.

4 Considerações finais

O tubarão-raposa *Alopias superciliosus* é uma espécie de ocorrência preferencial em águas oceânica abertas, naturalmente suscetível à pressão pesqueira por suas características de vida, o que tem determinado uma diminuição acelerada dos tamanhos populacionais; contudo, ainda são pouco expressivos estudos aprofundados sobre a espécie e pouco se sabe acerca da sua dinâmica populacional. Com a necessidade urgente de informações para auxiliar no manejo e conservação da espécie, o presente estudo acessou informações acerca da história evolutiva e estruturação populacional atual da espécie, desenvolvendo marcadores genéticos específicos que poderão facilitar a obtenção de dados moleculares de diversidade, parentesco e estrutura genético-populacional em estudos futuros.

A partir dos marcadores genéticos caracterizados, foi realizado o levantamento da variabilidade genética das populações a partir de amostras obtidas em localidades de diferentes oceanos. O presente estudo demonstrou que *Alopias superciliosus* possui valores de diversidade que estão entre os mais baixos em elasmobrânquios. A dinâmica populacional da espécie revelou-se incomum, tendo apresentado estruturação genética correspondente à localização geográfica nos resultados de análises utilizando marcadores nucleares e um cenário inverso quando um marcador mitocondrial é utilizado. Estes resultados mostram a complexidade da estrutura populacional do tubarão-raposa no oceano Atlântico e em parte do oceano Índico. No decorrer das análises foi identificada a presença de dois clados genéticos, sendo um deles encontrado somente no leste do oceano Atlântico, sendo correspondente a aproximadamente 4% dos indivíduos analisados.

Medidas efetivas para a conservação da espécie são necessárias e urgentes e este empreendimento depende de colaboração nacional e internacional devido à ampla distribuição da espécie. Neste sentido, além de gerar ferramentas para auxiliar na obtenção de mais

informações sobre a espécie e dados consistentes da sua estrutura populacional, o presente estudo trouxe informações também acerca da diversidade genética existente e acesso aos padrões da dinâmica populacional, que podem servir de subsídio para medidas práticas visando ao manejo adequado do tubarão-raposa nestes ambientes oceânicos.

5 Referências

- Amorim A, Baum J, Cailliet GM, Clò S, Clarke SC, Fergusson I, Gonzalez M, Macias D, Mancini P, Mancusi C, Myers R, Reardon M, Trejo T, Vacchi M & Valenti SV. *Alopias superciliosus*. 2009. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. [acesso em 2016 Jun 18]. Disponível em <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/161696/0>.
- Avice JC. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 2000.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Sauders NC. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1987; 18: 489-522.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA. Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science*. 2003; 299: 389-392.
- Bonfil R. Overview of world elasmobranch fisheries. Rome: FAO Fisheries Technical Paper; 1994.
- Bonfil R. “The purpose of stock assessment and the objectives of fisheries management.”, in: Musick JA, Bonfil R, Management techniques for elasmobranch fisheries. Rome: FAO Fisheries Technical Paper; 2005.
- Boomer JJ, Stow AJ. Rapid isolation of first set of polymorphic microsatellite *loci* from the Australian gummy shark, *Mustelus antarcticus* and their utility across divergent shark taxa. 2010; 2:393-395.
- Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 1979; 76(4): 1967-1971.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Brautigam, Fordham FS. Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission No 20; 1998.

- Castro JI, Woodley CM, Brudek RL. A preliminary evaluation of the status of shark species. FAO Fisheries Technical Paper. 1999; 380: 1-72.
- Chabot CL. Characterization of 11 microsatellite *loci* for brown smooth-hound, *Mustelus henlei* (Triakidae), discovered with next-generation sequencing. Conservation Genetics Resources. 2012; 4:23-25.
- Chabot CL, Nigenda S. Characterization of 13 microsatellite *loci* for the tope shark *Gelorhinus galeus*, discovered with next-generation sequencing and their utility for eastern Pacific smooth-hound sharks (*Mustelus*). Conservation Genetics Resources. 2011; 3:553-555.
- Chen CT, Liu KM, Chang YC. Reproductive biology of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Lowe, 1839) (Chondrichthyes: Alopiidae), in the northwestern Pacific. Ichthyological Research. 1997; 44(2-3): 227-235.
- Compagno L. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Vol. 2. Bullhead, mackerel, and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). No 1, Vol. 2. Rome: FAO Species Catalogue for Fishery Purposes; 2001.
- Daly-Engel TS, Seraphin KD, Holland KN, Coffey JP, Nance HA, Toonen RJ, Bowen BW. Global phylogeography with microsatellite analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). PLoS ONE. 2012; 7(1): e29986. doi:10.1371/journal.pone.0029986
- Dulvy NK, Baum JK, Clarke S, Compagno LJV, Cortés R, Domingo A, Fordham S, Fowler S, Francis MP, Gibson C, Martínez J, Musick JA, Soldo A, Stevens JD, Valenti S. You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 2008; 18(5): 459-482.
- Ferdig MT, Su XZ. Microsatellite Markers and Genetic Mapping in *Plasmodium falciparum*. Parasitology Today. 2000; 16:307-312.
- Grissi C, Reyes A, Pesole G, Saccone C. Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA. Molecular Biology and Evolution. 2000; 17(7): 1022-1031.

- Heist EJ. "Genetics: stock identification.", in: Musick JA, Bonfil R, Elasmobranch fisheries management techniques. Singapore: APEC Fisheries Working Group, IUCN; 2004.
- Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters* 2006; 2(4): 639-642.
- ICCAT. Recomendação 08-07. 2008. [acesso em 2015 Nov 04]. Disponível em <http://www.iccat.int/Documents/Recs/compendiopdf-e/2008-07-e.pdf>.
- Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*. 2011; 12: 371-382.
- Karl AS, Castro ALF, Garla RC. Population genetics of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) in the western Atlantic. *Marine Biology*. 2012; 159: 489-498.
- Keeney DB. Population genetics and phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). Carbondale (IL): Southern Illinois University; 2004.
- Kuusipalo L. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates niloticus* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*. 1999; 407: 141-148.
- Liu KM, Chiang PJ, Chen CT. Age and growth estimates of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus*, in northeastern Taiwan waters. *Fishery Bulletin*. 1998; 96:482-491.
- Melo CD, Oliveira AAD, Seerig A, Carvalho CD. Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2008; 32(4):220-224.
- MMA. Instrução Normativa Interministerial nº 5/2011. Diário Oficial da União nº 74, Ano CXLVIII, dia 18.04.2011. 2011; Sessão 1: página 60.
- Nakano H, Matsunaga H, Okamoto H, Okazaki M. Acoustic tracking of bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* in the eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*. 2003; 265: 255-261.

- O'Leary SJ, Feldheim KA, Fields AT, Natanson LJ, Wintner S, Hussey N, Shivji MS, Chapman DD. Genetic diversity of white sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northwest Atlantic and southern Africa. *Journal of Heredity*. 2015. doi: 10.1093/jhered/esv001
- Powell W, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparisons RFLP, RAPD, AFLP, and SSR markers for geroplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996; 2:238-255.
- Silva Ferrette, B. L., Mendonça, F. F., Coelho, R., de Oliveira, P. G. V., Hazin FHV, Romanov EV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F. High Connectivity of the Crocodile Shark between the Atlantic and Southwest Indian Oceans: Highlights for Conservation. *PloS one*. 2015;10(2): 1-10.
- Smith PJ, Jamieson A, Birley AJ. Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Int. Explor. Mer*. 1990; 47: 231-328.
- Smith SE, Rasmussen RC, Ramon DA, Cailliet GM. "The Biology and Ecology of Thresher Sharks (Alopiidae)", in: Camhi MD, Pikitch EA, Babcock, *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
- Soto JMR. Annotated systematic checklist and bibliography of the coastal and oceanic fauna of Brazil. *Mare Magnum*. 2001; 1(1): 51-120.
- Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (Chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*. 2000; 57: 476-494.
- Trejo, T. Global phylogeography of thresher sharks (*Alopias* spp.) inferred from mitochondrial DNA control region sequences (Doctoral dissertation, California State University Monterey Bay). 2005.
- Vignaud TM, Maynard JA, Leblois R, Meekan MG, Vázquez-Juárez R, Ramírez-Macías D, Pierce SJ, Rowat D, Berumen ML, Beeravolu C, Baksay S, Planes S. Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. *Molecular ecology* 2014;23(10): 2590-2601.

- Waples RS. Separating the wheat from the claff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*. 1998; 89(5): 438-450.
- Ward ED, Woodwark M, Skibinski DOF. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 1994; 44(2): 213-232.
- Zhao XP, Kochert G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*. 1993; 21:607-614.