Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu - IBB

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética

Tese de Doutorado

Delimitação de espécies da família Istiophoridae e de estoques genéticos do agulhão-vela *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico

Aluno: Bruno Lopes da Silva Ferrette

Orientador: Fernando Fernandes Mendonça

Co-Orientador: Fausto Foresti

Botucatu

2018

Bruno Lopes da Silva Ferrette

Delimitação de estoques genéticos do agulhão-vela *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Co-Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Ferrette, Bruno Lopes da Silva.
Delimitação de estoques genéticos do agulhão-vela Istiophorus platypterus no Oceano Atlântico / Bruno Lopes da Silva Ferrette. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Fernando Fernandes Mendonça
Coorientador: Fausto Foresti
Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Ecossistemas aquáticos. 3. Marcadores genéticos.

Palavras-chave: Delimitação de espécies; Delimitação de estoques genéticos; Istiophorus platypterus; Panmixia; Peixes-de-bico.

Bruno Lopes da Silva Ferrette

Delimitação de estoques genéticos do agulhão-vela *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Co-Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Comissão Examinadora:

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

Botucatu, _____ de _____ de 2018.

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a toda minha família, principalmente aos meus pais, Admir e Léa, e agradecer também a minha namorada, Mariana e toda sua família e aos meus queridos amigos pelo carinho, apoio e os bons momentos proporcionados ao longo de meu doutoramento e que foi essencial para este longo percurso.

Gostaria de agradecer também aos meus orientadores, os Professores Doutores Fernando Fernandes Mendonça e Fausto Foresti, primeiramente pela oportunidade de poder trabalhar em seu grupo e em segundo lugar, pela confiança em meu trabalho e também por proporcionar todas as condições necessárias para meu desenvolvimento pessoal, acadêmico e profissional. Sem sua amizade, orientação, confiança e conhecimento, nada deste trabalho seria possível.

Um agradecimento especial a todos os colaboradores do Comitê Permanente de Pesquisa e Estatística dos peixes-de-bico da Comissão Internacional para a Conservação dos Tunídeos do Atlântico, os professores Bruno L. Mourato do Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo; Freddy Arocha do Instituto Oceanográfico da Venezuela da Universidade do Oriente Venezuela; John Hoolihan do Cooperative Institute for Marine and Atmospheric Studies da Universidade de Miami; N'Guessan C. Diaha do Centre de Pesquisa Oceanográfica da Costa do Marfim; Fambaye N. Sow do Centro de Pesquisa Oceanográfica de Dakar-Thiaroye do Senegal; Rui Coelho do Instituto Português do Mar e Atmosfera; Fabio H. V. Hazin da Universidade Federal

Rural de Pernambuco e Alberto F. Amorim do Instituto de Pesca de São Paulo. Além de outros pesquisadores brasileiros que colaboraram para complementar a amostragem como os professores Fábio Porto-Foresti da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Carlos Egberto R. Junior do IBAMA e também ao Matheus M. Rotundo do Acervo Zoológico da Universidade Santa Cecília. A cooperação para a obtenção das amostras de agulhão-vela foi fundamental e possibilitou a realização do estudo.

Um agradecimento especial às equipes dos Laboratórios de Genética Pesqueira e Conservação (GenPesC) e Biologia e Genética de Peixes (LBPG) pela, amizade, suporte e aprendizado ao longo de minha trajetória acadêmica. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética da UNESP de Botucatu e também aos órgãos nacionais e estaduais de fomento, como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Epígrafe

“One, remember to look up at the stars and not down at your feet. Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life are empty without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.”

Stephen Hawking

Resumo

A atividade pesqueira desempenha um importante papel ambiental e socioeconômico, pois é fonte de renda e alimento para milhões de pessoas no mundo. Entretanto, falhas em sua gestão e lacunas nos dados biológicos para muitas espécies, tem resultado na sobreexplotação de seus estoques, o que pode impactar diversos ecossistemas marinhos. Neste contexto, os peixes-de-bico, grupo formado pelas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, são considerados valiosos recursos pesqueiros, porém ainda não há consenso sobre o número e a validade das espécies da família Istiophoridae e também há incertezas sobre a avaliação atual de seus estoques. Sendo assim, o objetivo deste estudo é o de delimitar as espécies da família Istiophoridae e os estoques genéticos do agulhão-vela *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico utilizando marcadores moleculares mitocondriais. Entre os resultados dos testes de delimitação de espécies, o número variou entre 6 e 12 táxons possíveis, dependendo do teste aplicado. Em relação a delimitação dos estoques genéticos de *I. platypterus* no Atlântico, assumindo-se apenas uma espécie no gênero *Istiophorus*, nossos resultados apontam a existência de alta diversidade genética, componde um único estoque genético no Atlântico (Φ_{ST}=0,01121, p=0,02438), apresentando um alto fluxo gênico. Porém, pela análise da rede de haplótipos e da inferência bayesiana observa-se a existência de diferentes linhagens mitocondriais simpátricas, que divergiram durante o Mioceno Superior e foram reaproximadas, interrompendo seu processo de especiação. Em tal contexto, o papel da genética é extremamente importante, pois a preservação destas linhagens é considerada crítica para a manutenção a longo prazo da atividade pesqueira sustentável. Os resultados deste estudo ainda mantêm a discussão sobre o status taxonômico dos peixes-de-bico, mas apresentam informações relevantes sobre a diversidade genética, estrutura genética populacional, conectividade e história demográfica de *I. platypterus*, apoiando o desenvolvimento de planos de gestão e manejo pesqueiros e a conservação da espécie no Oceano Atlântico.

Palavras-chave: Peixes-de-bico, *Istiophorus platypterus*, recursos pesqueiros, estoques genéticos, panmixia, diversidade genética, fluxo gênico, delimitação de espécies, estrutura genética populacional.

Abstract

Fishing activity plays an important environmental and socio-economic role, as it is a source of income and food for millions of people worldwide. Although, shortcomings in management and gaps in biological data for many species resulted in the overexploitation of their stocks, which may impact several marine ecosystems. In this context, billfishes, a group compounded by the Xiphiidae and Istiophoridae families, are considered valuable fish resources, but there is still no consensus on the number and validity of the species of Istiophoridae family and there are also uncertainties about the current fisheries stocks assessments. Thus, the main objectives of this study are to delimit the species of the Istiophoridae family and the genetic stocks of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the Atlantic Ocean using mitochondrial molecular markers. Among the species delimitation tests results, the number ranged from 6 to 12 possible taxa depending on the test applied. In order to determine the genetic stock of *I. platypterus* in the Atlantic Ocean, assuming only one species in the genus Istiophorus, our results point to the existence of high genetic diversity, comprising a single genetic stock in the Atlantic (Φ_{ST} = 0.01121, p = 0.02438), presenting a high gene flow. However, the analysis of the network of haplotypes and Bayesian inference shows the existence of different sympatric mitochondrial lines, which diverged during the Upper Miocene and were re-approximated, interrupting their speciation process. In this context, the role of Genetics is of great importance, as the preservation of these lineages is considered critical for the long-term maintenance of sustainable fishing activity. The results still maintain the discussion about the taxonomic status of billfishes, but display relevant information about the genetic diversity, genetic population structure, connectivity and demographic history of *I. platypterus*, supporting the development of management plans and conservation of the species in the Atlantic Ocean.

Keywords: Billfishes, *Istiophorus platypterus*, fishery resources, genetic stocks delimitation, panmixia, genetic diversity, gene flow, species delimitation, genetic population structure.

Sumário

1 Introdução 2
1.1 Aspectos Gerais da Atividade Pesqueira Mundial 2
1.2 Peixes-de-Bico (“Billfishes”) e Genética da Conservação 7
1.3 Delimitação molecular de espécies 17
1.4 Delimitação de estoques genéticos – estruturas populacionais e diversidade genética 19
1.5 DNA mitocondrial na conservação e gestão pesqueira 23
2 Objetivos 30
3 Material & Métodos 32
3.1 Amostragem 32
3.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA 33
3.3 Delimitação Molecular de Espécies 34
3.4 Estimativas de Diversidade Genética e Delimitação da Estruturação Populacional 37
3.5 Estimativas de Taxa de Migração e Tamanho Efetivo Populacional 38
3.6 Estimativas sobre a História Demográfica 38
4 Resultados 42
4.1 Delimitação de Espécies da Família Istiophoridae 42
4.2 Variabilidade Genética e Estruturação Populacional 44
4.3 Taxas de Migração e Tamanho Efetivo Populacional 46
4.4 Demografia Histórica 50
5 Discussão 57
5.1 Delimitação Molecular da família Istiophoridae 57
5.2 Variabilidade Genética e Delimitação de Estoques Pesqueiros 58
5.3 Demografia Histórica da espécie Istiophorus platypterus no Oceano Atlântico 60
6 Conclusão 65
7 Referências Bibliográficas 66

Lista de Siglas

+G - Categorias discreta da distribuição de probabilidade Gamma

+I – Proporção de Sítios Invariáveis

μ - Taxa de Mutação

12S rRNA – RNA ribossômico 12S

16S rRNA – RNA ribossômico 16S

ABGD - *Automatic Barcode Gap Discovery*

AICc - Critérios de Informação Akaike corrigido

AMOVA – Análise de Variância Molecular

BD - *Birth-Death*

BEAST – *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* software

BIC - Critérios de Informação Bayesiano

BIN - *Barcode Index Number*

BOLD - *Barcode Of Life Data System*

bPTP - implementação com valores de Suporte Bayesiano da versão original PTP

BRL - Brasil

BSP - *Bayesian Skyline Plot*

CIPRES – Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research

COI – Citocromo *c* oxidase subunidade I

COII - Citocromo *c* oxidase subunidade II

COIII - Citocromo *c* oxidase subunidade III

CS - *Constant Size*

CytB – Citocromo B

DAMBE - Data Analysis in Molecular Biology and Evolution Software

DD - Categorias de Espécies Ameaçadas da IUCN "Dados Deficientes"

D-loop – nome comum da Região Controladora do DNA Mitocondrial

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DT - Decision Theory Performance-Based Selection

dxy - É a média da distância genética entre os grupos X e Y

ESS - *Effective Sample Size*

ESUs - Unidades Evolutivas Significativas

FAO – (sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*) Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FishStat - É um aplicativo de computador baseado em Java, que fornece aos usuários acesso a uma variedade de conjuntos de dados estatísticos pesqueiros

FLO - Flórida

F_S – Teste de neutralidade F_S de Fu (1987)

F_{ST} – Índice de Fixação (F) de Wright

GenPesC - Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação da Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista

GMYC - *Generalized Mixed Yule-Coalescent*

GTR – modelo de substituição de nucleotídeos *General Time Reversible*

h - Número de haplótipos

Hd - Diversidade haplotípica

H_{IR} - Índice de Irregularidade de Harpending

HKY - modelo de substituição de nucleotídeos Hasegawa, Kishino & Yano (1985)

HPD - limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori

IATTC - *Inter-American Tropical Tuna Commission*

ICCAT - *International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*

IMar - Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista

IOTC - *Indian Ocean Tuna Commission*

IP - Instituto de Pesca do Estado de São Paulo

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ISC - *International Scientific Committee for Tuna and Tuna-like Species in the North Pacific Ocean*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

IVC - Costa do Marfim

L1 - Linhagem 1

L2 - Linhagem 2

LAGENPE - Laboratório de Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Bauru

LBGP - Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, Campus de Botucatu

LC - Categorias de Espécies Ameaçadas da IUCN "Menos Preocupante"

LIB - Libéria

M – Tamanho Efetivo Populacional multiplicado pela Taxa de Migração

m – Taxa de Migração

M – Taxa de Migração escalonada Por Migração

Ma – Milhares de Anos Atrás

MCMC – *Markov Chain Monte Carlo*

Mia - Milhões de Anos Atrás

MOTU - Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares

mPTP - *multi-rate Poisson Tree Processes*

mtDNA - DNA Mitocondrial

mtDNA CR – Região Controladora do DNA Mitocondrial

MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*

n - Número de indivíduos

N_e - Tamanho Efetivo da Populacional

N_e - Tamanho Efetivo Populacional

$N_e\tau$ - Produto do Tamanho Efetivo da Populacional (N_e) multiplicado pelo Tempo de Geração (τ)

Nm - Número de Migrantes por Geração

NT - Categorias de Espécies Ameaçadas da IUCN "Quase Ameaçada"

OTU - Unidades Taxonômicas Operacionais

P_b - Parâmetro *b* dos Modelos de Especiação

pb – Pares de Bases Nucleotídicas

PB - *Pure-Birth*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

P_{FS} - p-valor de F_S

P_{HIR} - p-valor H_{IR}

pInv - Valor da Proporção de Sítios Invariáveis

P_{R2} - p-valor R_2

P_{SSD} - p-valor da *SSD*

PTP - *Poisson Tree Processes*

$P_{\Phi ST}$ - p-valor do Índice F de Wright

R_2 – Teste de Neutralidade R_2 de Ramos-Orsins & Rozas (2002)

RFMOs - Organizações Regionais de Gestão das Pescas

RNA - Ácido Ribonucleico

rRNAs - RNAs ribossômicos

S - Número de sítios polimórficos

S/I - Sem identificação

SCRS - Comitê Permanente de Pesquisa e Estatística da ICCAT

SEN - Senegal

SSD - Soma dos Desvios de Qui-Quadrados

T - Tempo de Divergência entre as Linhagens

tRNAs - RNAs transportadores

TTOL - *Timetree: the timetree of life*

UNISANTA - Universidade Santa Cecília de Santos, SP

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*

VLZ - Venezuela

VU - Categorias de Espécies Ameaçadas da IUCN "Vulnerável"

WCPFC - *Western and Central Pacific Fisheries Commission*

XSEDE – Extreme Science and Engineering Discovery Environment

ZEEs – Zonas Econômicas Exclusivas

α – Valor de Gamma

θ - Tamanho da População

Θ – Tamanhos Populacionais Escalonados por Mutação

θ_0 - Tamanho da População antes da expansão

θ_1 - Tamanho da População após a expansão

π - Diversidade nucleotídica

τ - Tempo de Expansão em unidades de Tempo Mutacional

Φ_{ST} – Índice análogo ao F de Wright

Lista de Figuras

Figura 1. Dados Reconstruídos combinados com os dados oficiais reportados e as estimativas reconstruídas de dados não reportados, incluindo os descartes, com referência às ZEEs. Os dados oficiais reportados são extraídos principalmente do banco de dados FishStat da FAO http://www.fao.org/fishery/. A linha "Capturas Reportadas" sobreposta no gráfico de captura representa todas as capturas consideradas reportadas, incluindo estrangeiras e atribuídas a esta entidade espacial. Pauly & Zeller (2015). Sea Around Us concepts, design and data. http://www.seaaroundus.org/

Figura 2. Gráficos de avaliação do status dos estoques pesqueiros pela média tri-anual da biomassa capturada desde 1950. As categorias todas referem-se ao nível máximo de captura ou pós-pico em cada série: Desenvolvimento de capturas ≤ 50% do pico da série temporal; Explotados ≥ 50% das capturas de pico; Sobreexplotados entre 50% e 10% do pico; Colapsados, <10% do pico e Reconstrução, capturas entre 10% e 50% do pico. Pauly & Zeller, (2015). Sea Around Us. Concepts, Design and Data. http://www.seaaroundus.org/data/#/global/stock-status

Figura 3. Representação da biodiversidade de espécies da ordem Istiophoriformes. ©2018 The Billfish Foundation. https://billfish.org/education/what-are-billfish/

Figura 4. Captura Reportada de Peixes-de-bico por gênero e não identificadas entre 1950 a 2015. © FAO 2006-2018. http://www.fao.org/fishery/

Figura 5. Exemplar de agulhão-vela, *Istiophorus platypterus* (Shaw, 1792). http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T170338A6754507.en

Figura 6. Representação do genoma mitocondrial da espécie *Istiophorus platypterus*. Em verde, os genes mitocondriais, em azul os RNAs ribossômicos (rRNAs) e em laranja os RNAs transportadores (tRNAs). Imagem gerada com mtviz (http://pacosy.informatik.uni-leipzig.de/mtviz/) através de uma sequência de genoma mitocondrial do GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB470306.1).

Figura 7. Mapa da amostragem de agulhão-vela, *Istiophorus platypterus* coletadas para o estudo no Oceano Atlântico. FLO, Flórida; VLZ, Venezuela; BRL, Brasil; SEN, Senegal; LIB, Libéria, IVC, Costa do Marfim.

Figura 8. Delimitação de espécies da família Istiophoridae, cada coluna representa o número de possíveis espécies delimitadas pelos diferentes métodos. BIN, Barcode Index Number; ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery; mPTP, multi-rate Poisson Tree Processes; PTP, implementação original do teste PTP de máxima

verossimilhança; bPTP, implementação com valores de Suporte Bayesiano da versão original PTP; GMYC, Generalized Mixed Yule Coalescent utilizando diferentes modelos, PB, *Pure-Birth*; BD, *Birth-Death*; CS, Constant Size.

Figura 9. Rede de Haplótipos Median-Joinning da Região Controle do DNA Mitocondrial da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. Número indicam o número de passo mutacionais. Pontos negros, haplótipos hipotéticos não-amostrados.

Figura 10. Estimativa do número de migrantes por geração entre diferentes regiões do Atlântico. Os números no interior dos círculos representam o Tamanho Efetivo populacional (N_e). AS setas indicam o sentido da migração e o número de migrantes (*Nm*) por geração. Em azul, o grupo do Atlântico Central Oeste, em verde, Sudoeste Atlântico e em laranja, do Atlântico Central Leste.

Figura 11. Inferência Filogenética Bayesiana com idade dos nós em anos inferidos a partir de 669 pb de sequências de da região controle do mtDNA do *Istiophorus platypterus* distribuídos no Oceano Atlântico. L1: linhagem 1, L2: linhagem 2.

Figura 12. Rede de Haplótipos entre as linhagens mitocondriais. A esquerda, rede de haplótipos com o marcador COI. A direito, com o marcador CR mtDNA.

Figura 13. Mismatch Distributions do Oceano Atlântico. À esquerda, curva tri-modal do teste de Expansão Demográfica Súbita. À direita, curva tri-modal do teste de Expansão Espacial. Ambos os testes foram realizados com 1000 permutações.

Figura 14. Mismatch Distribution das linhagens mitocondriais. Mismatch Distributions do Oceano Atlântico. Acima, curva bimodal do teste de Expansão Demográfica Súbita. Abaixo, curva bimodal do teste de Expansão Espacial. Ambos os testes foram realizados com 1000 permutações. L1: linhagem 1, L2: linhagem 2.

Figura 15. Bayesian Skyline Plot (BSP) entre os grupos amostrais da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. O eixo x está em unidades de milhões anos atrás e o eixo y é igual a $N_e\tau$ (o produto do tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração). A linha sólida é a estimativa mediana e as linhas ao contorno mostram os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD).

Figura 16. Bayesian Skyline Plot (BSP) entre as linhagens mitocondriais da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. O eixo x está em unidades de milhões de anos antes e o eixo y é igual a $N_e\tau$ (o produto do tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração). A linha sólida é a estimativa mediana e as

linhas ao contorno mostram os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD). L1: Linhagem 1, L2: Linhagem 2.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estatísticas Populacionais. ***n***, número de indivíduos; ***S***, número de sítios polimórficos; ***h***, número de haplótipos; ***Hd***, diversidade haplotípica; ***π***, diversidade nucleotídica.

Tabela 2. Cenários hipotéticos da AMOVA. Φ_{ST}, Índice F de Wright; $P_{\Phi ST}$, p-valor do Índice F de Wright; FLO: Flórida; VZL: Venezuela; BRA: Brasil; SEN: Senegal; LIB: Libéria; IVC: Costa do Marfim.

Tabela 3. Comparação por pares dos valores de F_{ST} entre as regiões amostras no Oceano Atlântico abaixo da diagonal e p-valores acima da diagonal. (*p>0,05 após correção de Benjamini-Hochberg).

Tabela 4. Resultados do Migrate-n. Estimativas de Θ ($xN_e\mu$) e M (m/μ) entre os grupos amostrais. O intervalo de confiança (HDP) de 95% está indicado entre parênteses. As populações receptoras de migrantes são mostradas ao longo do lado esquerdo e as populações doadoras de migrantes são indicadas na parte superior.

Tabela 5. Cenários hipotéticos da AMOVA. Φ_{ST}, Índice F de Wright; $P_{\Phi ST}$, p-valor do Índice F de Wright. mtDNA, região controladora do DNA mitocondrial, COI, citocromo *c* oxidase subunidade I.

Tabela 6. Estatísticas Populacionais. n, número de indivíduos; S, número de sítios polimórficos; h, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; π, diversidade nucleotídica.

Tabela 7. Estimativas de Mismatch Distributions para 1000 permutações e dos Testes de Neutralidade para o *Istiophorus platypterus* entre as regiões amostradas no Oceano Atlântico. Parâmetros da Expansão Demográfica Pura: τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ_0 (tamanho da população antes da expansão) e θ_1 (tamanho da população após a expansão), *SSD* (Soma dos Desvios de Qui-Quadrados), P_{SSD} (*p*-valor da *SSD*), H_{IR} (Índice de Irregularidade de Harpending), P_{HIR} (*p*-valor H_{IR}). Parâmetros da Expansão Espacial: τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ (tamanho da população), M (2*Nm*, tamanho populacional multiplicado pela taxa de migração). Parâmetros dos Testes de Neutralidade: F_S (F_S de Fu), P_{FS} *p*-valor de F_S, *p*>0,02), R_2 (Teste de Neutralidade R_2 de Ramos-Orsins & Rozas), P_{R2} (*p*-valor R_2, p>0,05). Em negrito e * valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

Introdução

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais da Atividade Pesqueira Mundial

As primeiras evidências de uso humano dos recursos marinhos e dos habitats costeiros foi datada há cerca de 125 mil anos (Walter *et al.*, 2000; Erlandson *et al.*, 2001). Da pré-história aos tempos modernos, os humanos pescaram majoritariamente para subsistência. Ao longo do tempo, as economias costeiras evoluíram de uma escala local e de subsistência para uma globalizada e comercial. Com a Revolução Industrial, nos séculos XVIII e XIX, e o crescimento da população, as crescentes demandas globais por alimento impulsionaram o aprimoramento da tecnologia pesqueira, a fim de abastecer os mercados consumidores emergentes (Pitcher, 2012). No século XX, durante a década de 1960, houve um aumento considerável nas capturas pesqueiras, impulsionado pela transferência de tecnologias do pós-guerra para os barcos de pesca e pelo crescente aumento na demanda por proteína animal, sobretudo nos países em grande desenvolvimento e crescimento populacional. No entanto, os primeiros sinais da sobrepesca apareceram nas tendências de capturas globais durante a década de 1970, quadro se intensificaram durante as décadas de 1980 e 1990. Nas primeiras décadas do século XXI, a pesca se tornou uma atividade econômica globalizada (Pauly, 2008) com a pesca industrial e a aquicultura sendo as principais fontes de alimento e renda para cerca de 820 milhões de pessoas no mundo, sobretudo para as famílias de baixa renda (Dey *et al.*, 2005; FAO, 2016).

O comércio pesqueiro representa uma fonte significativa de ganhos em moeda estrangeira para muitos países em desenvolvimento. Estes países, cujas exportações representavam apenas 37% do comércio mundial em 1976, viram sua participação aumentar para 54% do valor total das exportações pesqueiras mundiais e 60% da quantidade em peso vivo até 2014 (FAO, 2016). Suas exportações de pescado foram avaliadas em US$ 80 bilhões e suas receitas de exportação (exportações menos importações) somaram US$ 42 bilhões. Estes valores são superiores às demais principais commodities agrícolas, como carne, tabaco, arroz e açúcar, mesmo quando combinadas. Desta forma, globalmente

o pescado fornece mais de 15% da proteína animal para um terço da população do planeta e são importantes fontes de micronutrientes essenciais, como cálcio, ferro, vitamina A e Zinco (Allison, 2011), o que contribui significativamente para a segurança alimentar e nutrição de uma população global que deverá atingir 9,7 bilhões de habitantes até 2050 e provavelmente mais de 11 bilhões até 2100 (Roser & Ortiz-Ospina, 2018).

A atividade pesqueira depende da captura de seus recursos, seja ela de pequena escala, industrial ou de subsistência. De certo modo, uma pescaria é definida pela quantidade e o tipo de sua espécie-alvo e seu valor econômico. A crescente demanda por pescado vem exigindo volumes de capturas cada vez maiores e que não podem ser ofertados somente pelos estoques nas Zonas Econômicas Exclusivas (ZEEs) de cada país. Sendo assim, atualmente, os mercados consumidores são abastecidos por peixes importados de países em desenvolvimento ou capturados nas ZEEs estrangeiras por diferentes frotas estrangeiras (Swartz *et al.*, 2010a,b; Pauly *et al.*, 2014).

Como consequência, as frotas industriais, pescam volumes cada vez maiores e em águas mais distantes de seu país de origem (Manach *et al.*, 2013; Pauly *et al.*, 2014). O pescado tornou-se uma commodity, mais comercializada do que consumida nos países onde é capturada (Alder & Sumaila, 2004). As pescarias de pequena escala, que empregam cerca de 90% da mão-de-obra envolvida na atividade pesqueira (FAO, 2016) e que tradicionalmente forneciam o pescado às comunidades costeiras e ao interior dos países em desenvolvimento (Belhabib *et al.*, 2015), agora competem com as frotas industriais sem o devido apoio e monitoramento de seus governos.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) é uma agência de cooperação internacional para eliminar a fome e funciona como um fórum neutro, no qual as nações participantes podem negociar acordos e debater políticas. A organização desempenha um papel fundamental na política pesqueira internacional e é responsável pela compilação e publicação da base de dados de capturas globais e no suporte a implementação de diretrizes internacionais sustentáveis relativas às operações de pesca, incluindo gerenciamento de capturas acidentais, relatórios de

avaliações de estoques pesqueiros, redução dos descartes, a eficiência da cadeia de abastecimento e no combate à pesca ilegal (FAO, 2018). De acordo com a agência, desde 2013, a produção de alimento pela aquicultura continental e marinha, superam a produção pela pesca extrativista mundial. Entretanto, a pesca extrativista marinha ainda é a modalidade que apresenta a maior produção isoladamente. Em 2015, a captura de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos atingiu 92,6 milhões de toneladas e, desta forma, a captura marinha representa 87,5% do total capturado com 81,2 milhões de toneladas, enquanto a captura continental reportou apenas 11,5 milhões de toneladas.

Entretanto, Pauly & Zeller (2016) apresentaram os resultados de uma abordagem chamada "reconstrução de capturas" (Pauly, 1998; Zeller *et al.*, 2007), a qual utiliza uma grande variedade de fontes de dados para estimar as capturas omitidas nos dados oficiais reportados à FAO. Eles concluíram que as capturas globais reconstruídas entre 1950 e 2010 foram 53% maiores em relação aos dados reportados e estão diminuindo de forma mais intensa. A trajetória das capturas reconstruídas difere substancialmente da reportada à FAO, as estatísticas reportadas sugerem que a partir de 1950, as capturas mundiais aumentaram de forma constante em torno de 86 milhões de toneladas em 1996, estagnaram e depois declinaram lentamente para cerca de 77 milhões de toneladas até 2010. Em contrapartida, as capturas reconstruídas alcançaram 130 milhões de toneladas em 1996 e apresentam um declínio três vezes maior em relação aos dados reportados à FAO (Fig. 1). Esse declínio reflete-se, em grande escala, na diminuição das capturas industriais e, em menor escala, na diminuição dos descartes. Os níveis de descarte representam entre 10% e 20% do total de capturas reconstruídas por ano até o ano 2000, após o qual os descartes representam menos de 10% das capturas anuais totais (Pauly & Zeller, 2016).

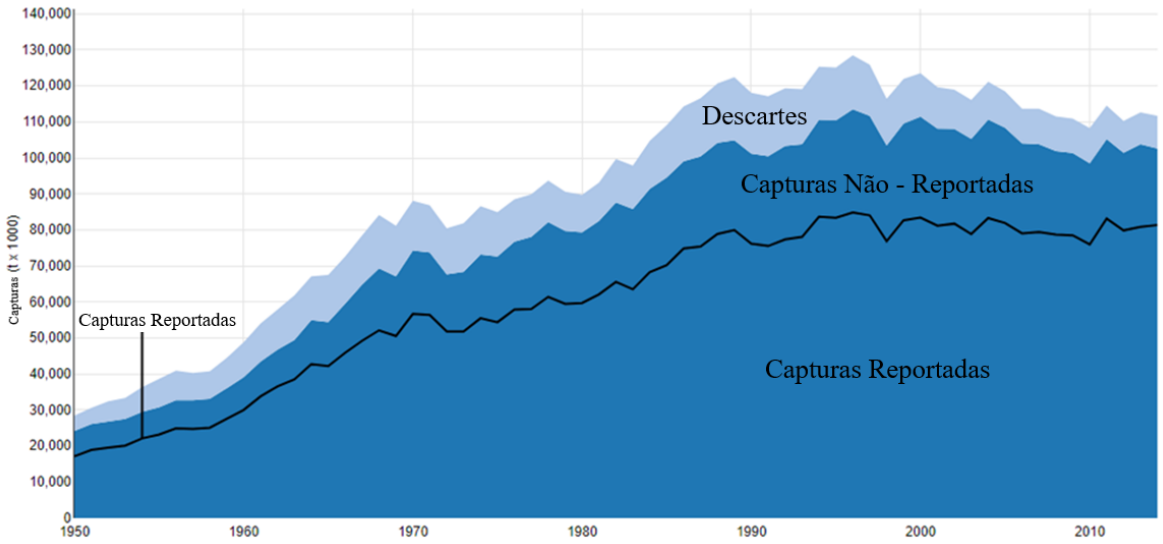

Figura 1. Dados Reconstruídos combinados com os dados oficiais reportados e as estimativas reconstruídas de dados não reportados, incluindo os descartes, com referência às ZEEs. Os dados oficiais reportados são extraídos principalmente do banco de dados FishStat da FAO http://www.fao.org/fishery/. A linha "Capturas Reportadas" sobreposta no gráfico de captura representa todas as capturas consideradas reportadas, incluindo estrangeiras e atribuídas a esta entidade espacial. Pauly & Zeller (2015). Sea Around Us concepts, design and data. http://www.seaaroundus.org/

A sobreexplotação impacta diretamente o ecossistema marinho, a segurança alimentar e as identidades culturais das comunidades costeiras (Garcia & Rosenberg, 2010; Costello *et al.*, 2012; Inniss *et al.*, 2016; FAO, 2016). Em seu estudo, Watson & Pauly (2001) demonstraram que os dados de captura subestimados de países em que há pescarias de grande escala, combinados com uma grande e muito variável captura de espécies, podem gerar estimativas tendenciosas e influenciar as decisões sobre investimentos e a gestão internacional da pesca. Estimativas recentes do atual status dos estoques marinhos (Pauly *et al.*, 1998; Worm *et al.*, 2009; Garcia & Rosenberg 2010; Anderson *et al.*, 2012; Costello *et al.*, 2012, 2016; Thorson *et al.*, 2012; FAO, 2016) evidenciam que a biomassa de muitos estoques está abaixo dos níveis biologicamente sustentáveis.

A porcentagem destes estoques dentro de níveis biologicamente sustentáveis diminuiu de 90% em 1974 para 68,6% em 2013. Desta maneira, estima-se que 31,4% dos estoques mundiais estejam explorados em níveis biologicamente insustentáveis. Da totalidade dos estoques pesqueiros avaliados

em 2013, 58,1% encontram totalmente explotados, enquanto 10,5% encontravam-se subutilizados. Consequentemente, a porcentagem de estoques pesqueiros biologicamente insustentáveis aumentou, nos anos 1980, de 10% em 1974 para 26% em 1989. Após os anos 1990, o número de estoques em níveis insustentáveis continuou a aumentar, embora de forma mais lenta para 31,4% em 2013 (FAO,2016). Em uma análise paralela, segundo a Sea Around Us, uma iniciativa privada entre pesquisadores, atualmente entre os estoques avaliados, 6,1% estão em reconstrução, 17,8% em desenvolvimento, 57,3% explotados, 17,1% sobreexplotados e 1,8% colapsados (Fig. 2).

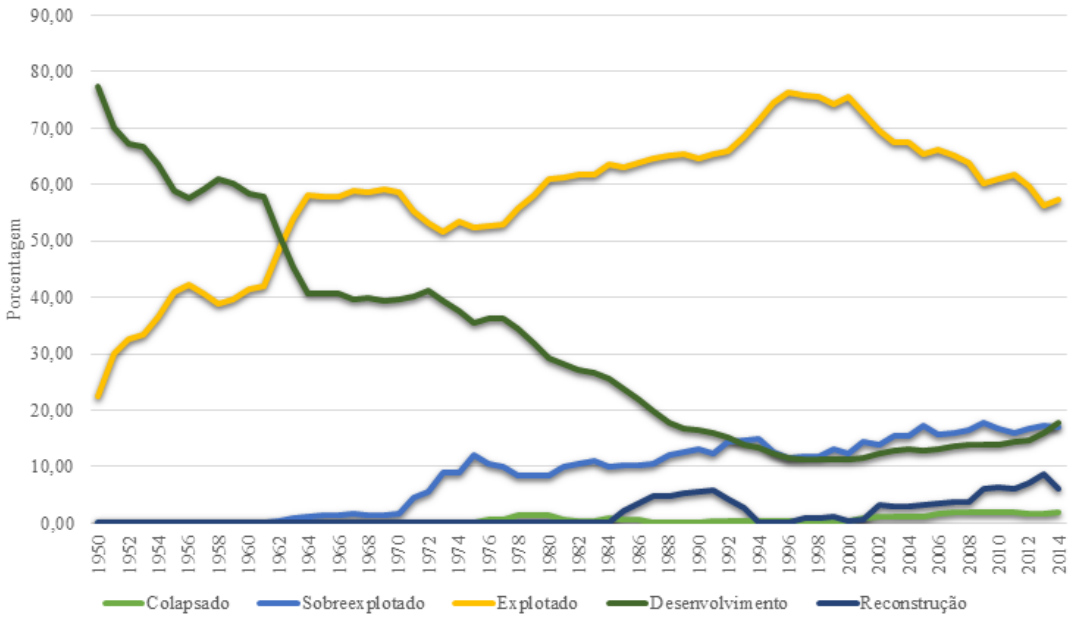

Figura 2. Gráficos de avaliação do status dos estoques pesqueiros pela média tri-anual da biomassa capturada desde 1950. As categorias todas referem-se ao nível máximo de captura ou pós-pico em cada série: Desenvolvimento de capturas ≤ 50% do pico da série temporal; Explotados ≥ 50% das capturas de pico; Sobreexplotados entre 50% e 10% do pico; Colapsados, <10% do pico e Reconstrução, capturas entre 10% e 50% do pico. Pauly & Zeller, (2015). Sea Around Us. Concepts, Design and Data. http://www.seaaroundus.org/data/#/global/stock-status

Estoques sobreexplotados são aqueles cuja a intensidade da captura de uma ou todas as faixas etárias da população são tão elevadas, que reduz sua biomassa, seu potencial reprodutivo e suas capturas, a níveis inferiores aos sustentáveis, o que resulta em mudanças que podem ser sutis a curto

prazo, como a redução da diversidade genética ou o aumento da endogamia, porém com graves consequências a longo prazo, como o colapso populacional dos estoques (Gascoigne & Lipcius, 2004) podendo erradicar importantes populações ou estoques genéticos, ocasionando a diminuição do potencial adaptativo da espécie explorada (Worm *et al.*, 2006; Castorani *et al.*, 2015).

Assim, o objetivo da delimitação de estoques é obter unidades de gestão que compreendam unidades biológicas significativas, melhorando assim os esforços na gestão de recursos (Abaunza *et al.*, 2008). Nesse contexto, o papel da genética é fundamental quando se trata da preservação de estoques locais que possuem diversidade adaptativa, o que é crítico para a manutenção a longo prazo da pesca sustentável.

1.2 Peixes-de-Bico ("Billfishes") e Genética da Conservação

Peixes-de-bico ("billfishes") é o termo utilizado para designar as espécies da ordem Istiophoriformes (Fig. 3) (Betancur-R *et al.*, 2013), que inclui, atualmente, 13 espécies de grandes peixes marinhos pertencentes as famílias Xiphiidae, representado por uma única espécie, o espadarte *Xiphias gladius* e Istiophoridae, representada por 5 gêneros e 12 espécies. Estes peixes são caracterizados pelo prolongamento da mandíbula superior muito além da mandíbula inferior em um longo rostro em forma de espada ou de lança (Gregory & Conrad, 1937; Nakamura, 1985; Fierstine & Voigt, 1996; Fierstine, 2006). Estas espécies possuem um registro fóssil muito rico. Três famílias encontram-se extintas, Hemingwayidae, Palaeorhynchidae e Blochiidae, com suas primeiras ocorrências datadas no Paleoceno há 56 milhões de anos atrás (Mia), Eoceno Inferior (53 Mia) e Mioceno Médio (40 Mia), respectivamente. A família Istiophoridae moderna data do Mioceno (23-5,5 Mia). A família Xiphiidae tem sua primeira datada no início do Eoceno (53 Mia), entretanto o gênero *Xiphias* é datado em 15 Mia (Fierstine, 2006).

Figura 3. Representação da biodiversidade de espécies da ordem Istiophoriformes. ©2018 The Billfish Foundation. https://billfish.org/education/what-are-billfish/

São peixes adaptados a uma vida em um ambiente pelágico, com numerosas características morfológicas que tornam sua locomoção mais eficiente, como por exemplo, apresentam corpo hidrodinâmico, as nadadeiras peitorais são voltadas para trás e têm grandes superfícies para sustentação, enquanto a cauda fornece forte impulso. Muitas dessas adaptações estão relacionadas a explosões de altas velocidades (Block *et al.*, 1992), colocando-os entre os peixes atuais mais velozes (Videler, 1993; Marras *et al.*, 2015). Algumas espécies são de grande porte e atingem tamanhos superiores a 3,5 metros de comprimento e 500 quilogramas (Santini & Sorenson, 2013), ocupando geralmente os topos das teias alimentares na maioria dos ecossistemas pelágicos tropicais e temperados (Cox *et al.*, 2002; Kitchell *et al.*, 2006).

Estas espécies são capturadas por pescarias multinacionais, por isso demandam gestão internacional transfronteiriça. Quatro Organizações Regionais de Gestão das Pescas (RFMOs), a

International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT), a Indian Ocean Tuna Commission (IOTC), a Inter-American Tropical Tuna Commission (IATTC), a Western and Central Pacific Fisheries Commission (WCPFC) e a International Scientific Committee for Tuna and Tuna-like Species in the North Pacific Ocean (ISC) assumem a liderança em termos de coordenação de pesquisas e avaliações de estoque, bem como de assessoria para a gestão destes recursos.

Somente em 2015, foram reportados à FAO, a captura de mais de 245 mil toneladas de peixes-de-bico em todo o mundo, que somadas exportações e importações, atingiram aproximadamente US$ 1,16 bilhões no mercado internacional. A espécie *Xiphias gladius* representa mais da metade das capturas do grupo, seguido pelas espécies dos gêneros *Makaira* e *Istiophorus*, que representam 16,7% e 14,7% das capturas, respectivamente. Há uma grande demanda por estas espécies impulsionada pelos altos preços de seus produtos no mercado internacional (Myers & Worm, 2003; Myers & Worm, 2005; Cullis-Suzuki & Pauly, 2010). Como as populações são exploradas por pescarias multinacionais, cuja regulamentação, de uma perspectiva geopolítica é extremamente difícil, sua avaliação e gestão são complexas e às vezes insuficientes (Cullis-Suzuki & Pauly, 2010). Além da pesca comercial, estas espécies são troféus muito cobiçados pela pesca esportiva, embora haja incerteza quanto à magnitude dos desembarques devido a não reportagem das capturas, há estimativas de que esta modalidade pesqueira represente menos de 2% do total de capturas (ICCAT, 2013).

Em relação ao seu status de conservação, a maioria dos peixes-de-bico encontram-se nos níveis mais baixos de ameaça de extinção na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), sendo as espécies *Xiphias gladius*, *Istiophorus platypterus*, *Tetrapterus belone* e *T. pfluegeri* listadas como "Menos Preocupante" (LC) e a espécie *Kajikia audax* encontra-se "Quase Ameaça" (NT), enquanto outras espécies como *Istiompax indica*, *Tetrapturus angustirostris* e *T. georgii* são classificadas como "Dados Deficientes" (DD). Porém, duas espécies, o marlim-branco *Kajikia albida* e o marlim-azul *Makaira nigricans* são classificados como "Vulneráveis" (VU) (IUCN, 2017).

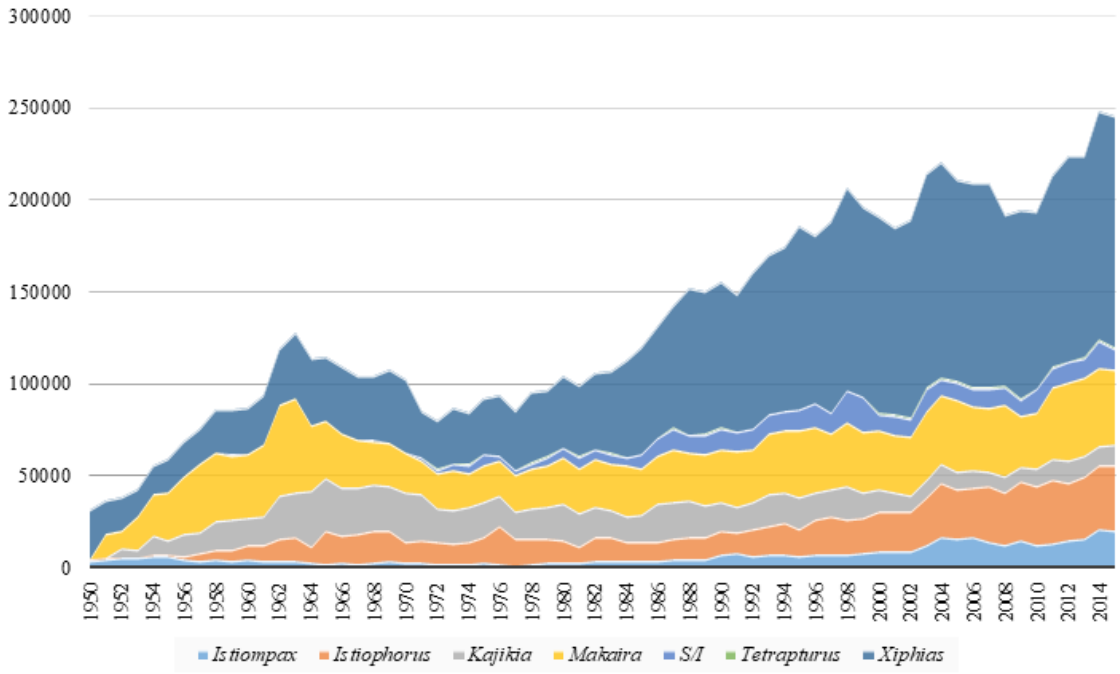

Figura 4. Captura Reportada de Peixes-de-bico por gênero e não identificadas entre 1950 a 2015. ©FAO 2006-2018. http://www.fao.org/fishery/. (S/I, sem identificação).

Desde a década de 1990, diferentes abordagens genéticas foram aplicadas à identificação dos peixes-de-bico (Chow, 1994; Innes *et al.*, 1998), o PCR-RFLP (McDowell & Graves, 2002; Hsieh *et al.*, 2005, 2007; Domingues *et al.*, 2015), o DNA Barcode (Hanner *et al.*, 2011) e, mais recentemente, técnicas, que provaram ser as mais eficientes, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e genômica em larga escala (Chuang *et al.*, 2017; McDowell *et al.*, 2018). Entretanto, é importante enfatizar, que quando o DNA Barcode sugere a existência de novas espécies, não é prova definitiva e os resultados devem ser utilizados em conjunto com outras características, que tornam a delimitação de novas espécie mais confiável (De Salle, 2006; Wiemers & Fiedler, 2007). O gene citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) deve ser combinado a outros genes independentes, além de dados morfológicos, geográficos ou ecológicos para se delimitar claramente as espécies, o que é chamado de taxonomia integrativa, uma abordagem taxonômica que visa incorporar os diversos tipos de dados e metodologias utilizados na Sistemática Biológica, para documentar a biodiversidade e os processos evolutivos que

promovem sua divergência (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; Ahrens *et al.*, 2007; Miller, 2007; Vogler & Monaghan, 2007; Wiens, 2007; Bond & Stockman, 2008; Giraud *et al.*, 2008; Dépraz *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2010; Goetze, 2010; O'Meara, 2010; Padial *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2010; Yeates *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos, devido ao seu alto interesse biológico, ecológico e comercial, diversos estudos genéticos foram realizados com o grupo. Em relação à sua filogenia, houve maior interesse nas relações evolutivas entre as famílias Istiophoridae e Xiphiidae e a subordem Scombroidei, a qual agrupa seis famílias de peixes com mais de 800 espécies, entre eles os atuns (Scombridae) e as barracudas (Sphyraenidae) (Johnson, 1986; Finnerty & Block, 1995). As relações filogenéticas dos peixes-de-bico foram exploradas em muitos estudos morfológicos e moleculares, com hipóteses muito diferentes entre si (Finnerty, 1995; Collette *et al.*, 2006; Orrell *et al.*, 2006). Entretanto, apesar de novas evidências morfológicas (Carpenter *et al.*, 1995; Johnson, 1986; van der Straten *et al.*, 2006) e maior disponibilidade de dados moleculares (Miya *et al.*, 2003), a história evolutiva dos peixes-de-bico permanece sem consenso.

Estudos morfológicos apoiam a inclusão de peixes-de-bico na subordem Scombroidei, mas tendem a discordar sobre as relações entre as subordens. Três hipóteses filogenéticas foram mais apoiadas por dados morfológicos: (i) os peixes-de-bico pertencem a Scombroidei e são um grupo irmão de Scombridae (Collette *et al.*, 1984), (ii) os peixes-de-bico constituem um subgrupo dentro da família Scombridae (Johnson, 1986; Carpenter *et al.*, 1995) e (iii) os peixes-de-bico não são Scombroidei e devem incluir uma subordem separada, Xiphoidei (Nakamura, 1983; Potthoff *et al.*, 1986; van der Straten *et al.*, 2006). Entretanto, as evidências morfológicas, até o momento, não identificaram quais táxons estão mais relacionados com os peixes-de-bico (Orrell *et al.*, 2006), mas apesar de análises filogenéticas não terem solucionado estas incertezas, elas apoiam por unanimidade a hipótese de que estas espécies devem compor uma ordem separada (Finnerty & Block, 1995; Collette *et al.*, 2006; Orrell *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2010; Santini & Sorenson, 2013).

Surpreendentemente, apesar da atenção à taxonomia dos níveis superiores dos peixes-de-bico, há ainda controvérsias quanto às relações dentro da família Istiophoridae. Há problemas taxonômicos em cada gênero (Collette *et al.*, 2006) e não há consenso sobre a validade e o número de espécies e nem sobre a delimitação de sua área de ocorrência (Graves & McDowell, 2003). Muitos aspectos do gerenciamento pesqueiro dependem, primeiramente, da identificação precisa dos organismos capturados para se manter registros precisos e detalhados sobre a quantidade e a biodiversidade capturadas, a fim de auxiliar na geração de estatísticas pesqueiras com maior precisão. Portanto, é necessário a identificação correta das espécies que ocorrem em um determinado ecossistema, pois são as unidades fundamentais para muitos campos de atuação da Biologia. Porém sua identificação e delimitação raramente são diretas ou perceptíveis (Herbert *et al.*, 2003a). Tal fato ocorre porque muitos grupos diversos são morfologicamente crípticos, contêm muitos táxons não descritos ou a literatura taxonômica existente é conflitante, uma questão chamada de "impedimento taxonômico" (Hoagland, 1996).

O gênero *Makaira*, atualmente é dividido em duas espécies *Makaira nigricans* e *M. mazara* (Nakamura, 1985), porém análises utilizando o Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) (Buonaccorsi *et al.*, 2001) indicam não haver divergência entre os indivíduos do Atlântico e os do Indo-Pacífico e, portanto, somente uma espécie. O gênero *Kajikia*, é atualmente dividido em duas espécies *K. albida* e *K. audax* e também não há consenso sobre a validade destes táxons (Graves, 1998; Graves & McDowell, 2003; Collette *et al.*, 2006; Hanner *et al.*, 2011). Dentre as linhas que postulam duas espécies estima-se que o gênero divergiu muito recentemente (Collette *et al.*, 2006) e assim, métodos mais tradicionais de identificação molecular seriam menos eficientes (Hanner *et al.*, 2011). Em estudos anteriores, mesmo com múltiplos marcadores genéticos, não foi possível definir a relação entre essas espécies (Graves, 1998; Collette *et al.*, 2006; Shivji *et al.*, 2006).

O gênero *Tetrapturus* é o mais incerto e, atualmente, existem quatro espécies aceitas, *T. georgii*, *T. pfluegeri*, *T. belone* e *T. angustirostris*. Embora *T. georgii* seja geneticamente a mais distinta das

quatro espécies do gênero (Hanner *et al.*, 2011), só foi recentemente confirmada como válida (Shivji *et al.*, 2006). *Tetrapturus pfluegeri* e *T. belone*, há até pouco tempo eram consideradas a mesma e com a descrição de *T. belone* efetuada por Robins & de Sylva (1963), constatou-se tratar de uma espécie estreitamente relacionada a *T. pfluegeri* (Collette *et al.*, 2006; Hanner *et al.*, 2011). McDowell *et al.* (2018) realizaram a avaliação molecular mais extensa sobre o gênero até o momento e relataram o nível substancial de similaridade genética entre as espécies e sugerem que métodos genômicos de alta resolução podem ser necessários para resolver inequivocamente a delimitação destas espécies.

Em relação a sua estruturação genética populacional, diferentes técnicas e marcadores moleculares foram utilizadas para investigar peixes-de-bico, com a maioria destas inferências resultando de estudos usando marcação convencional ou análises genéticas. Em uma revisão recente, Graves & McDowell (2015) compilaram os resultados de diferentes abordagens aplicadas a este grupo de peixes. Geralmente, esses estudos demonstraram níveis relativamente baixos de estruturação populacional, compatíveis com a alta capacidade de dispersão desses peixes em um ambiente epipelágico relativamente homogêneo.

Os trabalhos com a espécie *Makaira nigricans*, em estudos convencionais de marcação e recaptura demonstram que o *M. nigricans* é capaz de locomover-se por longas distâncias. Movimentos transoceânicos e transequatoriais foram documentados nos oceanos Pacífico e Atlântico e, inclusive, entre as bacias oceânicas (Ortiz *et al.*, 2003). As análises com marcadores nucleares e mitocondriais indicaram baixos valores, porém significativos, de estruturação entre as bacias oceânicas, que não forneceram evidência de estruturação dentro dos oceanos (Graves & McDowell, 2003; McDowell *et al.*, 2007; Sorenson *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

O marlim negro, *Istiompax indica*, é amplamente distribuído pelo Indo-Pacífico (Nakamura, 1985). É capaz de grande dispersão transequatorial, transoceânico e interoceânico (Ortiz *et al.*, 2003). Recentemente, Williams *et al.* (2016) encontraram também baixos valores de estruturação entre as bacias oceânicas, utilizando marcadores nucleares e mitocondriais. O marlim listrado, *Kajikia audax*,

é amplamente distribuído no Indo-Pacífico e ocasionalmente são encontrados no Atlântico Sudeste. Estudos convencionais de marcação (Ortiz *et al.*, 2003) demonstraram movimentos transequatoriais, mas movimentos transoceânicos completos não foram demonstrados. Em relação aos outros peixes de bico, *K. audax* exibe o maior grau de estruturação genética da população. Análises genéticas empregando marcadores moleculares nucleares e mitocondriais demonstraram heterogeneidade significativa entre diferentes locais amostrados no Oceano Pacífico (Graves & McDowell, 2003; McDowell & Graves, 2008; Purcell & Edmands, 2011).

O marlim branco, *Kajikia albida*, é distribuído por todo o Oceano Atlântico (Nakamura, 1985). Estudos convencionais de marcação (Ortiz *et al.*, 2003) demonstram movimentos transoceânicos, mas não houve movimentos transequatoriais. Em seu estudo, Graves & McDowell (2006), aplicando marcadores nucleares e mitocondriais, não encontraram nenhuma estruturação genética populacional dentro do Atlântico. Entre as espécies do gênero *Tetrapturus*, há pouca informação disponível sobre sua estrutura genética populacional. Embora, recentemente, *Tetrapturus georgii* foi avaliada através de marcadores nucleares e mitocondriais e também não foi encontrado nenhuma estruturação no Atlântico (Bernard *et al.*, 2014).

Entre estas espécies, o agulhão-vela, *Istiophorus platypterus* (Fig. 5), é uma das mais emblemáticas e facilmente reconhecíveis por suas nadadeiras dorsais, extremamente grandes e coloridas semelhantes às velas de embarcações a vento. Apresenta rápida taxa de crescimento, alcança tamanhos superiores a 3,4 metros de comprimento total e mais de 100 quilogramas (Nakamura, 1985). A espécie parece atingir tamanhos maiores no Indo-Pacífico (IGFA, 2011) e alcançar longevidade média de 13 anos. Chiang *et al.* (2004) estimaram idades de 12 anos para fêmeas e 11 anos para machos, sendo a maior idade já registrada de 17 anos (Ortiz *et al.*, 2003). As fêmeas geralmente atingem tamanhos e longevidade maiores em relação aos machos (Hoolihan, 2006; Collette *et al.*, 2011; Kar *et al.*, 2015) e além disso, a fecundidade aumenta acentuadamente com o tamanho da fêmea (Nakamura, 1985; Chiang *et al.*, 2006). A espécie atinge a maturidade sexual aos 2,5 anos (Prince *et*

al., 1986, Ortiz *et al.*, 2003), com tamanhos superiores a 1,5 m (Chiang *et al.*, 2006; Mourato *et al.*, 2009) tanto no Oceano Atlântico, quanto no Indo-Pacífico.

Figura 5. Exemplar de agulhão-vela, *Istiophorus platypterus* (Shaw, 1792).
http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T170338A6754507.en

O agulhão-vela *I. platypterus* é uma espécie epipelágica oceânica de distribuição circunglobal em águas tropicais e temperadas. A espécie tem maior preferência por águas quentes (>20°C), situam-se preferencialmente acima da termoclina (~25-50 m), mas realizam curtos mergulhos até regiões mesopelágicas (>200 m). A maior profundidade já registrada foi de 560 m (Lam *et al.*, 2016). Este comportamento também é observado em outras espécies de peixes-de-bico, que frequentemente realizam mergulhos verticais de curta duração, presumidos como associados ao forrageamento, controle térmico, evasão de predadores, remoção de parasitas ou como auxílio a orientação/navegação (Sims *et al.*, 2008; Bernal *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2011). Prince & Goodyear (2006) e Prince *et al.*, (2010) descreveram como a distribuição vertical do habitat do agulhão-vela e do marlim-azul no Atlântico e Indo-Pacífico estavam diretamente correlacionadas com a concentração do oxigênio

dissolvido e que as camadas hipóxicas podem formar barreiras aos movimentos verticais dessas espécies.

A espécie reúne-se em cardumes para maximizar as chances de capturar suas presas (Herbert-Read *et al.*, 2016) e em algumas regiões apresenta segregação espacial por tamanho (Tsai *et al.*, 2014). O *I. platypterus* aparenta ser um predador generalista, que se alimenta principalmente de peixes, cefalópodes e crustáceos pelágicos (Nakamura, 1985; Rosas-Alayola *et al.*, 2002; Arizmendi-Rodríguez *et al.*, 2006; Shimose *et al.*, 2010), em águas costeiras e oceânicas e, ocasionalmente, de presas mesopelágicas e demersais. As mudanças na composição em sua dieta parecem estar mais relacionadas à abundância e distribuição das presas do que às preferências alimentares (Rosas-Alayola *et al.*, 2002).

Para efeito de administração pesqueira, o agulhão-vela é dividido em cinco estoques no mundo: Atlântico Ocidental, Atlântico Oriental, Pacífico Oriental, Pacífico Central Ocidental e do Índico. Porém não há consenso sobre a delimitação real destes estoques nem sobre o atual status de conservação da espécie. No Oceano Atlântico, tanto o estoque oriental como o ocidental, podem ter sido reduzidos a tamanhos de estoque abaixo da Produção Máxima Sustentável, mas há incertezas consideráveis nestas análises. No Atlântico Ocidental, diferentes métodos de análises de dados sugeriram que o estoque no Atlântico Ocidental se encontra sobreexplotado e atualmente sofre com a sobreexplotação. No Atlântico Oriental, o quadro não é muito diferente, a maioria dos modelos examinados indicam que o estoque está sobreexplotado, mas seu verdadeiro status de sobrepesca ainda é incerto (ICCAT, 2016).

O *I. platypterus*, assim como o *M. nigricans*, tem distribuição circunglobal e a temporada reprodutiva ocorre por longos períodos em vastas regiões geográficas (Nakamura, 1985). Em contraste com os grandes deslocamentos observados para *M. nigricans*, os dados de marcação convencionais revelam uma menor dispersão de *I. platypterus*. Não foram observados movimentos transoceânicos ou transequatoriais para o agulhão-vela no Atlântico ou no Oceano Pacífico (Ortiz *et al.*, 2003).

Istiophorus platypterus, assim como *M. nigricans*, exibem uma baixa, porém significativa estruturação populacional entre o Atlântico e o Indo-Pacífico, com duas linhagens distintas ocorrendo no Atlântico, uma das quais também ocorre no Pacífico (Graves & McDowell, 2003). A presença de diferentes linhagens em ambos os oceanos sugere um fluxo gênico limitado ou isolamento geográfico recente.

Apesar de muitos aspectos da biologia da espécie ainda não serem totalmente compreendidos, *I. platypterus* está listada como de "Menos Preocupante" na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) das espécies ameaçadas de extinção pelo fato de ser amplamente distribuída em todos os oceanos, ser relativamente comum e não haver qualquer indicação de declínio generalizado (Collette *et al.*, 2011), ainda assim a espécie é captura por diversas artes de pesca em todo o mundo, tanto industrial quanto artesanal, e também é considerada um cobiçado troféu da pesca esportiva multimilionária (Erhart & Fitchett, 2006).

1.3 Delimitação molecular de espécies

Nos últimos anos, os métodos de identificação baseados em métodos morfológicos foram gradualmente integrados a métodos baseados no sequenciamento de DNA, como o DNA Barcode (Herbert *et al.*, 2003a), que consiste em um método taxonômico que utiliza um ou mais marcadores moleculares padronizados, como o citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) ou o gene mitocondrial ribossômico 16S, para se identificar um organismo como pertencente a uma determinada espécie. Através destes métodos, amostras de DNA desconhecidas são identificadas pela comparação entre as espécies registradas em uma plataforma integrada de bioinformática, que suporta uma biblioteca de referência validada, o Barcode Of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007).

A delimitação de espécies baseada na divergência genética entre as sequências de DNA tem sido bastante aplicada (Ratnasingham & Hebert, 2007; Schloss *et al.*, 2009). Porém, ainda muito

discutida por não ser sensível a processos evolutivos (Hickerson *et al.*, 2006; Nielsen & Matz, 2006), sendo necessários o uso de métodos mais recentemente validados (Fontaneto *et al.*, 2007). Duas novas formas de análises projetadas especificamente para dados do DNA Barcode, o Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD; Puillandre *et al.*, 2012) e o Barcode Index Number System (BIN; Ratnasingham & Hebert, 2013) tem sido aplicadas de forma bastante resolutiva.

Outros métodos, como o General Mixed Yule-coalescent (GMYC; Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013), aproveita os modelos de especiação de Yule (Yule, 1925) e a Teoria de Coalescência (Kingman, 1982) para calcular a solução de máxima verossimilhança para o ponto de transição entre os processos de especiação e coalescência em uma árvore ultramétrica. Enquanto o método Poisson Tree Processes (PTP, Zhang *et al.*, 2013), pode delimitar espécies usando filogenias não-ultramétricas. Essas abordagens fornecem limites objetivos, específicos para cada clado, com os quais delimitar unidades evolutivas significativas (ESUs) de diversidade, semelhante às espécies, conforme definido pelo Conceito de Espécies Evolutivas (Simpson, 1951). Esses métodos fornecem uma alternativa aos métodos de seleção de unidades taxonômicas operacionais (OTU), que dependem de um limite de similaridade de sequência arbitrário e específico do clado (Barraclough *et al.*, 2009).

A congruência entre os diferentes métodos pode dar suporte a robustez a quaisquer unidades taxonômicas operacionais molecular (MOTU) particulares devido as diferentes abordagens analíticas e bases teóricas envolvidas (Carstens *et al.*, 2013). Além disso, a comparação desses métodos ajuda a entender sua tendência para dividir ou combinar "clusters" de sequências (Ratnasingham & Hebert, 2013). Embora a delimitação de espécies seja um problema complexo (Hey *et al.*, 2003), os conceitos de espécies compartilham a ideia de que as espécies sejam linhagens de uma metapopulação de evolução independente (De Queiroz, 2007). Isso fornece uma justificativa para o uso de dados moleculares para o diagnóstico dessas linhagens, pois contêm o sinal dos processos históricos envolvidos em sua divergência (Nielsen & Wakeley, 2001). Entretanto, as linhagens identificadas desta maneira não atenderão necessariamente aos critérios de qualquer conceito de espécie, como

existir isolamento reprodutivo entre outras linhagens ou exibirão divergência morfológica, ecológica e/ou comportamental (Reid & Carstens, 2012).

Estas técnicas desenvolveram-se rapidamente devido à redução de custos e a maior disseminação na aplicação destas tecnologias (Wetterstrand, 2016), que associadas a necessidade de se abordar problemas críticos de conservação e manejo pesqueiros, as tornaram aplicáveis a diversas questões, como a identificação e delimitação de espécies, estrutura e avaliação do tamanho dos estoques pesqueiros, relações evolutivas entre as espécies, etc. (Dudgeon *et al.*, 2012). Para os gestores pesqueiros, os estoques ou as populações de peixes são a unidade biológica fundamental (Carvalho & Hauser, 1994; Waples & Gaggiotti, 2006; Reiss *et al.*, 2009), porém sua complexidade, muitas vezes dificulta sua delimitação (Dizon *et al.*, 1992), sendo necessário o explícito contexto e motivo pelo qual ele será definido. Em espécies marinhas de distribuição cosmopolita, a utilização de técnicas moleculares revelou que estas espécies eram, na verdade, grupos de espécies sem distinção morfológica evidente (Bickford *et al.*, 2007; Burton, 2009; Hellberg, 2009). Nestes casos, a sobrepesca pode levar a sobreexplotação dos estoques menores ou dos menos produtivos.

1.4 Delimitação de estoques genéticos – estruturas populacionais e diversidade genética

A estruturação populacional pode ser promovida por diversos fatores, incluindo limitada capacidade de dispersão, um ambiente heterogêneo ou fragmentado ou a presença de áreas de berçário, temporal e/ou espacialmente distintas. O ambiente epipelágico é relativamente homogêneo, caracterizado pela falta de barreiras físicas evidentes, grandes distâncias, as quais associadas à sua alta capacidade migratória, tendem a promover o fluxo gênico e a erosão da estrutura genética entre os estoques (Palumbi, 1994; Graves, 1998). Além disso, para a maioria das espécies é relatada que sua reprodução ocorra em regiões com ampla distribuição geográfica durante uma estação prolongada do ano (Nakamura, 1985). Desta maneira, espera-se que a ausência de barreiras ao fluxo gênico limite a

estruturação genética populacional e os processos de especiação (Graves & McDowell, 2003). Entretanto, é fundamental que esta suposição seja avaliada, já que mesmo baixos níveis de estruturação populacional podem ter importantes implicações para o manejo pesqueiro (Allendorf *et al.*, 1987) e podem existir diferenças significativas de estruturação interespecífica (Graves & McDowell, 2003).

Estudar a fauna oceânica envolve grandes desafios logísticos e tecnológicos, devido as enormes distâncias e grandes profundidades, as quais associadas aos complexos padrões de conectividade e dispersão entre as espécies e suas populações, dificultam a observação in situ dos organismos e de seus comportamentos (Antoniou & Magoulas, 2014). As características dos habitats de uma espécie como a presença de barreiras geográficas, como as grandes massas continentais ou ilhas oceânicas; correntes marinhas e os gradientes de temperatura, oxigenação e salinidade, podem formar barreiras a dispersão dos indivíduos e ocasionar seu isolamento com o possível surgimento de "populações locais", que apresentam características distintas da "população original" (Hellberg, 2009). Se isoladas por tempo suficiente, estas populações podem evoluir e se diversificar em unidades geneticamente distintas (Steneck & Wilson, 2010).

O conceito de "população" é fundamental para a delimitação de estoques genéticos, pois sua identificação envolve a caracterização de sua estrutura genética populacional e de seus padrões de conectividade genética e demográfica. Entretanto, assim como não há consenso sobre a definição do termo população (Waples & Gaggiotti, 2006; Queiroz, 2007), também não há para "estoque genético" e, com isso, existem inúmeras interpretações na literatura (Nielsen, 1995; Begg & Waldman 1999). As definições mais comuns para "população" são descrições qualitativas, como "um grupo de indivíduos da mesma espécie, que ocupam uma área geográfica por um determinado período" (Krebs, 1994). Estudos recentes, Beerli (2004) e Slatkin (2005) enfatizaram novamente o fato de que as interações com as populações não amostradas ("fantasmas"), podem afetar as estimativas de parâmetros-chave, como a taxa de migração, o tamanho efetivo populacional e a diversidade genética para as populações de interesse (Moritz, 1994; Waples, 1995; Crandall *et al.*, 2000; Allendorf *et al.*, 2004).

Consequentemente, por razões práticas e biológicas, as populações são as unidades de interesse para conservação e gestão de recursos naturais e populações naturais (McElhany *et al.*, 2000; Beissinger & McCullough, 2002) e a identificação das fronteiras entre as populações pode ter implicações para seu gerenciamento e até legais (Waples & Gaggiotti, 2006).

Fundamental para o gerenciamento sustentável é a relação entre os processos biológicos e as ações de gerenciamento. No entanto, os gestores precisam incluir uma variedade de fatores parcialmente conflitantes em sua estratégia de gerenciamento, como fatores biológicos, socioeconômicos e político-administrativos (Reiss *et al.*, 2009), que pode requerer a necessidade de cooperação internacional e uma governança transfronteiriça da pesca (Munro, 1990; Scholtens & Bavinck, 2014). Diversas espécies são compostas por populações heterogêneas e geograficamente estruturadas, por muitos fatores como sua área de distribuição, demografia, história de vida, fragmentação de habitats, mudanças climáticas e seu potencial de adaptação (Secor, 1999; Hilborn *et al.*, 2003; Kritzer & Sale, 2010). A delimitação de um estoque sem a consideração de todas essas características pode resultar em avaliações de estoques imprecisas, podendo levar os gestores a erros sobre os atributos dos estoques, como por exemplo, considerar a completa difusividade dos indivíduos ou subestimar os efeitos da mortalidade (Booth, 2000; Seijo *et al.*, 2004), depleções ou extinções de populações locais e, em última instância, um gerenciamento insustentável dos recursos (Gauldie, 1991; Stephenson, 1999; Laikre *et al.*, 2005).

Ao longo do tempo, a sofisticação tecnológica e a interdisciplinaridade levaram a uma maior compreensão dos processos biológicos e ambientais oceânicos e tem alterado a maneira como gerenciamos estes importantes recursos. Isso possibilitou novas abordagens para a identificação e a delimitação de estoques pesqueiros que, atualmente, tornou-se um componente fundamental em programas de gerenciamento pesqueiro implementados por instituições de pesquisa e agências governamentais (Cadrin *et al.*, 2014).

A conectividade é a ligação demográfica entre as populações através da dispersão entre elas, mesmo em diferentes estágios de desenvolvimento. Uma dispersão sucedida exige que os indivíduos se movam entre as populações e tornem-se incorporados com êxito na população receptora (Sale *et al.*, 2005). Por isso, populações marinhas são vistas como demograficamente abertas, com isolamento genético a longo prazo. Porém, as evidências sugerem o contrário (Swearer *et al.*, 2002). Nos últimos anos, informações genéticas têm contribuído a visão de que os dispersores sejam menos sucedidos através da aplicação de marcadores moleculares capazes de estimar empiricamente a intensidade do fluxo gênico entre populações (Hellberg *et al.*, 2002; Hellberg, 2009).

O fluxo gênico pode se referir a padrões contínuos de dispersão de indivíduos, que conectam diferentes populações. Isto é o que os ecologistas devem medir para avaliar a independência ou a interdependência demográfica entre as populações. Desta perspectiva, o fluxo gênico somente interessa se os níveis de dispersão contribuírem significativamente para a persistência das populações no ambiente. A dispersão de alguns estágios larvais pode homogeneizar as populações geneticamente, mas não conseguirão sozinhos restaurar os níveis de variabilidade genética de uma população fortemente explorada, sem outros subsídios demográficos (Hellberg, 2009). Por outro lado, os biólogos evolucionistas estão interessados nas trocas genéticas entre populações que podem ter sido isoladas por muitas gerações. O raro intercâmbio genético entre estas populações, demograficamente isoladas, ainda pode introduzir alelos externos, que podem disseminar mudanças adaptativas, alterar o processo de especiação e obscurecer nossa capacidade de discernir mudanças históricas no tamanho da população e inferir em sua conectividade (Hellberg, 2009).

O conhecimento pleno desta conectividade, seu padrão espaço-temporal e suas consequências estão longe de serem compreendidos para diversas espécies marinhas (Cowen *et al.*, 2006). A fim de se evitar que diferentes unidades populacionais de peixes sejam tratadas como uma única unidade de gestão (Waldman, 1999) ou vice-versa (Ying *et al.*, 2011), é aconselhável avaliá-las adequadamente com todas as ferramentas disponíveis (Antoniou & Magoulas, 2014).

1.5 DNA mitocondrial na conservação e gestão pesqueira

Devido aos avanços tecnológicos, maior acesso e a diminuição dos custos envolvidos no sequenciamento do DNA (Wetterstrand, 2013), a aplicação de técnicas moleculares tem sido amplamente utilizada e também refutado a hipótese generalizada de ausência de estruturação populacional em espécies com ovos e/ou larvas planctônicas, deste então, foram estabelecidos novos intervalos de distribuição geográfica para espécies, antes cosmopolitas, em áreas de distribuição menores, subdividindo-as em espécies diferentes (Colborn *et al.*, 2001; Borsa, 2002; Taylor & Hellberg, 2003; Klanten *et al.*, 2007; Martinez-Takeshita *et al.*, 2015).

A genética tem auxiliado a gestão pesqueira dos recursos naturais e também de populações naturais há mais de 80 anos. Mais recentemente, foram amplamente utilizadas para a conservação da biodiversidade, utilizada para a identificação de espécies (Herbert *et al.*, 2003; Teletchea, 2009; Ward *et al.*, 2009), delimitação de unidades de conservação (Moritz, 1994; Avise, 1998; Waples *et al.*, 2008; Roff, 2013), no manejo de populações cativas ou reproduzidas artificialmente (Frankham *et al.*, 2002; Chargé *et al.*, 2014; Willoughby *et al.*, 2015) e na delimitação de estoques pesqueiros (Carvalho & Hauser, 1994; Cano *et al.*, 2008; Montes *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2016).

As pescarias marinhas visam seu gerenciamento para manter seu rendimento máximo sustentável (Punt *et al.*, 2008) e concentram-se principalmente na biocomplexidade (Hilborn *et al.*, 2003) e na resiliência populacional (Walker & Salt, 2006), mantendo-se o rendimento dos recursos (Ihssen *et al.*, 1981; Gauldie, 1991; Begg & Waldman, 1999). Por outro lado, uma definição conservacionista tende a concentrar-se mais nas probabilidades de extinção de linhagens ou a perda de diversidade genética (Reiss *et al.*, 2009).

Um marcador molecular é um sítio em heterozigosidade ou alguma variação silenciosa no DNA e não associada a qualquer variação fenotípica mensurável. Tal locus de DNA, quando heterozigoto,

pode ser usado na análise de mapeamento, assim como em um par de alelos heterozigotos convencionais. Eles são utilizados como discriminadores de estoques genéticos, possibilitando inferir sobre estoques pesqueiros ideais, pois são independentes das mudanças ambientais durante o curso da vida de um indivíduo, de modo que as diferenças populacionais podem ser quantificadas. Entretanto, deve ser dada atenção às vantagens e limitações dos diferentes marcadores genéticos utilizados em relação aos seus atributos para evitar estimativas tendenciosas e fazer inferências sólidas sobre os estoques de peixes.

Dentre os diversos marcadores moleculares amplamente utilizados atualmente, propriedades biológicas e evolutivas do DNA mitocondrial (mtDNA) o tornam uma ferramenta popular para se investigar a estrutura populacional dos recursos marinhos em um contexto filogeográfico (Dizon *et al.*, 1992). Caracterizado por taxas de mutação relativamente altas, o mtDNA (Brown *et al.*, 1979) gera níveis elevados de polimorfismo e divergência (Avise, 2009; Hickerson *et al.*, 2010). Este aspecto, o torna particularmente informativo para a determinação da estrutura genética populacional e inferências sobre a história populacional de espécies, bem como para deduzir as relações filogenéticas entre espécies relacionadas. A elevada taxa mutacional é provavelmente consequência de alguns fatores, tais como o fato de o mtDNA codificar apenas alguns polipeptídios e não produzir as proteínas diretamente envolvidas em sua própria replicação, transcrição ou tradução. Desta forma, sua maquinaria de reparo é menos eficiente em relação ao DNA nuclear (nDNA) e gera continuamente novos haplótipos (Rand, 2001; Avise, 2009).

O mtDNA é uma molécula de DNA circular, de cadeia dupla, contida em múltiplas cópias nas mitocôndrias, organelas citoplasmáticas encontradas em quase todas as células eucarióticas dos Metazoa (Danovaro *et al.*, 2010). Nos Metazoa, é bastante conservado em termos de conteúdo de genes. Possui 13 genes que codificam proteínas, 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e uma região controle não-codificante, conhecida como “D-loop” em vertebrados. Os genes codificadores são traduzidos em

subunidades enzimáticas envolvidas no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa: 7 subunidades de nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase, 3 subunidades de citocromo *c* oxidase (COI, COII, COIII), 2 subunidades de adenosina trifosfato sintetase e o citocromo *b* (CytB). Os rRNAs e os tRNAs participam na tradução de proteínas em ribossomos mitocondriais. A região controle (D-loop) tem aproximadamente 1000 pares de bases (pb) e contém a origem da replicação do mtDNA. O tamanho do genoma mitocondrial pode variar notavelmente entre os principais grupos de metazoários e pode ser altamente variável mesmo dentro do mesmo grupo (Burger *et al.*, 2003; Gissi *et al.*, 2008, Bernt *et al.*, 2013) (Fig. 6).

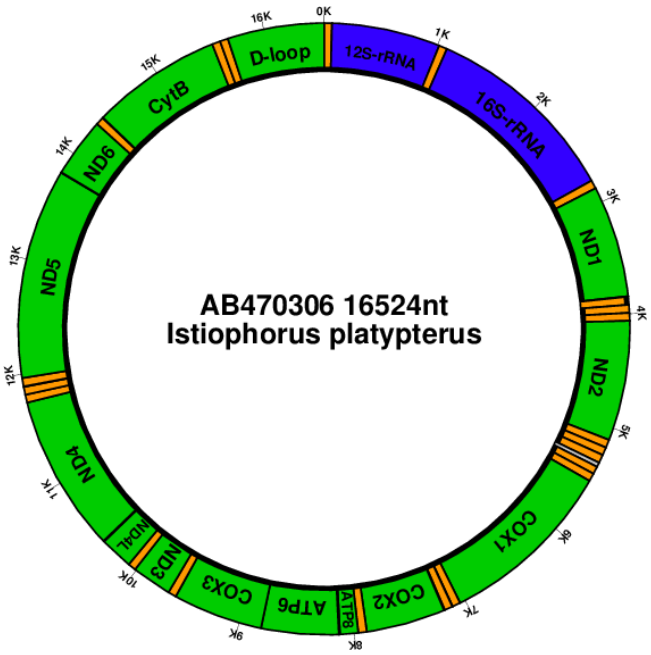

Figura 6. Representação do genoma mitocondrial da espécie *Istiophorus platypterus*. Em verde, os genes mitocondriais, em azul os RNAs ribossômicos (rRNAs) e em laranja os RNAs transportadores (tRNAs). Imagem gerada com mtviz (http://pacosy.informatik.uni-leipzig.de/mtviz/) através de uma sequência de genoma mitocondrial do GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB470306.1).

O mtDNA dos Metazoa é considerado como não-recombinante, ou seja, não há crossing-over, replica-se independentemente sem troca de material genético. Mesmo que a recombinação ocorra, geralmente não haverá um novo genótipo porque as moléculas recombinantes provavelmente serão as

mesmas devido a ocorrência homoplasmia, ou seja, todas as cópias do mtDNA são idênticas. Além disso, o mtDNA representa quase exclusivamente a herança materna. As mitocôndrias paternas, que por acaso, entram no zigoto durante a fertilização, são degradadas ou replicam-se pouco depois (Kaneda *et al.*, 1995). Apesar dos relatos de casos de herança mitocondrial paterna, a herança tipicamente materna e uniparental do mtDNA combinada com a falta de recombinação fornece uma janela para a estrutura genética das populações naturais de uma perspectiva do sexo feminino (Avise, 2012).

Geralmente, o mtDNA segue a Teoria Neutra da Evolução Molecular (Kimura, 1983), a qual sustenta que em nível molecular, a maioria das mudanças evolutivas e a maior parte da variação inter e intraespecífica não seja causada pela seleção natural, mas por deriva genética de haplótipos mutantes neutros. Uma mutação neutra é aquela que não afeta a capacidade do organismo de sobreviver e se reproduzir. A teoria neutra permite a possibilidade de que a maioria das mutações não seja prejudicial, mas afirma que, por serem rapidamente removidas pela seleção natural, elas não contribuem significativamente para a variação dentro e entre as espécies no nível molecular.

Outra vantagem do mtDNA, está no fato de ser a molécula mais eficaz para avaliar a variabilidade genética intraespecífica e sua genealogia. Um dos maiores desafios para conservação envolve as espécies que se reproduzem como populações distintas, mas migram para áreas de alimentação em comum, onde estas populações de origem mistas podem estar sujeitas a significativas taxas de mortalidade. A ideia básica por trás do uso do mtDNA para análise de estrutura de estoque é que amostras de indivíduos, retiradas de áreas diferentes ou da mesma área em períodos diferentes, pertencerem ao mesmo estoque, ou seja, conterão os mesmos tipos haplótipos em frequências semelhantes. Por outro lado, se forem encontradas diferenças substanciais na distribuição destes haplótipos, existe uma forte evidência de que estas amostras pertençam a diferentes unidades populacionais caracterizadas por um certo grau de isolamento genético (Antoniou & Magoulas, 2014).

Dada a necessidade de informações sobre a abundância de espécies oceânicas antes dos processos históricos de exploração, o mtDNA pode fornecer estimativas sobre o tamanho histórico da população, mesmo na ausência de amostras históricas. Como o Tamanho Efetivo Populacional (N_e) é reduzido no genoma herdado maternalmente, os genes do mtDNA se fixam mais rápido que os nucleares. Como resultado, após a especiação e através da deriva genética, o grau de agrupamento genético, a nível de espécie é observada mais cedo em árvores gênicas mitocondriais do que nas nucleares (Sunnucks, 2000), tornando o mtDNA uma ferramenta mais efetiva no diagnóstico de táxons (Avise, 2009).

O N_e interage com a taxa de migração (m), para determinar o grau de diferenciação entre as populações quantificando os efeitos do endocruzamento na subdivisão populacional, estimado pelo índice de fixação (F_{ST}) de Wright, que quantifica a diferenciação genética populacional (Wright, 1965). Para se examinar o nível total de divergência genética entre subpopulações, o índice F_{ST} é a estatística mais informativa atualmente. Embora o F_{ST} tenha um mínimo teórico de valor zero (indicando nenhuma divergência genética) e uma máximo teórico de um, o máximo observado geralmente é muito menor do um.

Wright (1978) sugeriu as seguintes orientações qualitativas para a interpretação do F_{ST}:

- A amplitude de 0 a 0,05 pode ser considerada indicativa de pequena diferenciação genética;
- A amplitude de 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética;
- A amplitude de 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética;
- Valores de F_{ST} acima de 0,25 indicam diferenciação genética muito grande.

Como grave consequência da sobreexplotação, as drásticas reduções populacionais, as quais reduzirão inevitavelmente o N_e, aumentam o risco de perda de variabilidade genética (Hauser *et al.*, 2002; Hoarau *et al.*, 2005). A diminuição da diversidade genética e das populações adaptadas localmente podem comprometer a estabilidade e o potencial de recuperação dos ecossistemas marinhos, além de prejudicar a sua capacidade de adaptação das espécies às mudanças ambientais e,

por conseguinte, à sua capacidade de fornecer alimentos para a população humana em crescimento (Worm *et al.*, 2006). A fim de manter estoques viáveis são necessárias políticas de gestão adequadas. Deste modo, os estudos genéticos de população de peixes marinhos assumiram um papel importante na tomada de decisões (Waples, 1998; Kenchington *et al.*, 2003; Knutsen *et al.*, 2003; Seeb *et al.*, 2007).

O objetivo principal da identificação e delimitação de estoques pesqueiros deve ser a obtenção de unidades de manejo que compreendam entidades biológicas significativas, melhorando assim a gestão dos recursos (Abaunza *et al.*, 2008). A preservação das populações locais, que possuem diversidade adaptativa é considerada crítica para a manutenção sustentável da pesca e dos ecossistemas marinhos. Desvendar a história filogeográfica de uma espécie através da avaliação da estrutura genética de suas populações é um fator chave para o estabelecimento de regulamentações de manejo apropriadas para os estoques pesqueiros (Antoniou & Magoulas, 2014). Deste modo, a Genética contribuiu e ainda tem muito a contribuir para o gerenciamento e a conservação dos recursos pesqueiros marinhos e sua aplicação gera planos de conservação e gerenciamento pesqueiros mais eficientes e sustentáveis.

Objetivos

2 Objetivos

O presente estudo busca delimitar o número de espécies da família Istiophoridae e os estoques genéticos pela estrutura genética populacional do agulhão-vela, *Istiophorus platypterus*, através do uso de marcadores moleculares. Considera-se que tais informações poderão contribuir para uma maior compreensão a respeito do fluxo gênico, diversidade genética, status de conservação e delimitação de estoques pesqueiros no Oceano Atlântico, viabilizando estratégias mais efetivas de manejo e exploração sustentável destas espécies.

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

- avaliar a delimitação genética entre as espécies dos cinco gêneros da família Istiophoridae
- quantificar a diversidade genética de *I. platypterus* no Oceano Atlântico;
- avaliar a ocorrência de estruturações populacionais no Oceano Atlântico, sobretudo entre os hemisférios norte e sul e suas porções leste e oeste;
- avaliar a demografia histórica, o fluxo gênico e as taxas de migração da espécie no Atlântico;
- propor uma hipótese filogeográfica para a espécie, estabelecendo as relações entre as populações de *I. platypterus*;

Material e Métodos

3 Material & Métodos

3.1 Amostragem

As amostras de DNA dos exemplares de agulhões-vela, *Istiophorus platypterus*, são provenientes de diferentes regiões do Oceano Atlântico, coletados próximas a Flórida, nos Estados Unidos da América no Golfo do México, Venezuela no Caribe, Sudeste do Brasil no Sudoeste Atlântico, e também no Senegal, Libéria e Costa do Marfim na África no Atlântico Equatorial Leste (Figura 7). Estas amostras foram coletadas por observadores de bordo, pesquisadores colaboradores e instituições, como os Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) e também da Universidade Santa Cecília (UNISANTA) de Santos, SP e do Instituto de Pesca (IP) do Estado de São Paulo, Brasil. Além de colaboradores internacionais do Comitê Permanente de Pesquisa e Estatística (SCRS) da Comissão Internacional para a Conservação dos Tunídeos do Atlântico (ICCAT) e o do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Alguns dos peixes amostrados são oriundos da pesca esportiva na região de Cabo Frio, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Todas as amostras foram preservadas em álcool etílico a 95% em temperatura de -20°C, armazenadas e registradas na coleção do Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação (GenPesC) do Instituto do Mar (IMar) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob licença permanente emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (Nº 50463-1).

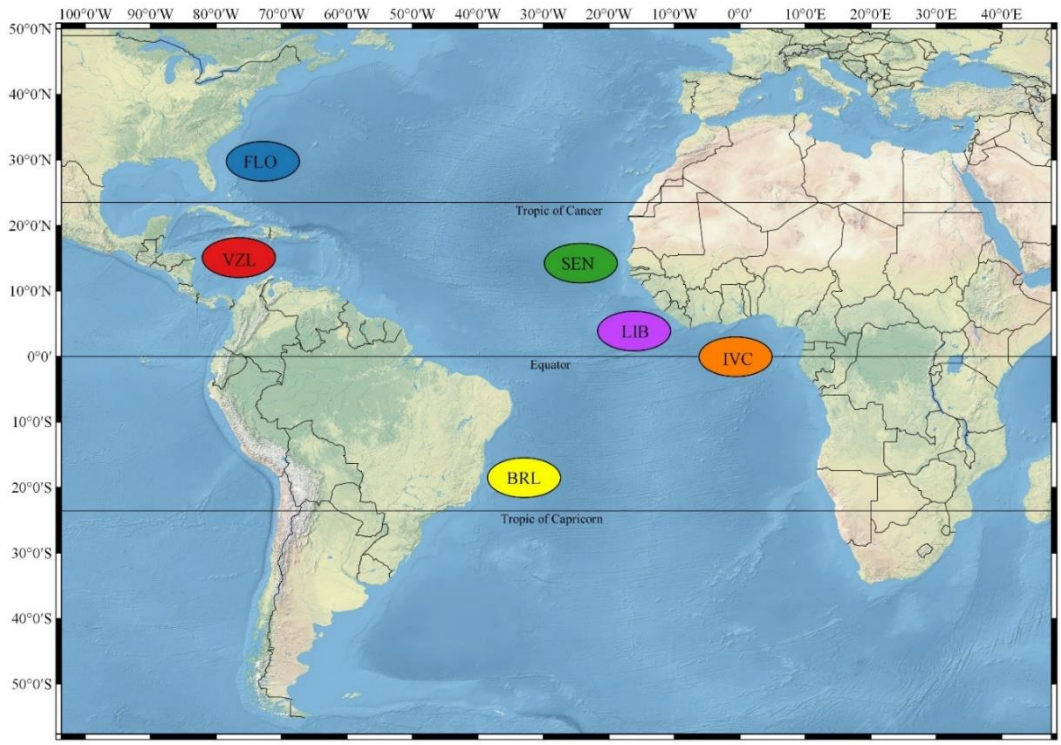

Figura 7. Mapa da amostragem de agulhão-vela, *Istiophorus platypterus* coletadas para o estudo no Oceano Atlântico. FLO, Flórida; VLZ, Venezuela; BRL, Brasil; SEN, Senegal; LIB, Libéria, IVC, Costa do Marfim.

3.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA genômico dos espécimes amostrados foi extraído através do kit NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.). As amplificações das sequências nucleotídicas do DNA mitocondrial (mtDNA) foram realizadas utilizando Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo os protocolos do kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) com: 2,0µL 10X PCR Buffer, 0,5µL $MgCl_2$ (50mM), 0,5µL dNTP mix (2mM), 0,4µL Primer mix (10mM), 0,1µL Platinum® Taq DNA Polymerase, 0,1µL DNA e completar o volume até 20µL ddH_2O autoclavada. As reações de PCR seguem o seguinte protocolo no termociclador: 1º: 94°C por 2 minutos para a denaturação da dupla fita de DNA, 2º: 35 ciclos de 94°C por 60 segundos de denaturação, 58°C por 45 segundos de anelamento dos primers (com variações mínimas para cada conjunto de primers) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos de extensão com uma extensão final de 10 minutos. Após o término da reação de PCR

as reações são armazenadas a uma temperatura de -20°C. A constatação da amplificação é realizada em gel de agarose a 1%, com o uso do corante para ácidos nucleicos Blue Green Loading Dye I (LCG Biotecnologia), visualizados sob luz ultravioleta.

Para o sequenciamento nucleotídico, os produtos de PCR foram primeiramente purificados em uma reação que utiliza duas enzimas em conjunto, uma exonuclease e uma fosfatase alcalina, seguindo o protocolo de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems™). Em seguida, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma PCR de sequenciamento, em termociclador, seguindo os protocolos do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™). As sequencias de DNA foram geradas na plataforma de sequenciamento automático ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da UNESP.

3.3 Delimitação Molecular de Espécies

Para a delimitação do número de espécies da família Istiophoridae, foram utilizadas sequências de DNA depositadas no Barcode of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007) do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), isolado e amplificado pelos primers Foward FishF1: 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' e Reverse FishR1: 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Ward *et al.*, 2005). As sequências contidas no Barcode Index Number (BIN) System (Ratnasingham & Hebert, 2013), *Istiompax* (BOLD:ACF5077), *Istiophorus* (BOLD:ABZ5149), *Kajikia* (BOLD:AAA6007), *Makaira* (BOLD:ABZ5150) e *Tetrapturus* (BOLD:AAA6941 e BOLD:ABZ7000) e como grupo externo foi utilizada uma sequência do BOLD da espécie *Xiphias gladius* (MFLE016-12).

As sequências do gene COI foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE 3.8.425 (Edgar, 2004) implementado pelo software Geneious R11.1.4 (Kearse *et al.*, 2012). A matriz de sequências foi

testada quanto à saturação de substituição de nucleotídeos (Xia *et al.*, 2003; Xia & Lemey, 2009) pelo software DAMBE6 (Xia, 2017). Para se determinar qual o melhor modelo de substituição de nucleotídeos melhor se adequa aos dados foi executado nas sequências alinhadas e avaliado usando os critérios de informação Bayesiano (BIC), de Akaike corrigido (AICc) e o Decision Theory (DT) Performance-Based Selection calculados pelo software jModelTest2 no XSEDE (Darriba *et al.*, 2012; Towns *et al.*, 2014) calculados utilizando o portal da web CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010, http://www.phylo.org).

Para a delimitação do número das Unidades Moleculares Operacionais Taxonômicas (MOTUs), que podem representar espécies crípticas potenciais dentro da família Istiophoridae, foram aplicadas duas abordagens em diferentes métodos: (i) um sistema que utiliza o Barcode Index Number (BIN) baseado na distância genética (Ratnasingham & Hebert, 2013), com o barcoding gap baseado nas distâncias genéticas usando o software Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012); (ii) duas abordagens filogenéticas atualizadas do método de Máxima Verossimilhança, Poison Tree Processor (PTP) (Zhang *et al.*, 2013), o método bPTP, que adiciona valores de suporte bayesiano (BS) as espécies delimitadas, conferindo maior confiança em sua delimitação e o método multi-rate PTP (mPTP) (Kapli *et al.*, 2017), que subtrai deficiências teóricas e técnicas do PTP e, por último, o modelo Generalized Mixed Yule-Coalescent (GMYC) (Pons *et al.*, 2006).

O método BIN é implementado como parte do Barcode Of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007; http://v4.boldsystems.org/), onde as sequências de DNA submetidas são comparadas em banco de dados. As sequências são agrupadas de acordo com sua divergência molecular usando algoritmos com o objetivo de encontrar descontinuidades entre os clusters. Cada cluster recebe um identificador exclusivo e específico, também conhecido como Barcode Index Number (BIN), cada um com registro único no BOLD.

O método ABGD utiliza a distância genética entre sequências de DNA Barcode e os BINs e foi implementado através do servidor http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html, sob os

parâmetros P_b = 0,001 a P_{MAX} = 0,009, etapas = 10, X (largura da faixa relativa) = 1,5, N_b boxes (para distribuição à distância) = 20 e com o modelo de evolução molecular Kimura 2-paramemter (K2P) (Kimura, 1980). Para essa análise, o grupo externo (*X. gladius*) foi excluído do arquivo de entrada. Com este método, as sequências são divididas em grupos de modo que a distância entre duas sequências de dois grupos diferentes seja sempre maior do que uma distância limiar dada (isto é, "Barcode Gap"). Todas as sequências foram sujeitas ao sistema BIN implementado pelo BOLD. Esta abordagem agrupa sequências algoritmicamente para calcular MOTUs, que são equivalentes de espécies neutras, livres de questões conceituais e descrições formais (Ratnasingham & Hebert, 2013).

Os métodos PTPs utilizam filogenias não-ultramétricas. Para a árvore de entrada, geramos a filogenia usando a máxima verossimilhança através do software RAxML-HPC2 8.2.10 no XSEDE (Stamatakis, 2014) através de 1000 interações de bootstraps, com o modelo "General Time Reversible" (Lanave *et al.*, 1984; Tavaré, 1986), GTR+I+G (*pInv*=0,56; α=0,65). As análises foram realizadas no servidor bPTP (http://species.h-its.org/ptp/) com 500.000 interações de "Markov Chain Monte Carlo" (MCMC) e 10% de burn-in, enquanto as análises do mPTP ocorreram no servidor mPTP (http://mptp.h-its.org/#/tree).

O GMYC é baseado na Teoria da Coalescência (Kingman, 1982) e é projetado para dados de locus único (Fujisawa & Barraclough, 2013). Embora possa ser usado com dados de loci concatenados (Pons *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007). O método modela separadamente o ajuste dos processos de especiação (Yule, 1925) e o modelo de coalescência neutra (Hudson, 1990) a uma árvore ultramétrica para definir a transição do nível de espécie para processos de nível populacional, utilizados para se delimitar MOTUs. A árvore ultramétrica, ou seja, as distâncias da raiz para cada extremidade da ramificação são iguais, como arquivo de entrada para a análise, foi calculada pelo software BEAST v1.8.4 no XSEDE (Drummond *et al.*, 2012). Foram utilizados dois esquemas de calibração, o "*Strict-Clock*" e o "*Uncorrelated Lognormal Relaxed Clock*", além de dois modelos de especiação, como o "*Pure-Birth*" (Yule, 1925; Gernhard, 2008) e o "*Birth-Death*" (Gernhard, 2008), empregando o

modelo de substituição de nucleotídeos GTR+I+G. A reconstrução de topologia bayesiana começou com uma UPGMA e o método de MCMC realizado por 500 milhões de gerações e 10% de burn-in. O software Tracer v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018) foi utilizado para verificar a convergência dos valores (ESS> 200). O software Tree Annotator v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) resume as informações de uma amostra de árvores produzidas pelo BEAST em uma única árvore de maior credibilidade. A análise de delimitação de espécies foi realizada no GMYC web server (http://species.h-its.org/gmyc/).

3.4 Estimativas de Diversidade Genética e Delimitação da Estruturação Populacional

A região controladora (CR) do mtDNA foi isolada e sequenciada utilizando os primers Foward Ipla-F: 5′-CCC TAA CTC CCA AAG CTA GGA-3' e Reverse Ipla-R: 5′-CCT GAT ATC CTG ATT ATG GTG GA-3' (Rubio-Castro *et al.*, 2016). As sequencias geradas foram alinhadas através do algoritmo MUSCLE 3.8.425 utilizando-se o software Geneious R11.1.4. Para as análises genético-populacionais foram calculadas a composição nucleotídica, o número de sítios polimórficos e de haplótipos, as diversidades haplotípica (*Hd*) e nucleotídica (π) pelo software DnaSP 6.11.01 (Rozas *et al.*, 2017). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi calculada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), que utiliza a estatística *F* de Wrigth (1951; 1965) com 50.000 permutações e $\alpha = 0,05$. O teste de Mantel para se avaliar o isolamento por distância também foi calculado pelo Arlequin v3.5.2.2 com 50.000 permutações, enquanto a matriz de distâncias geográficas foi calculada pelo software Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3 (Ersts, 2011). Com a finalidade de se evitar erros estatísticos do tipo 1, foi calculada a Taxa de Falsas Descobertas (FDR) através do método de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) no software Bonferroni Calculator (Lesack & Naugler, 2011). A rede haplotípica foi gerada pelo software PopART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizando o método Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999).

3.5 Estimativas de Taxa de Migração e Tamanho Efetivo Populacional

As taxas de divergência genética são afetadas pela conectividade e deriva genética. O software Migrate-n 3.6.11 no XSEDE (Beerli & Palczewski, 2010; Towns *et al.*, 2014) estima os tamanhos efetivos populacionais e as taxas de migração passadas entre *n* populações, assumindo um modelo com taxas de migração assimétricas e diferentes tamanhos populacionais através do modelo Felsenstein 84 (Felsenstein & Churchill, 1996). O fluxo gênico entre as populações foi estimado através da inferência bayesiana para estimar Θ, definido como $N_e\mu$ para o mtDNA, onde N_e é o tamanho efetivo populacional e μ é a taxa de mutação por geração e/ou sítio, enquanto M é definido como m/μ, onde m é a taxa de migração. O número de migrantes (Nm) por geração foi calculado por $Nm = \Theta.M$ (Beerli, 2005, 2009; Beerli & Palczewski, 2010). Os dados foram analisados com o Migrate-n usando uma longa cadeia para explorar 10 milhões de gerações com 10% de burn-in, registrados a cada 100 etapas e foram utilizadas 4 cadeias aquecidas paralelas de 1,0; 1,5; 3,0 e 1.000.000,0 graus de temperatura.

3.6 Estimativas sobre a História Demográfica

Para inferir sobre a demografia histórica da população atlântica do agulhão-vela foram utilizadas diferentes abordagens. As relações filogenéticas entre os haplótipos foram estimadas utilizando-se a Inferência Filogenética Bayesiana. A matriz da CR mtDNA foi testada quanto à saturação de substituição de nucleotídeos pelo software DAMBE6. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi avaliado pelo software jModelTest2.1.10 no XSEDE. Para se estimar o tempo de divergência entre as linhagens foi construída uma árvore utilizando o programa BEAST v1.8.4 no XSEDE sob o modelo HKY+I+G e o modelo "*Strict-Clock*" e uma árvore coalescente de tamanho constante. Segundo Drummond & Bouckaert (2015), um modelo "*Strict-Clock*" é geralmente preferido

em relação ao modelo "*Relaxed-Clock*" para avaliar a filogeografia intraespecífica. Este modelo gera uma probabilidade posterior para o tamanho efetivo da população feminina usando o método MCMC executado por 500 milhões de gerações com 10% de burn-in. Devido à falta de uma taxa de mutação relatada para a região controle para os peixes de bico, as estimativas de tempo molecular foram derivadas do Timetree: the timetree of life (TTOL) (Hedges *et al.*, 2006, 2015; Kumar *et al.*, 2017; http://www.timetree.org/). Os intervalos de confiança são baseados na Regra Empírica (95%) na estatística, que afirma que (supondo uma distribuição normal) aproximadamente 95% dos tempos relatados entre os estudos estarão dentro de dois desvios padrão do tempo médio. Um tempo de divergência para o gênero *Istiophorus* de 7,14 milhões de anos (3,64 - 10,64) (Miya *et al.*, 2013; Santini *et al.*, 2013). Após a datação do tempo de divergência (*T*) entre as linhagens é possível calcular a taxa de mutação (μ), através da fórmula $T = dxy / 2\mu$ (Nei, 1987), onde *dxy* é a divergência genética entre as linhagens, calculado pelo software MEGA7 utilizando 1000 bootstraps (Kumar *et al.*, 2016).

Para a análise "Mismatch Distribution" foram testados dois modelos, o de expansão demográfica súbita (Rogers & Harpending, 1992) e o de expansão espacial (Ray *et al.*, 2003). Populações em equilíbrio demográfico têm uma distribuição multimodal, enquanto a distribuição uni-modal é interpretada como expansão demográfica (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Para a validação, os resultados foram testados usando o índice de irregularidade de Harpending (H_{RI}) (Harpending, 1994) e a Soma dos Desvios de Qui-Quadrados (*SSD*) (Schneider & Excoffier, 1999) entre os valores observados e os esperados. Os *p*-valores foram baseados no número do *SSD*, calculado sob simulação como maior ou igual ao *SSD* observado. Os parâmetros demográficos τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ_0 (tamanho da população antes da expansão) e θ_1 (tamanho da população após a expansão) e o valor τ estimado foi usado para estimar o tempo de expansão nas gerações (*t*), usando a fórmula $t = \tau / 2\mu$ (Rogers & Harpending, 1992). Todos calculados pelo software Arlequin 3.5.2.2 utilizando 1000 permutações. Uma segunda abordagem para detectar o crescimento populacional foi baseada no R_2 (Ramos-Onsis & Rozas, 2002) foi realizada e significância

estatística testada com 50.000 simulações no processo coalescente implementado no DnaSP 6.11.01 e o teste F_S (Fu, 1997) implementado também com 50.000 permutações, mas implementado no Arlequin 3.5.2.2.

A construção de Bayesian Skyline Plots (BSP) (Drummond *et al.*, 2005) foi usado para inferir a flutuação dos tamanhos efetivos de população ao longo do tempo usando o software BEAST v1.8.4 no XSEDE. Este modelo gera uma probabilidade posterior para o tamanho efetivo da população usando o método MCMC executado por 300 milhões de gerações com 10% de burn-in. A seleção estatística dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos foi realizada por jModelTest2.1.10 no XSEDE. O "*Strict-Clock*" e uma árvore de horizonte bayesiano constante foram definidos e calibrados também utilizando os dados do TTOL. A reconstrução da BSP, a convergência do modelo, o tamanho efetivo da amostra (*ESS*) foram calculados no TRACER v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018).

Resultados

4 Resultados

4.1 Delimitação de Espécies da Família Istiophoridae

Ao todo foram utilizadas 214 sequências do gene COI dos seis diferentes BINs existentes no BOLD para a delimitação de espécies da família Istiophoridae e 44 sequências de amostras disponíveis no GenPesC, totalizando 258 indivíduos analisados a partir de 651 pares de bases nucleotídicas com frequência de Adenina: 22,9%, Citosina: 30,0%, Guanina: 18,4% e Timina: 28,7%.

Nos métodos baseados em distância genética utilizando o gene COI, como BIN e ABGD, encontramos 6 espécies potenciais em Istiophoridae, resultando em dez partições primárias variando de 6 grupos (P_{MIN} = 0,001) a 1 grupo (P_{MAX} = 0,009). Nos métodos baseados em árvores filogenéticas, foram estimados sete MOTUs com um baixo apoio de Máxima Verossimilhança variando entre 0,020 a 0,551. Enquanto, o método bPTP estimou dez MOTUs com alto suporte Bayesiano variando entre 0,440 a 1,000, destes sete com valor acima de 0,83. O método mPTP delimitou nove diferentes MOTUs. Há uma pequena variação entre o número de espécies delimitadas em relação ao tipo de modelo utilizado na inferência bayesiana. A análise de GMYC, utilizando o "*Strict-Clock*", resultou em 10 clusters e 10 entidades taxonômicas. Entre os métodos que utilizaram o "*uncorrelated lognormal relaxed-clock*", quando se aplicou o conceito de especiação "*Pure-Birth*", resultou em 12 clusters e 12 entidades, enquanto o teste com o "*Birth-Death*", em 11 clusters e 11 entidades. A árvore filogenética gerada com os diversos testes utilizados e com as diferentes leituras de delimitações entre espécies apresenta-se na Figura 8.

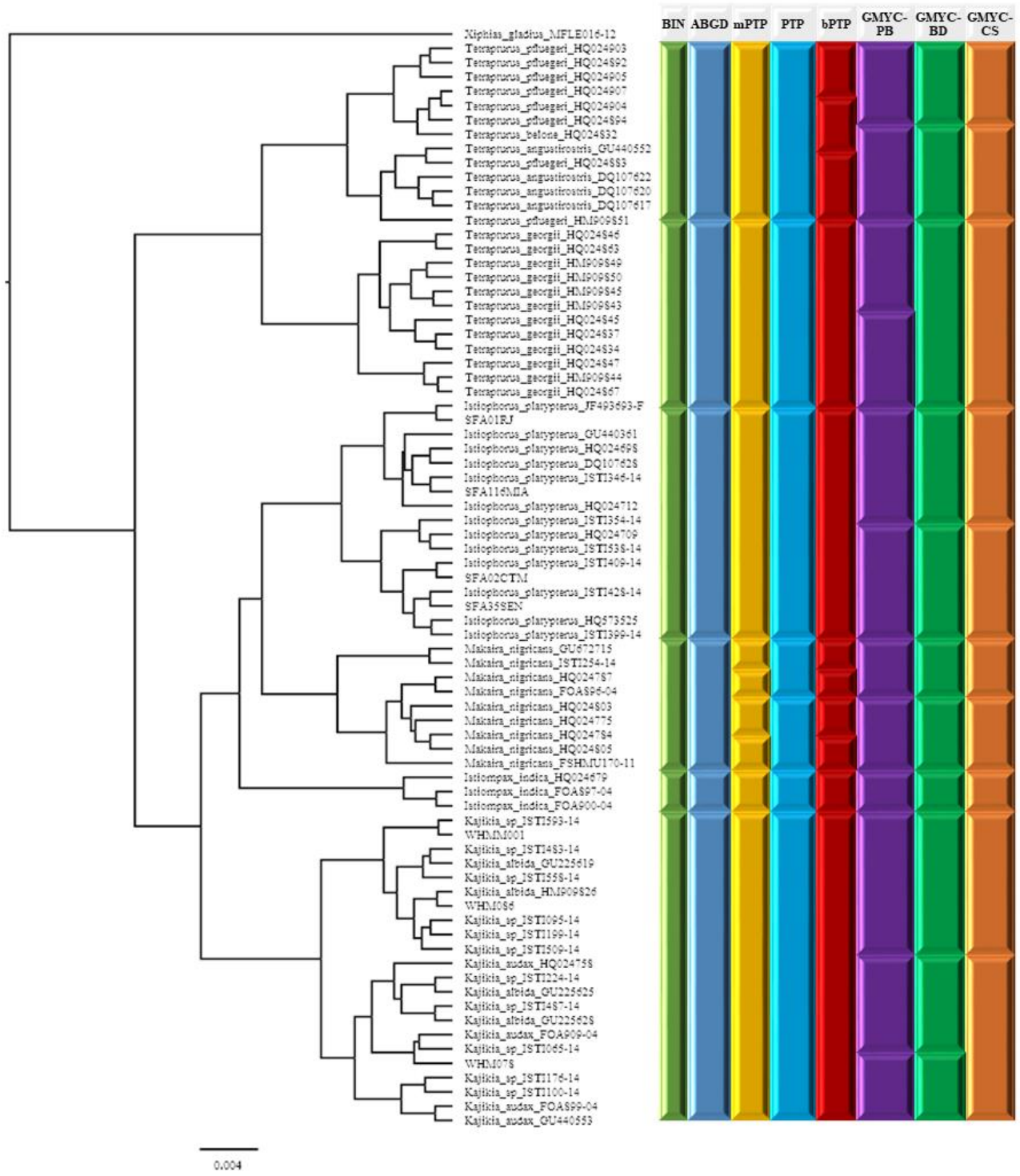

Figura 8. Delimitação de espécies da família Istiophoridae, cada coluna representa o número de possíveis espécies delimitadas pelos diferentes métodos. BIN, Barcode Index Number; ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery; mPTP, multi-rate Poisson Tree Processes; PTP, implementação original do teste PTP de máxima verossimilhança; bPTP, implementação com valores de Suporte Bayesiano da versão original PTP; GMYC, Generalized Mixed Yule Coalescent utilizando diferentes modelos, PB, *Pure-Birth*; BD, *Birth-Death*; CS, Constant Size.

4.2 Variabilidade Genética e Estruturação Populacional

Para o estudo populacional, foram sequenciadas a Região Controle do mtDNA de 348 espécimes de *Istiophorus platypterus*, que após o alinhamento apresentaram 669 pares de bases analisáveis com frequência nucleotídica de 31,3% de Adenina, 20,7% de Citosina, 17,9% de Guanina e 30,1% de Timina. Foram identificados 236 sítios polimórficos que evidenciaram 273 haplótipos. As diversidades haplotípica e nucleotídica foram *Hd* = 0,9983±0,0004 e π = 0,04370±0,00142, respectivamente, no Oceano Atlântico. Os valores relativos de cada grupo amostral podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Estatísticas Populacionais. ***n***, número de indivíduos; ***S***, número de sítios polimórficos; ***h***, número de haplótipos; ***Hd***, diversidade haplotípica; $\boldsymbol{\pi}$, diversidade nucleotídica.

Localidade	n	S	h	Hd	π
Flórida	49	145	47	0,998±0,005	0,04085±0,00381
Venezuela	53	139	49	0,997±0,004	0,04136±0,00404
Brasil	85	156	72	0,996±0,002	0,04511±0,00297
Senegal	50	131	47	0,998±0,005	0,05020±0,00203
Libéria	61	136	61	1,000±0,003	0,04122±0,00360
Costa do Marfim	50	136	47	0,998±0,005	0,04357±0,00393
Atlântico	348	236	273	0,998±0,0004	0,04370±0,00142

Os resultados para os diferentes cenários hipotéticos de estruturação na AMOVA demonstram ausência de estruturação genética populacional ou uma estruturação muito fraca (Tab. 2). Dentre estes cenários, avaliando a configuração atual para a gestão das pescas, que leva em conta as porções ocidental e oriental do Oceano Atlântico para a definição de estoques pesqueiros de *I. platypterus*, a AMOVA refuta a definição de populações diferentes entre os hemisférios (Φ_{ST}=0,01121, *p*=0,02438),

Tabela 2. Cenários hipotéticos da AMOVA. Φ_{ST}, Índice F de Wright; $P_{\Phi ST}$, p-valor do Índice F de Wright; FLO: Flórida; VZL: Venezuela; BRA: Brasil; SEN: Senegal; LIB: Libéria; IVC: Costa do Marfim.

Cenários de Estruturação Populacional	Φ_{ST}	$P_{\Phi ST}$
(FLO+VZL+BRA+SEN+LIB+IVC)	0,01127	0,04103
(FLO+VZL+BRA) X (SEN+LIB+IVC)	0,01121	0,02438
(FLO+VZL) X (BRA) X (SEN+LIB+IVC)	0,01072	0,0596
FLO X VZL X BRA X SEM X LIB X IVC	0,01193	0,03864

A fonte da variação encontrava-se quase totalmente dentro dos grupos amostrais (98,81%). Entretanto, a comparação de valores de F_{ST} por pares variou entre -0,01373 a 0,08456 (Tab. 3), evidenciando uma diferenciação moderada entre os grupos amostrais da Flórida e Venezuela no Golfo do México e Senegal na África. Assim, como esperado, o Teste de Mantel revelou não haver relação entre as distâncias genéticas e as geográficas (R^2= -0,034625, p= 0,5553).

Tabela 3. Comparação por pares dos valores de F_{ST} entre as regiões amostras no Oceano Atlântico abaixo da diagonal e p-valores acima da diagonal. (*p>0,05 após correção de Benjamini-Hochberg).

Localidade	Flórida	Venezuela	Brasil	Senegal	Libéria	Costa do Marfim
Flórida	-	0,92197	0,39801	0,00213*	0,33131	0,23029
Venezuela	-0,01249	-	0,81575	0,00580*	0,65503	0,47391
Brasil	-0,00126	-0,00838	-	0,01546	0,79803	0,77997
Senegal	0,08456*	0,06251*	0,04009	-	0,02619	0,06450
Libéria	0,00145	-0,00703	-0,00760	0,04183	-	0,98907
Costa do Marfim	0,00683	-0,00369	-0,00830	0,02879	-0,01373	-

Na rede de haplótipos (Fig. 9) é observado um alto compartilhamento de haplótipos entre todas as regiões amostradas. No entanto, destaca-se a existência de quatro agrupamentos mitocondriais ocorrendo no Atlântico, separadas por um mínimo de 8 passos mutacionais e um máximo de 39.

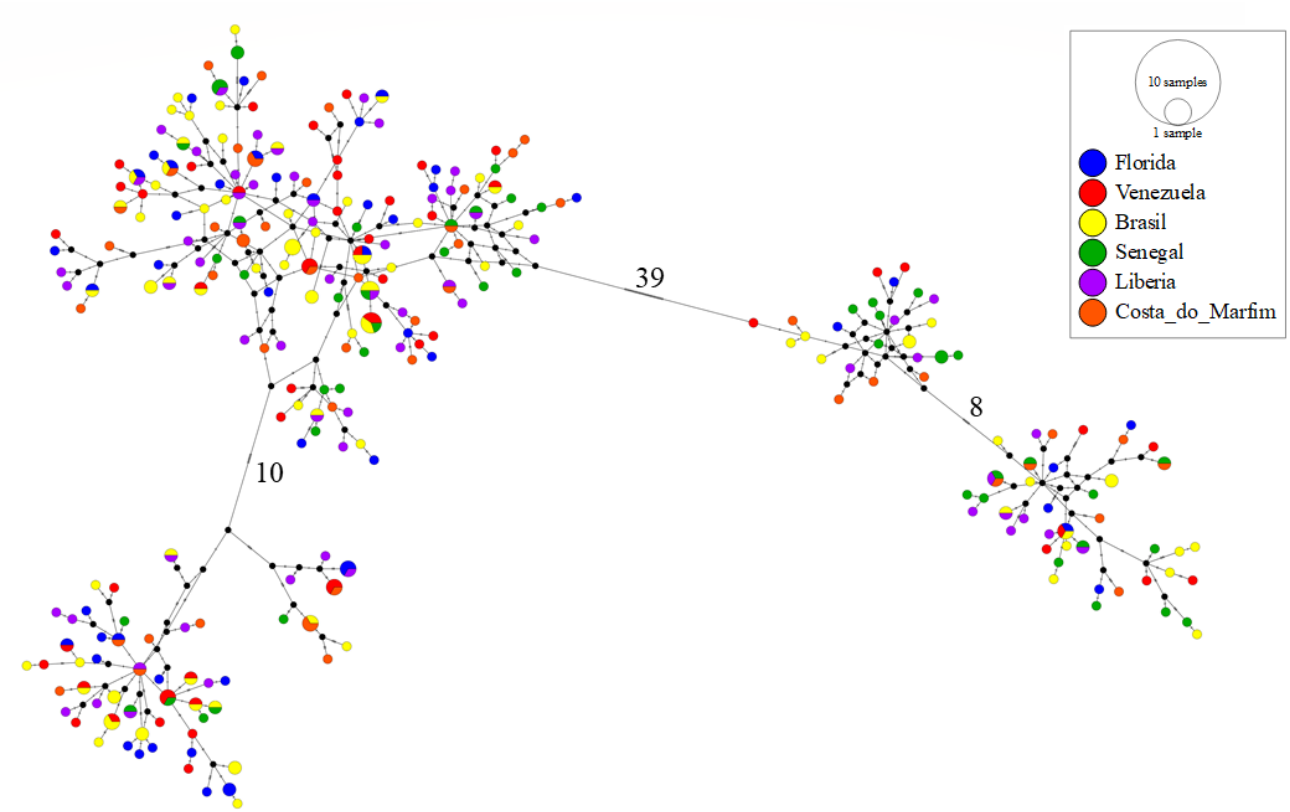

Figura 9. Rede de Haplótipos Median-Joinning da Região Controle do DNA Mitocondrial da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. Número indicam os passos mutacionais entre as linhagens sugeridas. Pontos negros, haplótipos hipotéticos não-amostrados.

4.3 Taxas de Migração e Tamanho Efetivo Populacional

As estimativas sobre as taxas de migração (*m*) evidenciaram um alto fluxo gênico (Tab. 4) ocorrendo entre todas as regiões amostradas sustentado pelo alto número de migrantes por geração (Fig. 10). Além disso, as estimativas de Θ (Tab. 4) revelaram a existência de um grande tamanho efetivo populacional do sexo feminino formado por milhares de indivíduos no Atlântico (Fig. 10). Estes resultados indicam fluxo gênico significativo entre as porções Leste e Oeste do Atlântico, reforçando a ocorrência de migração transatlântica, apesar de nunca ter sido constatada por estudos de marcação e recaptura tradicionais e eletrônicas (Ortiz *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2016).

Tabela 4. Resultados do Migrate-n. Estimativas de Θ ($xN_e\mu$) e M (m/μ) entre os grupos amostrais. O intervalo de confiança (HDP) de 95% está indicado entre parênteses. As populações receptoras de migrantes são mostradas ao longo do lado esquerdo e as populações doadoras de migrantes são indicadas na parte superior.

		Doadores		
Receptores	***Θ***	***Golfo do México***	***Atlântico Sudoeste***	***Golfo da Guiné***
Atlântico Central Oeste	0,09763	-	961,7	969,7
Atlântico Sudoeste	0,09657	907,7	-	957
Atlântico Central Leste	0,09843	797,7	949	-

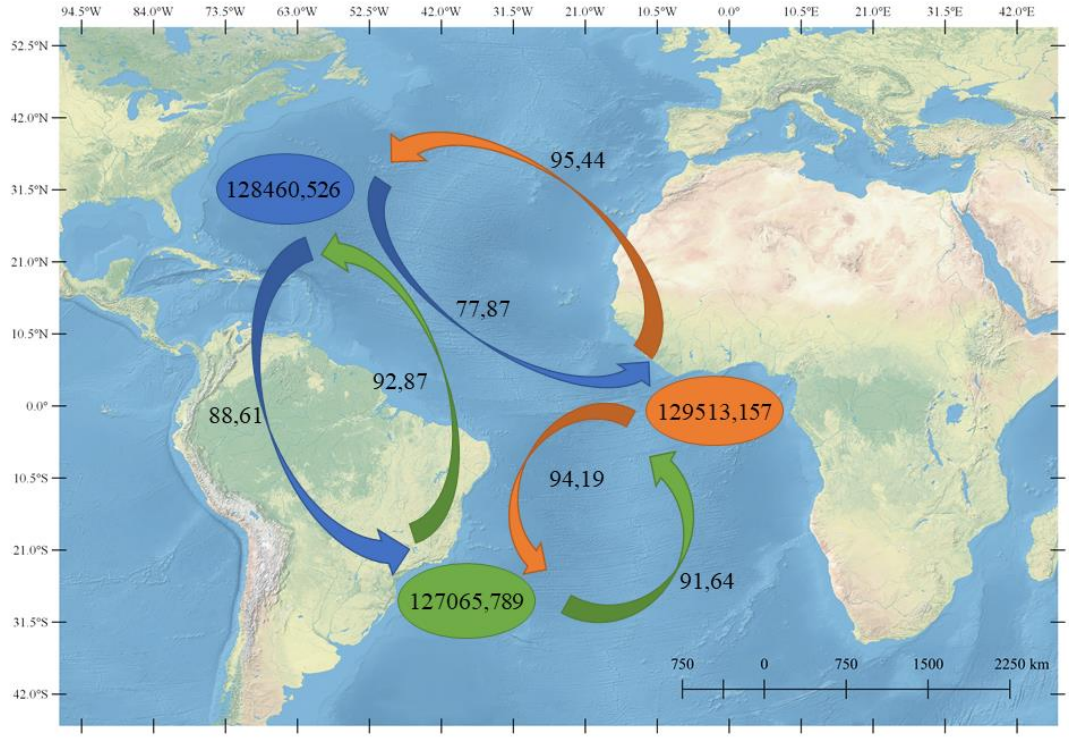

Figura 10. Estimativa do número de migrantes por geração entre diferentes regiões do Atlântico. Os números no interior dos círculos representam o Tamanho Efetivo populacional (N_e). As setas indicam o sentido da migração e o número de migrantes (Nm) por geração. Em azul, o grupo do Atlântico Central Oeste, em verde, Sudoeste Atlântico e em laranja, do Atlântico Central Leste.

Considerando a divergência encontrada entre os indivíduos de *I. platypterus*, sugerindo a divisão entre linhagens marcadamente separadas geneticamente, foi efetuado a análise de estruturação e divergência utilizando a Inferência Filogenética Bayesiana, a AMOVA e a rede de haplótipos com

sequencias do gene COI para testar a hipótese de a espécie abrigar uma ou mais espécies crípticas. Em uma segunda AMOVA, entre duas linhagens utilizando-se o mtDNA CR e um segundo marcador, o COI, em 37 indivíduos de ambas as linhagens (Tab. 5), foi encontrado uma forte estruturação, em ambos os marcadores. Isso demonstra que existe uma diferenciação muito alta entre as duas linhagens mitocondriais no Atlântico. Além disso, as redes de haplótipos entre as linhagens mostra não haver compartilhamento de haplótipos entre elas, o que explica a grande diferenciação encontrada (Fig. 12).

A Inferência Bayesiana (Fig. 11) resultou em uma topologia filogenética com duas linhagens mitocondriais divergentes, referidas como linhagem 1 (L1) e linhagem 2 (L2). A L2 foi a mais abundante em termos de representantes no Atlântico, enquanto L1 representa pouco mais de um terço dos haplótipos. O tempo de divergência entre as linhagens L1 e L2 foi estimado em 6,7 milhões de anos (Mia) durante o Mioceno Superior (~11,6 – 5,3 Mia). A taxa de mutação (μ) resultou em um valor de 0,76% Mia, enquanto a taxa de divergência genética (*dxy*) entre as linhagens resultou em 10,2%.

Tabela 5. Cenários hipotéticos da AMOVA. Φ_{ST}, Índice F de Wright; $P_{\Phi ST}$, p-valor do Índice F de Wright. mtDNA, região controladora do DNA mitocondrial, COI, citocromo *c* oxidase subunidade I.

Structuring scenario	Φ_{ST}	$P_{\Phi ST}$
mtDNA CR	0,70773	0,00001
COI	0,89084	0,00001

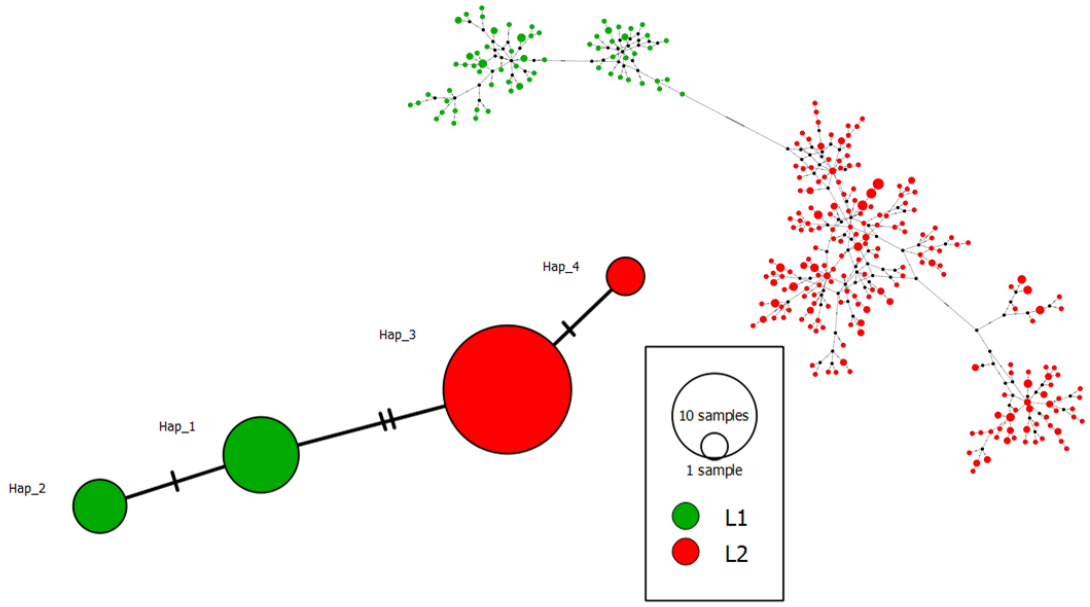

Figura 11. Rede de Haplótipos entre as linhagens mitocondriais. A esquerda, rede de haplótipos com o marcado, citocromo c oxidase subunidade I (COI). A direito, com o marcador mtDNA, região controladora do DNA mitocondrial (CR mtDNA).

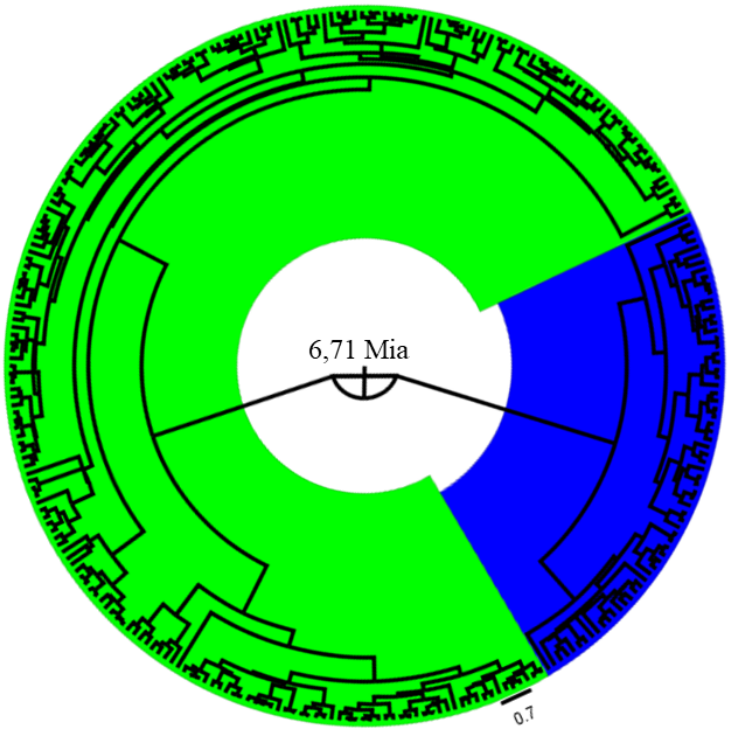

Figura 12. Inferência Filogenética Bayesiana com idade dos nós em anos inferidos a partir de 669 pb de sequências de da região controle do mtDNA do *Istiophorus platypterus* distribuídos no Oceano Atlântico. L1: linhagem 1, L2: linhagem 2.

Os valores de diversidade genética nas linhagens, são bastante reduzidos em relação aos valores apresentados pelos grupos amostrais. É possível identificar um índice de π nas linhagens metade do valor em relação aos grupos amostrais (Tab. 6), o que faz necessário a conservação das linhagens para a manutenção da diversidade genética da espécie.

Tabela 6. Estatísticas Populacionais. ***n***, número de indivíduos; ***S***, número de sítios polimórficos; ***h***, número de haplótipos; ***Hd***, diversidade haplotípica; ***π***, diversidade nucleotídica.

Localidade	n	S	h	Hd	π
Flórida	49	145	47	0,998±0,005	0,04085±0,00381
Venezuela	53	139	49	0,997±0,004	0,04136±0,00404
Brasil	85	156	72	0,996±0,002	0,04511±0,00297
Senegal	50	131	47	0,998±0,005	0,05020±0,00203
Libéria	61	136	61	1,000±0,003	0,04122±0,00360
Costa do Marfim	50	136	47	0,998±0,005	0,04357±0,00393
Atlântico	348	236	273	0,9983±0,0004	0,04370±0,00142
L1	77	110	66	0,996±0,003	0,02060±0,00072
L2	271	200	210	0,9977±0,0006	0,02475±0,00070

4.4 Demografia Histórica

Em relação as análises demográficas, os testes de Mismatch Distributions resultaram em curvas tri-modais (Fig. 14) no Atlântico, enquanto os testes para duas linhagens apresentaram um padrão bimodal (Fig. 15). Este padrão é esperado em populações que estiveram em equilíbrio demográfico ou que sofreram expansão com altos níveis de migração entre as subpopulações vizinhas. O modelo de Expansão Demográfica Súbita demonstra um aumento de mais de 60 vezes no tamanho populacional

após 4 gerações e o modelo de Expansão Espacial demonstra um grande aumento no número de migrantes. Entretanto, estas análises não possuem suporte estatístico, pois os valores de *SSD* e H_{RI} não são significativos (Tab. 7).

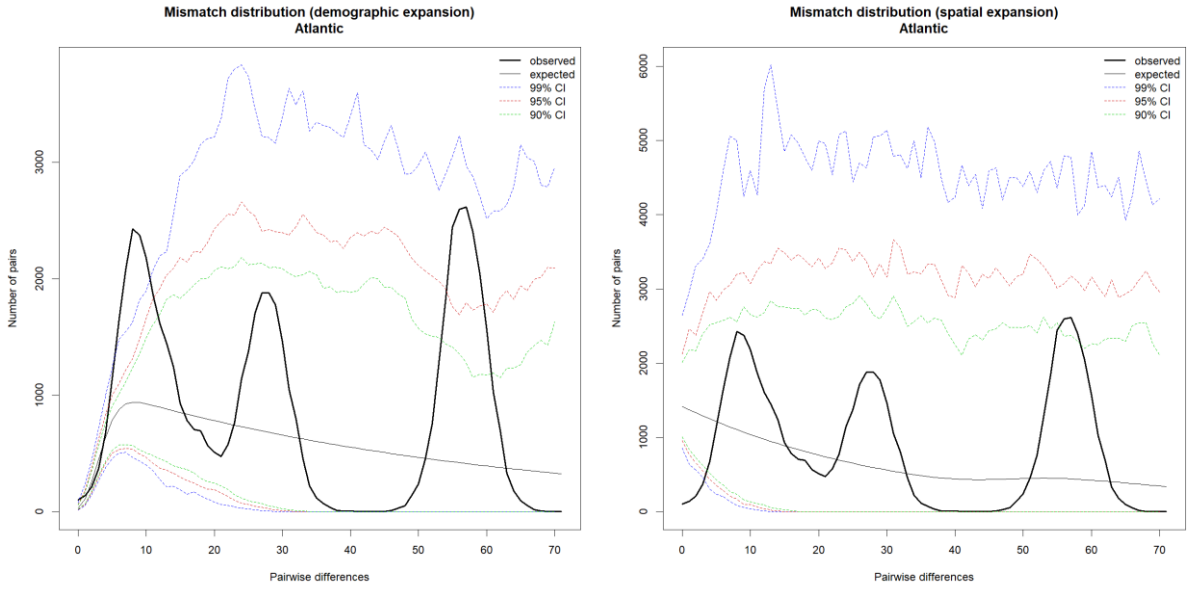

Figura 13. Mismatch Distributions do Oceano Atlântico. À esquerda, curva tri-modal do teste de Expansão Demográfica Súbita. À direita, curva tri-modal do teste de Expansão Espacial. Ambos os testes foram realizados com 1000 permutações.

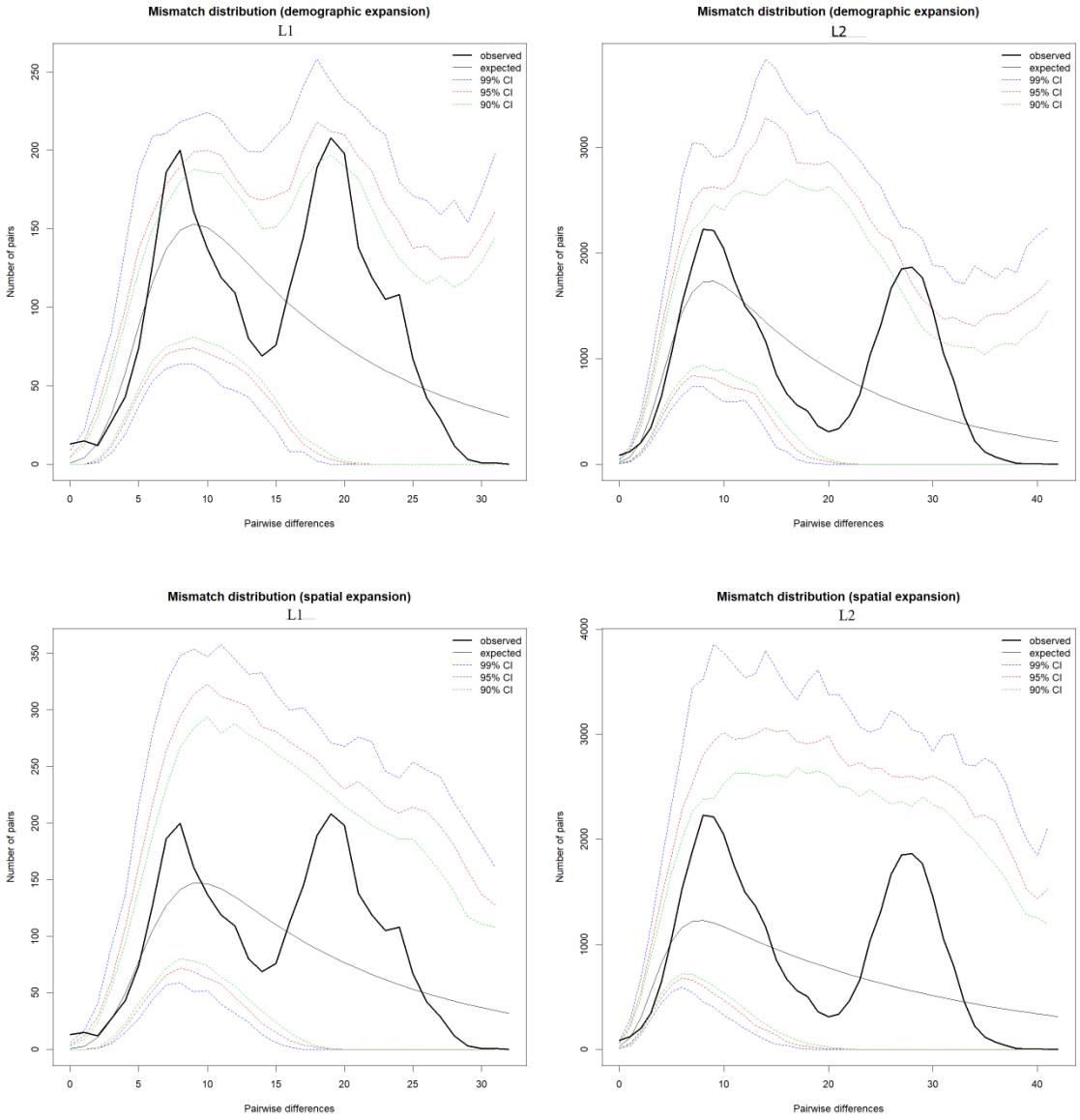

Figura 14. Mismatch Distribution das linhagens mitocondriais. Mismatch Distributions do Oceano Atlântico. Acima, curva bimodal do teste de Expansão Demográfica Súbita. Abaixo, curva bimodal do teste de Expansão Espacial. Ambos os testes foram realizados com 1000 permutações. L1: linhagem 1, L2: linhagem 2.

Apesar de os testes de Mismatch Distributions não serem significativos, os valores obtidos para os testes de Neutralidade, teste de R_2, foram significativos (p<0,05), positivos e próximos a zero. Enquanto os testes de F_S de Fu resultaram valores negativos, distantes de zero e significativos em todos os locais (p<0,02), como esperado em uma expansão populacional recente. Todas as linhagens

seguem o mesmo padrão demonstrado acima, dando suporte à hipótese da expansão populacional (Tab. 7).

O Bayesian Skyline Plot (BSP) traça a variação histórica do tamanho efetivo populacional para os grupos amostrados no Atlântico, evidenciando um longo período de dois milhões de anos de equilíbrio demográfico no tamanho efetivo populacional, interrompido por um aumento abrupto há cerca de 500 mil anos atrás (Ma) durante o Pleistoceno. Após essa expansão houve um evento secundário de expansão há menos de 100 Ma (Fig. 15). As duas linhagens apresentaram aumento no N_e há cerca de 500 Ma durante o Pleistoceno Médio (781 – 126 Ma). A linhagem L2 ainda apresentou uma expansão secundária há cerca de 125 Ma durante o Pleistoceno Superior, durante o último episódio de glaciação (Fig. 16)

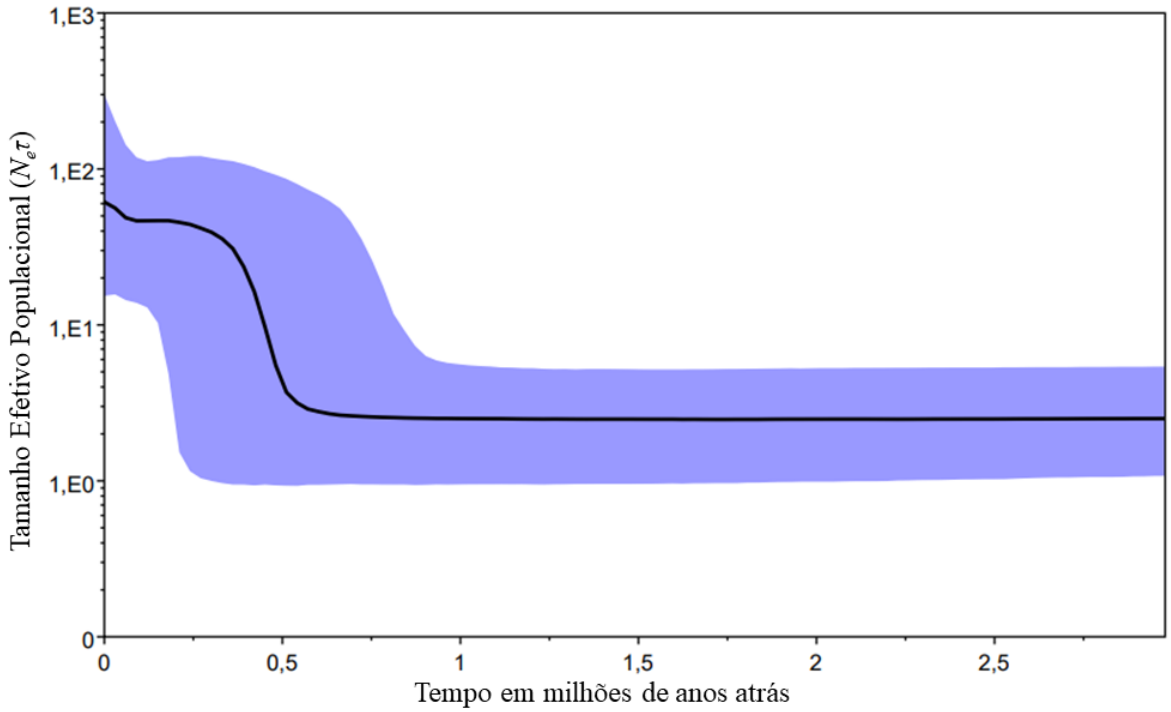

Figura 15. Bayesian Skyline Plot (BSP) entre os grupos amostrais da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. O eixo x está em unidades de milhões anos atrás e o eixo y é igual a $N_e\tau$ (o produto do tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração). A linha sólida é a estimativa mediana e as linhas ao contorno mostram os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD).

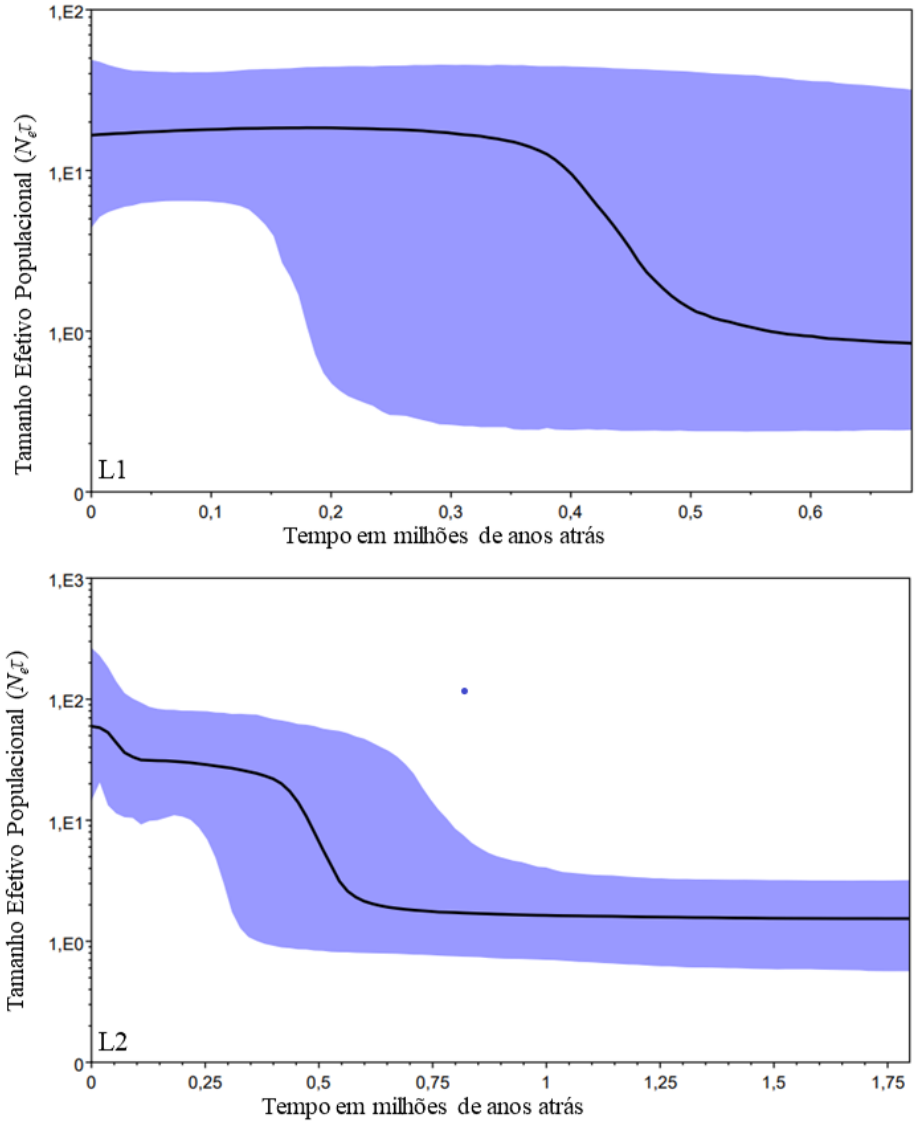

Figura 16. Bayesian Skyline Plot (BSP) entre as linhagens mitocondriais da espécie *Istiophorus platypterus* no Oceano Atlântico. O eixo x está em unidades de milhões de anos antes e o eixo y é igual a $N_e\tau$ (o produto do tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração). A linha sólida é a estimativa mediana e as linhas ao contorno mostram os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD). L1: Linhagem 1, L2: Linhagem 2.

.

Tabela 7. Estimativas de Mismatch Distributions para 1000 permutações e dos Testes de Neutralidade para o *Istiophorus platypterus* entre as regiões amostradas no Oceano Atlântico. Parâmetros da Expansão Demográfica Pura: τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ_0 (tamanho da população antes da expansão) e θ_1 (tamanho da população após a expansão), *SSD* (Soma dos Desvios de Qui-Quadrados), P_{SSD} (*p*-valor da *SSD*), H_{IR} (Índice de Irregularidade de Harpending), P_{HIR} (*p*-valor H_{IR}). Parâmetros da Expansão Espacial: τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ (tamanho da população), *M* (2*Nm*, tamanho populacional multiplicado pela taxa de migração). Parâmetros dos Testes de Neutralidade: F_S (F_S de Fu), P_{FS} *p*-valor de F_S, p>0,02), R_2 (Teste R_2 de Ramos & Orsins), P_{R2} (*p*-valor R_2, p>0,05). Em negrito e * valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg. L1, linhagem 1, L2 linhagem 2.

	Expansão Súbita							**Expansão Espacial**							**Testes de Neutralidade**			
Localidade	τ	θ_0	θ_1	*SSD*	P_{SSD}	*HIR*	P_{HIR}	τ	θ	*M*	*SSD*	P_{SSD}	*HIR*	P_{HIR}	F_S	P_{FS}	R_2	P_{R2}
Flórida	4,00	28,80	3494,99	0,0131	0,1640	0,0046	0,3150	5,18	25,82	8528,83	0,0127	0,3880	0,0046	0,2100	**-22,6575**	**0,00007**	**0,10577**	**0,00001**
Venezuela	3,50	28,00	7788,00	0,0114	0,5780	0,0034	0,4690	0,00	53,70	4091,29	0,0146	0,1350	0,0034	0,9550	**-21,5982**	**0,00010**	**0,10360**	**0,00001**
Brasil	4,00	57,60	3647,98	0,0142	0,0370	0,0021	0,4210	0,00	82,78	4080,00	0,0168	0,0080	0,0021	0,9570	**-24,0094**	**0,00040**	**0,09509**	**0,00001**
Senegal	0,00	57,60	7067,97	0,0213	0,2840	0,0029	0,9950	48,78	8,91	250,55	**0,0178**	**0,0000**	0,0029	0,9120	**-17,4205**	**0,00067**	**0,10471**	**0,00001**
Libéria	4,00	21,60	3486,39	0,0143	0,1920	0,0027	0,6100	0,00	54,19	8617,09	0,0184	0,0460	0,0027	0,9660	**-24,0978**	**0,00010**	**0,10066**	**0,00001**
Costa do Marfim	4,00	28,80	7067,97	0,0120	0,3870	0,0026	0,7870	49,63	25,30	0,00	0,0165	0,4950	0,0026	0,9990	**-19,9267**	**0,00027**	**0,10492**	**0,00001**
Atlântico	4,00	57,60	3647,98	0,0127	0,0410	0,0012	0,2540	48,65	41,31	0,30	0,0134	0,2210	0,0012	0,9970	**-23,4929**	**0,01800**	**0,07458**	**0,00001**
L1	6,00	12,60	6934,97	0,0087	0,1250	0,0027	0,6310	6,24	13,19	5112,81	0,0088	0,1700	0,0027	0,6550	**-24,2023**	**0,00010**	**0,09652**	**0,00001**
L2	5,50	14,62	3857,60	0,0086	0,1840	0,0016	0,5450	4,26	23,64	4722,92	0,0103	0,2700	0,0016	0,6110	**-23,6571**	**0,00680**	**0,07809**	**0,00001**

Discussão

5 Discussão

5.1 Delimitação Molecular da família Istiophoridae

Os resultados da delimitação de espécies da família Istiophoridae utilizando testes baseados apenas no DNA mitocondrial validaram novamente os cinco gêneros atualmente reconhecidos: *Istiophorus*, *Makaira*, *Istiompax*, *Kajikia* e *Tetrapterus*, assim como em Collette *et al.* (2006), Hanner *et al.* (2011), Betancur-R *et al.* (2013) e Santini & Sorenson (2013). Entretanto, atualmente não há consenso sobre o atual número de espécies e os estudos de Collette *et al.* (2006) sugerem nove espécies, enquanto os de Nakamura (1985) e Nelson *et al.* (2016) reconhecem 11 espécies e, ainda, Betancur-R *et al.* (2013) e Santini & Sorenson (2013) postulam a divisão da família Istiophoridae em 12 espécies.

No presente estudo, utilizando diferentes metodologias de análise, foram mantidas ainda em aberto a delimitação do real número atual de espécies de Istiophoridae com variação entre 6 a 12 MOTUs. As estimativas de MOTUs com testes baseados na distância genética, como BIN e ABGD, foram os mais conservadores e caracterizaram 6 espécies distintas. Entre os métodos baseados em árvores filogenéticas foram definidas entre 7 e 10 espécies usando testes PTPs, enquanto os testes GMYCs foram apresentados entre 10 a 12. Assim, segundo os testes há uma ou duas MOTUS, possivelmente referindo-se às espécies *Istiophorus platypterus* e *I. albicans* e, desta forma, nossos resultamos mantém em aberto a definição do número efetivo de espécies para o gênero *Istiophorus* no Oceano Atlântico. Nelson *et al.* (2004) reconhecem a ocorrência apenas de *I. platypterus*. Já Nakamura (1985) descreveu a ocorrência de *I. albicans* também no Atlântico e foi corroborado por Betancur-R *et al.* (2013) e Santini & Sorenson (2013). Mesmo assim, para fins de gestão das pescas, apenas *I. platypterus* é validada atualmente no Atlântico. Seriam estes dois clados, como visto na Figura 8 e também observado nas MOTUs, as duas espécies do gênero em simpatria no Atlântico com uma delas

ainda críptica na gestão pesqueira ou teríamos apenas uma única espécie no Atlântico e Indo-pacífico sendo tratadas em sinonímia?

Em nossos resultados houve discrepância entre os testes em relação a delimitação das espécies do gênero *Makaira* com a caracterização de uma a quatro diferentes MOTUs. Na árvore filogenética são observadas dois clados, assim como encontrado para o agulhão-vela (Fig. 8). Em relação ao gênero *Istiompax*, a árvore filogenética promove sua distinção em todos os testes com apenas uma MOTU referindo-se à espécie *Istiompax indica*. Há a divisão de dois clados na árvore filogenética (Fig. 8) e em um deles, uma única espécie, *T. georgii* é separada em dois clados. Outro clado é formado pelas três espécies restantes e apresentam uma topologia similar ao encontrado por Hanner *et al.* (2011), ou seja, as espécies *T. pfluegeri*, *T. belone* e *T. angustirostris* não são perfeitamente distintas com uso exclusivamente do gene COI e também formam o mesmo BIN no BOLD, o que evidencia seu alto grau de similaridade genética e a falha em sua delimitação.

5.2 Variabilidade Genética e Delimitação de Estoques Pesqueiros

Considerando que o gênero *Istiophorus* é composto somente por uma única espécie, nas análises utilizando 348 indivíduos, *I. platypterus* apresenta uma alta diversidade genética (Tab. 1). A diversidade nucleotídica está entre as mais altas já medidas para a família Istiophoridae no Atlântico (McDowell *et al.*, 2007, Bernard *et al.*, 2014, Mamoozadeh *et al.*, 2017) e até mesmo em comparação a outras espécies correlatas, como as da família Scombridae (Ely *et al.*, 2005, Martínez *et al.*, 2006; Boustany *et al.*, 2008; Vinãs *et al.*, 2011). A diversidade haplotípica também é relativamente alta, sendo encontrado um grande número de haplótipos representado por apenas um indivíduo em nossa amostra.

Os resultados da AMOVA demonstraram não haver estruturação genética populacional em todo o Atlântico (Φ_{ST}=0,01326, p=0,03639), o que significa que a espécie forma um único estoque

genético panmítico na região analisada. Entretanto, na comparação de F_{ST} por pares, verifica-se uma significante diferenciação entre Senegal, na África e Flórida e Venezuela (Tab. 2), indicando uma diferenciação moderada entre estas regiões. Resultados similares também foram observados por McDowell & Graves (2002) utilizando RFLP da mtDNA CR e 3 loci microssatélites no Oceano Atlântico.

Na topologia da Inferência Filogenética Bayesiana (Fig. 10) é observada a caracterização de duas linhagens mitocondriais divergentes e simpátricas no Oceano Atlântico. A identificação de linhagens no Atlântico, já havia sido constatada por Graves & McDowell (2003) que detectaram uma baixa, porém significativa, divergência genética entre as populações do Atlântico e Indo-Pacífico, com a identificação de duas linhagens mitocondriais distintas ocorrendo uma no Atlântico e outra no Atlântico e também presente no Indo-Pacífico.

Os resultados gerados no Migrate-n (Tab. 4) sugerem que o agulhão-vela possui tamanho efetivo populacional feminino formado por milhares de indivíduos, com alto fluxo gênico sustentado por uma alta taxa de migração de fêmeas entre as regiões analisadas (Tab. 5). Associado com um estudo de marcações por satélite em *I. platypterus* (Lam *et al.*, 2016) incluindo também indivíduos machos, as estimativas de fluxo gênico e taxas de migração no Atlântico apontam para a ocorrência de deslocamentos irrestritos por toda a área avaliada.

No Atlântico Sudoeste, com base em dados reprodutivos e da taxa de captura, pode-se supor que a partir de outubro, os indivíduos maduros sexualmente migram do Atlântico Tropical Central-Ocidental para a costa sudeste brasileira para desovar e permanecer lá por volta de fevereiro a março. Padrões mensais mostram que a abundância de indivíduos é alta de novembro a fevereiro nos locais de desova, o que coincide com temperaturas da água mais altas, seguidas por um forte declínio em março e abril. Para regiões de não-desova, a abundância da espécie é maior durante os meses antes e depois da época de desova (Mourato *et al.*, 2014). Nossas estimativas de ausência de estruturação genética, grande tamanho efetivo populacional (N_e) e taxas de migração (m), somado aos resultados

de Mourato *et al.* (2014) e Lam *et al.* (2016), reforçam a conectividade mediada pela migração das fêmeas entre as diferentes regiões de desova no Atlântico Ocidental, no Golfo do Médico e no sudeste do Brasil, configurando um único estoque genético da espécie no Atlântico, incluindo suas diferentes linhagens.

Desta forma, considerando que o gênero *Istiophorus* possui apenas uma espécie e de distribuição global, o uso de marcadores moleculares mitocondriais, revelaram a existência de um único estoque genético no Oceano Atlântico com alta diversidade genética e fluxo gênico mediado por uma alta taxa de migração, ao menos das fêmeas, entre as regiões analisadas. Entretanto, as duas linhagens mitocondriais encontradas sugerem que este estoque passou por um processo de divergência que foi encerrada antes de o processo de especiação ser completado. A identificação de clados altamente divergentes coexistindo na mesma área também poderia ser interpretado como evidência da existência de diferentes subespécies. Porém, tal constatação deve ser interpretada com cautela, já que o mesmo padrão poderia ter surgido em uma população com acasalamento aleatório por hibridação secundária de subpopulações isoladas. Ao contrário dos marcadores nucleares, o mtDNA possui herança materna e é não-recombinante, sendo que os sinais de eventos de separação passados, isto é, as linhagens divergentes, coexistirão na população por muitas gerações após esta hibridação. Assim, não se pode interpretar uma população de acasalamento aleatório coexistindo em dois ou mais estoques diferentes, embora tais estoques sejam inexistentes do ponto de vista da gestão pesqueira ou da genética de populações (Avise, 2009).

5.3 Demografia Histórica da espécie Istiophorus platypterus no Oceano Atlântico

A inferência filogenética bayesiana revelou a existência de duas linhagens mitocondriais simpátricas, que divergiram há 6,7 Mia, durante o Mioceno Superior e que ocorrem simultaneamente no Oceano Atlântico.

As análises demográficas indicam ter havido eventos de expansão populacional no passado, embora em alguns testes este resultado não seja muito evidente. A análise de Mismatch Distribution, para ambos os modelos de expansão, resultou em uma curva multimodal (Fig. 11), o que sugere equilíbrio demográfico (Hudson & Slatkin, 1991; Rogers & Harpending, 1992) ou expansão com altos níveis de migração entre as subpopulações vizinhas (Ray *et al.*, 2003; Excoffier, 2004). A segunda opção é apoiada pelas estimativas de fluxo gênico entre as regiões. A análise Mismatch Distribution das linhagens indica que não houveram eventos de expansão populacional, segundo o modelo de expansão súbita, quanto aumento espacial e da área de distribuição da espécie, segundo o modelo de Expansão Demográfica (Ray *et al.*, 2003). Uma grande expansão espacial pode levar ao mesmo sinal uma expansão demográfica súbita em uma população panmítica, mas somente se subpopulações vizinhas (demes) trocarem muitos migrantes por geração (≥50). Ainda assim, apesar de tudo, o índice H_{RI} para ambos modelos demográficos resultou em valores positivos, próximos a zero e não-significativos para todas as localidades, assim como os testes *SSD*, entretanto foram obtidos baixos valores positivos significativos para o Senegal, sob o modelo de expansão espacial (Tab. 7), o que não descarta a hipótese de expansão populacional. Além disso, os testes F_S e R_2 foram significativos e também reforçam a hipótese de expansão populacional. Considera-se que o teste R_2 produz dados aprimorados para tamanhos amostrais pequenos, o teste F_S é melhor para tamanhos amostrais maiores, enquanto estatísticas como "Mismatch Distribution" e H_{RI} são consideradas mais conservadoras (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Os testes BSPs também demonstram ter havido um abrupto aumento no tamanho efetivo populacional há aproximadamente 500 Ma, durante o Pleistoceno Médio (781 – 126 Ma), seguido de um aumento secundário há 100 Ma (Fig. 13). Entretanto, considerando as linhagens mitocondriais separadamente, é observado uma história demográfica diferente, ambas as linhagens apresentaram uma expansão populacional há 500 Ma, também durante o Pleistoceno Médio, porém L2 apresenta um segundo evento de expansão há 100 Ma durante o Pleistoceno Superior (126 – 11,7 Ma).

O Mioceno Superior foi uma época de seca e resfriamento global. O gelo se acumulou rapidamente nos polos, os níveis oceânicos baixaram, as chuvas diminuíram e as florestas tropicais recuaram. Nos oceanos, o Mioceno foi uma época de mudança nos padrões de circulação, provavelmente devido ao resfriamento global, que ocorreu em sincronia em ambos os hemisférios e culminou com as temperaturas oceânicas caindo para valores próximos aos atuais há aproximadamente 7 e 5,4 Mia (Herbert *et al.*, 2016). De acordo com Keigwin *et al.* (1986), os dois últimos máximos glaciais durante o Mioceno Superior provavelmente resultaram em uma redução média do nível oceânico entre 60 e 100 m.

O Pleistoceno, a última Idade do Gelo, abrange o período mais recente de ciclos alternados de eras glaciais e interglaciais, que corresponde ao período entre 2,6 Mia – 11,7 Ma. Durante a Transição Pleistoceno Médio-Inferior, entre 1,4 - 0,4 Mia, houve aumento progressivo na amplitude das oscilações climáticas, uma mudança no ritmo orbital da Terra de 41 Ma para aproximadamente 100 Ma entre os ciclos glaciais, o que gerou ciclos de aumento e diminuição dos volumes médios de gelo e grandes flutuações no nível dos oceanos (Berger & Jansen, 1994; Pillans *et al.*, 1998; Head & Gibbard, 2005; Ludt & Rocha, 2015). Os baixos níveis oceânicos culminaram em linhas costeiras entre 115 a 130 m abaixo do nível atual, atingindo um mínimo durante o Último Máximo Glacial (Fairbanks, 1989; Hanebuth *et al.*, 2000; Voris, 2000; Bintanja *et al.*, 2005; Bintanja & van de Wal, 2008; Clark *et al.*, 2009). As barreiras ao fluxo gênico no Atlântico também se intensificaram durante os baixos níveis oceânicos, como a que separa o Brasil e o Caribe, a Foz do Rio Amazonas, que foi provavelmente fechada (Rocha, 2003) reduzindo o habitat costeiro disponível e as conexões entre as regiões oceânicas (Ludt *et al.*, 2015). As mudanças climáticas durante a Transição Pleistoceno Médio-Inferior, a diminuição dos níveis dos oceanos e o surgimento de novas barreiras podem ter contribuído para a flutuação demográfica e alteração da área de distribuição do agulhão-vela, ocasionando o isolamento de grupos de indivíduos por um período, originando populações diferentes que por sua vez resultaram nas diferentes linhagens mitocondriais no Atlântico. Com o aumento no nível dos oceanos,

principalmente após o Último Máximo Glacial, estas populações se integraram novamente, interromperam o processo de especiação e tornaram as linhagens simpátricas, contribuindo com aumento na diversidade genética da espécie, formando um único estoque genético no Atlântico.

Conclusão

6 Conclusão

Baseando-se nos resultados dos testes de delimitação de espécies, também mantivemos em aberto o número real de espécies da família Istiophoridae, sendo provavelmente de 10 a 12 unidades taxonômicas. Sugerimos que para uma nova abordagem genética seja resolutiva, deve-se lançar mão de técnicas de genômica associadas a uma abordagem taxonômica integrativa.

Em relação a delimitação de estoques genéticos no Atlântico, admitindo-se que a espécie *Istiophorus platypterus* seja uma única espécie, temos apenas uma população com alta diversidade genética, composta por duas linhagens mitocondriais simpátricas e fluxo gênico permeando toda a bacia Atlântica. Estas linhagens divergiram durante o Pleistoceno, época marcada por ciclos glaciais e interglaciais com avanço e retração das geleiras e aumento e diminuição do nível dos oceanos.

Estas informações podem auxiliar planos de manejo na exploração pesqueira de *I. platypterus*, sendo um ponto importante de sua manutenção, a conservação da variabilidade genética, sobretudo nas linhagens de menor tamanho populacional. A ICCAT divide esta espécie em dois estoques pesqueiros no Atlântico entre as porções leste e oeste. No entanto, com base em nossos resultados, sobretudo considerando o fluxo gênico quase irrestrito determinado pela alta migração e dispersão da espécie, sugerimos a reavaliação desta preposição e adequação dos métodos de gerenciamento da pesca, considerando as linhagens identificadas para *I. platypterus* como as unidades válidas para conservação.

7 Referências Bibliográficas

Abaunza, P., Murta, A. G., Campbell, N., Cimmaruta, R., Comesaña, A. S., Dahle, G., Santamaría, M.G., Gordo, L.S., Iversen, S.A., MacKenzie, K., & Magoulas, A. (2008). Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches. Fisheries Research, 89(2), 196-209.

Ahrens, D., Monaghan, M. T., & Vogler, A. P. (2007). DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). Molecular Phylogenetics and evolution, 44(1), 436-449.

Allendorf, F. W. (1987). Genetics and fishery management, past, present and future. In 'Population Genetics and Fishery Management'. (Eds N. Ryman and F. Utter.) pp. 1–20.

Allendorf, F. W., Leary, R. F., Hitt, N. P., Knudsen, K. L., Lundquist, L. L., & Spruell, P. (2004). Intercrosses and the US Endangered Species Act: should hybridized populations be included as westslope cutthroat trout?. Conservation Biology, 18(5), 1203-1213.

Allison, E. H. (2011). Aquaculture, fisheries, poverty and food security.

Antoniou, A., & Magoulas, A. (2014). Application of mitochondrial DNA in stock identification. In Stock Identification Methods (Second Edition) (pp. 257-295).

Arizmendi-Rodríguez, D. I., Abitia-Cárdenas, L. A., Galván-Magaña, F., & Trejo-Escamilla, I. (2006). Food habits of sailfish *Istiophorus platypterus* off Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Bulletin of Marine Science, 79(3), 777-791.

Avise, J. C. (1998). Conservation genetics in the marine realm. Journal of Heredity, 89(5), 377-382.

Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of biogeography, 36(1), 3-15.

Avise, J. C. (2012). Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular biology and evolution, 16(1), 37-48.

Barraclough, T. G., Hughes, M., Ashford-Hodges, N., & Fujisawa, T. (2009). Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. Biology letters, 5(3), 425-428.

Beerli, P. (2004). Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. Molecular Ecology, 13(4), 827-836.

Beerli, P. (2005). Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. Bioinformatics, 22(3), 341-345.

Beerli, P. (2009). How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use. Population genetics for animal conservation, 17, 42-79.

Beerli, P., & Palczewski, M. (2010). Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. Genetics, 185(1), 313-326.

Begg, G. A., & Waldman, J. R. (1999). An holistic approach to fish stock identification. Fisheries research, 43(1-3), 35-44.

Beissinger, S. R., & McCullough, D. R. (2002). Population viability analysis. University of Chicago Press.

Belhabib, D., Sumaila, U. R., & Pauly, D. (2015). Feeding the poor: contribution of West African fisheries to employment and food security. Ocean & Coastal Management, 111, 72-81.

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological), 289-300.

Berger, W. H., & Jansen, E. (1994). Mid-pleistocene climate shift-the Nansen connection. The polar oceans and their role in shaping the global environment, 295-311.

Bernal, D., Sepulveda, C., Musyl, M., & Brill, R. (2009). The eco-physiology of swimming and movement patterns of tunas, billfishes, and large pelagic sharks. Fish locomotion—an etho-ecological approach. Enfield Scientific Publishers, Enfield, NH, 437-483.

Bernard, A. M., Hilsdorf, A. W. S., Amorim, A. F., Domingues, R. R., & Shivji, M. S. (2014). Development and characterization of thirteen microsatellite markers for the longbill spearfish (Tetrapturus pfluegeri). Conservation Genetics Resources, 6(1), 169-171.

Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B., & Stadler, P. F. (2013). Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. Molecular phylogenetics and evolution, 69(2), 328-338.

Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., Holcroft, N. I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton Ii, J. C., & Zhang, F. (2013). The tree of life and a new classification of bony fishes. PLoS currents, 5.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in ecology & evolution, 22(3), 148-155.

Bintanja, R., & Van de Wal, R. S. W. (2008). North American ice-sheet dynamics and the onset of 100,000-year glacial cycles. Nature, 454(7206), 869.

Bintanja, R., van de Wal, R. S., & Oerlemans, J. (2005). Modelled atmospheric temperatures and global sea levels over the past million years. Nature, 437(7055), 125.

Block, B. A., Booth, D., & Carey, F. G. (1992). Direct measurement of swimming speeds and depth of blue marlin. Journal of Experimental Biology, 166(1), 267-284.

Bond, J. E., & Stockman, A. K. (2008). An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian trapdoor spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. Systematic Biology, 57(4), 628-646.

Booth, A. J. (2000). Incorporating the spatial component of fisheries data into stock assessment models. ICES Journal of Marine Science, 57(4), 858-865.

Borsa, P. (2002). Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). Biological Journal of the Linnean Society, 75(2), 261-269.

Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(4), 1967-1971.

Boustany, A. M., Reeb, C. A., & Block, B. A. (2008). Mitochondrial DNA and electronic tracking reveal population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Marine Biology, 156(1), 13-24.

Buonaccorsi, V. P., McDowell, J. R., & Graves, J. E. (2001). Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). Molecular Ecology, 10(5), 1179-1196.

Burger, G., Gray, M. W., & Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. Trends in genetics, 19(12), 709-716.

Burton, R. S. (2009). Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. BioScience, 59(10), 831-840.

Cadrin, S. X., Kerr, L. A., Mariani, S. (2014). Stock identification methods: an overview. In: Cadrin, S.X., Kerr, L.A., Mariani, S. (Eds.), Stock Identification Methods., Second ed.). Academic Press, San Diego, pp. 1–5.

Cano, J. M., Shikano, T., Kuparinen, A., & Merila, J. (2008). Genetic differentiation, effective population size and gene flow in marine fishes: implications for stock management. Journal of integrated field science, 5, 1-10.

Cardinale, M., Dörner, H., Abella, A., Andersen, J. L., Casey, J., Döring, R., Kirkegaard, E., Motova, A., Anderson, J., Simmonds, E. J., & Stransky, C. (2013). Rebuilding EU fish stocks and fisheries, a process under way?. Marine Policy, 39, 43-52.

Carpenter, K. E., Collette, B. B., & Russo, J. L. (1995). Unstable and stable classifications of scombroid fishes. Bulletin of Marine Science, 56(2), 379-405.

Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. Molecular ecology, 22(17), 4369-4383.

Carvalho, G. R., & Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4(3), 326-350.

Carvalho, G. R., & Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4(3), 326-350.

Castorani, M. C., Reed, D. C., Alberto, F., Bell, T. W., Simons, R. D., Cavanaugh, K. C., Siegel, D.A., & Raimondi, P. T. (2015). Connectivity structures local population dynamics: a long-term empirical test in a large metapopulation system. Ecology, 96(12), 3141-3152.

Chargé, R., Teplitsky, C., Sorci, G., & Low, M. (2014). Can sexual selection theory inform genetic management of captive populations? A review. Evolutionary applications, 7(9), 1120-1133.

Chen, H., Chang, C. H., Sun, C. L., Shao, K. T., Yeh, S. Z., & DiNardo, G. (2016). Population Structure of Blue Marlin, *Makaira nigricans*, in the Pacific and Eastern Indian Oceans. Zoological Studies, 55(33).

Chiang, W. C., Musyl, M. K., Sun, C. L., Chen, S. Y., Chen, W. Y., Liu, D. C., Su, W. C., Yeh, S. Z., Fu, S. C., & Huang, T. L. (2011). Vertical and horizontal movements of sailfish (Istiophorus platypterus) near Taiwan determined using pop-up satellite tags. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 397(2), 129-135.

Chiang, W. C., Sun, C. L., Yeh, S. Z., & Su, W. C. (2004). Age and growth of sailfish (*Istiophorus platypterus*) in waters off eastern Taiwan. Fishery Bulletin, 102(2), 251-263.

Chiang, W. C., Sun, C. L., Yeh, S. Z., Su, W. C., Liu, D. C., & Chen, W. Y. (2006). Sex ratios, size at sexual maturity, and spawning seasonality of sailfish *Istiophorus platypterus* from eastern Taiwan. Bulletin of Marine Science, 79(3), 727-737.

Chow, S. (1994). Identification of billfish species using mitochondrial cytochrome b gene fragment amplified by polymerase chain reaction. Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 42, 549-556.

Chuang, P. S., Chang, H. A., Chiang, W. C., & Shiao, J. C. (2017). Rapid identification of the north-western Pacific billfish species using quantitative real-time polymerase chain reaction techniques. Marine Biology Research, 13(7), 751-763.

Clark, P. U., Dyke, A. S., Shakun, J. D., Carlson, A. E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J. X., Hostetler, S. W., & McCabe, A. M. (2009). The last glacial maximum. science, 325(5941), 710-714.

Colborn, J., Crabtree, R. E., Shaklee, J. B., Pfeiler, E., & Bowen, B. W. (2001). The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula spp.*): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. Evolution, 55(4), 807-820.

Collette, B. B., McDowell, J. R., & Graves, J. E. (2006). Phylogeny of recent billfishes (Xiphioidei). Bulletin of Marine Science, 79(3), 455-468.

Collette, B. B., Potthoff, T., Richards, W. J., Ueyanagi, S., Russo, J. L., & Nishikawa, Y. (1984). Scombroidei: development and relationships. Ontogeny and Systematics of Fishes, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication,, 1, 591-620.

Collette, B., Acero, A., Amorim, A.F., Boustany, A., Canales Ramirez, C., Cardenas, G., Carpenter, K.E., de Oliveira Leite Jr., N., Di Natale, A., Die, D., Fox, W., Fredou, F.L., Graves, J., Guzman-Mora, A., Viera Hazin, F.H., Hinton, M., Juan Jorda, M., Minte Vera, C., Miyabe, N., Montano Cruz, R., Nelson, R., Oxenford, H., Restrepo, V., Salas, E., Schaefer, K., Schratwieser, J., Serra, R., Sun, C., Teixeira Lessa, R.P., Pires Ferreira Travassos, P.E., Uozumi, Y. & Yanez, E. 2011. *Istiophorus platypterus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T170338A6754507. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T170338A6754507.en.

Costello, C., Ovando, D., Clavelle, T., Strauss, C. K., Hilborn, R., Melnychuk, M. C., Branch, T. A., Gaines, S. D., Szuwalski, C. S., Cabral, R. B., & Rader, D. N. (2016). Global fishery prospects under contrasting management regimes. Proceedings of the national academy of sciences, 201520420.

Costello, C., Ovando, D., Hilborn, R., Gaines, S. D., Deschenes, O., & Lester, S. E. (2012). Status and solutions for the world's unassessed fisheries. Science, 1224768.

Cowen, R. K., Paris, C. B., & Srinivasan, A. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. Science, 311(5760), 522-527.

Cox, S. P., Essington, T. E., Kitchell, J. F., Martell, S. J., Walters, C. J., Boggs, C., & Kaplan, I. (2002). Reconstructing ecosystem dynamics in the central Pacific Ocean, 1952 1998. II. A preliminary assessment of the trophic impacts of fishing and effects on tuna dynamics. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 59(11), 1736-1747.

Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R., Mace, G. M., & Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in ecology & evolution, 15(7), 290-295.

Cullis-Suzuki, S., & Pauly, D. (2010). Failing the high seas: a global evaluation of regional fisheries management organizations. Marine Policy, 34(5), 1036-1042.

Damm, S., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2010). An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. Molecular ecology, 19(18), 3881-3893.

Danovaro, R., Dell'Anno, A., Pusceddu, A., Gambi, C., Heiner, I., & Kristensen, R. M. (2010). The first metazoa living in permanently anoxic conditions. BMC biology, 8(1), 30.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods, 9(8), 772.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. Biological journal of the Linnean society, 85(3), 407-415.

De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. Systematic biology, 56(6), 879-886.

Dépraz, A., Hausser, J., & Pfenninger, M. (2009). A species delimitation approach in the *Trochulus sericeus*/*hispidus* complex reveals two cryptic species within a sharp contact zone. BMC Evolutionary Biology, 9(1), 171.

DeSalle, R. O. B. (2006). Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. Conservation Biology, 20(5), 1545-1547.

Dizon, A. E., Lockyer, C., Perrin, W. F., Demaster, D. P., & Sisson, J. (1992). Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. Conservation Biology, 6(1), 24-36.

Domingues, R. R., Okuda, G., Bernard, A. M., Amorim, A. F., De Biasi, J., & Hilsdorf, A. W. (2015). A DNA tool for the identification of heavily exploited Atlantic billfishes. Conservation genetics resources, 7(4), 807-809.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular biology and evolution, 29(8), 1969-1973.

Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. E. T. H., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. Molecular biology and evolution, 22(5), 1185-1192.

Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., Krück, N. C., Morgan, J. A. T., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. Journal of Fish Biology, 80(5), 1789-1843.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic acids research, 32(5), 1792-1797.

Ely, B., Viñas, J., Bremer, J. R. A., Black, D., Lucas, L., Covello, K., Labrie, A.V., & Thelen, E. (2005). Consequences of the historical demography on the global population structure of two

highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). BMC Evolutionary Biology, 5(1), 19.

Erhardt, N. M., & Fitchet, M. D. (2006). On the seasonal dynamic characteristics of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the Eastern Pacific off Cental America. Bulletin of Marine Science, 79(3), 589-606.

Ersts, P. J. (2011). Geographic distance matrix generator (version 1.2. 3). American Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation, 1-4.

Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. Molecular Ecology, 13(4), 853-864.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131(2), 479-491.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources, 10(3), 564-567.

Fairbanks, R. G. (1989). A 17,000-year glacio-eustatic sea level record: influence of glacial melting rates on the Younger Dryas event and deep-ocean circulation. Nature, 342(6250), 637.

FAO (2016). Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets. Text by Jean- Francois Pulvenis. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 7 July 2016. [Cited 6 February 2018]. http://www.fao.org/fishery/

Felsenstein, J., & Churchill, G. A. (1996). A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. Molecular biology and evolution, 13(1), 93-104.

Fierstine, H. L. (2006). Fossil history of billfishes (Xiphioidei). Bulletin of Marine Science, 79(3), 433-453.

Fierstine, H. L., & Voigt, N. L. (1996). Use of rostral characters for identifying adult billfishes (Teleostei: Perciformes: Istiophoridae and Xiphiidae). Copeia, 148-161.

Finnerty, J. R. & Block, B. (1995). Evolution of cytochrome b in Scombroidei (Teleostei): molecular insight into billfish (Istiophoridae and Xiphiidae) relationships. Fishery Bulletin, 93(1), 78-96.

Fontaneto, D., Herniou, E. A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C., & Barraclough, T. G. (2007). Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. PLoS biology, 5(4), e87.

Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.

Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147(2), 915-925.

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. Systematic biology, 62(5), 707-724.

Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. Trends in ecology & evolution, 27(9), 480-488.

Garcia, S. M., & Rosenberg, A. A. (2010). Food security and marine capture fisheries: characteristics, trends, drivers and future perspectives. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1554), 2869-2880.

Gauldie, R. W. (1991). Taking stock of genetic concepts in fisheries management. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48(4), 722-731.

Gernhard, T. (2008). The conditioned reconstructed process. Journal of theoretical biology, 253(4), 769-778.

Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D. M., & Hood, M. E. (2008). Speciation in fungi. Fungal Genetics and Biology, 45(6), 791-802.

Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. Heredity, 101(4), 301.

Goetze, E. (2010). Species discovery in marine planktonic invertebrates through global molecular screening. Molecular Ecology, 19(5), 952-967.

Graves, J. E. (1998). Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. Journal of Heredity, 89(5), 427-437.

Graves, J. E., & McDowell, J. R. (2003). Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. Marine and Freshwater Research, 54(4), 287-298.

Graves, J. E., & McDowell, J. R. (2006). Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. Bulletin of Marine Science, 79(3), 469-482.

Graves, J. E., & McDowell, J. R. (2015). Population structure of istiophorid billfishes. Fisheries Research, 166, 21-28.

Gregory, W. K., & Conrad, G. M. (1937). The comparative osteology of the swordfish (*Xiphias*) and the sailfish (*Istiophorus*). American Museum novitates; no. 952.

Hanebuth, T., Stattegger, K., & Grootes, P. M. (2000). Rapid flooding of the Sunda Shelf: a late-glacial sea-level record. Science, 288(5468), 1033-1035.

Hanner, R., Floyd, R., Bernard, A., Collette, B. B., & Shivji, M. (2011). DNA barcoding of billfishes. Mitochondrial dna, 22(sup1), 27-36.

Harpending, H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human biology, 591-600.

Hauser, L., Adcock, G. J., Smith, P. J., Ramírez, J. H. B., & Carvalho, G. R. (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(18), 11742-11747.

Head, M. J., & Gibbard, P. L. (2005). Early-Middle Pleistocene transitions: an overview and recommendation for the defining boundary. Geological Society, London, Special Publications, 247(1), 1-18.

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270 (Suppl 1), S96-S99.

Hedges, S. B., Dudley, J., & Kumar, S. (2006). TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. Bioinformatics, 22(23), 2971-2972.

Hedges, S. B., Marin, J., Suleski, M., Paymer, M., & Kumar, S. (2015). Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. Molecular biology and evolution, 32(4), 835-845.

Hellberg, M. E. (2009). Gene flow and isolation among populations of marine animals. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 40.

Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., & Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. Bulletin of marine science, 70(1), 273-290.

Herbert, T. D., Lawrence, K. T., Tzanova, A., Peterson, L. C., Caballero-Gill, R., & Kelly, C. S. (2016). Late Miocene global cooling and the rise of modern ecosystems. Nature Geoscience, 9(11), 843.

Herbert-Read, J. E. (2016). Understanding how animal groups achieve coordinated movement. Journal of Experimental Biology, 219(19), 2971-2983.

Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P.F., & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. Molecular Phylogenetics and Evolution, 54(1), 291-301.

Hickerson, M. J., Meyer, C. P., & Moritz, C. (2006). DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. Systematic Biology, 55(5), 729-739.

Hilborn, R., Quinn, T. P., Schindler, D. E., & Rogers, D. E. (2003). Biocomplexity and fisheries sustainability. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(11), 6564-6568.

Hoagland, K. E. (1996). The taxonomic impediment and the convention on biodiversity. Association of Systematics Collections Newsletter, 24(5), 61-62.

Hoarau, G., Boon, E., Jongma, D. N., Ferber, S., Palsson, J., Van der Veer, H. W., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2005). Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa L.*). Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 272(1562), 497-503.

Hoolihan, J. P. (2006). Age and growth of Indo-Pacific sailfish, *Istiophorus platypterus*, from the Arabian Gulf. Fisheries Research, 78(2-3), 218-226.

Hsieh, H. S., Chai, T. J., & Hwang, D. F. (2005). Rapid PCR-RFLP method for the identification of 5 billfish species. Journal of food science, 70(4), C246-C249.

Hsieh, H. S., Chai, T. J., & Hwang, D. F. (2007). Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. Food Control, 18(4), 369-374.

Slatkin, M., & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129(2), 555-562.

ICCAT (2013). Report of the Standing Committee for Research and Statistics. ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas), Madrid, Spain (340 pp).

Ihssen, P. E., Evans, D. O., Christie, W. J., Reckahn, J. A., & DesJardine, R. L. (1981). Life history, morphology, and electrophoretic characteristics of five allopatric stocks of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in the Great Lakes region. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38(12), 1790-1807.

Innes, B. H., Grewe, P. M., & Ward, R. D. (1998). PCR-based genetic identification of marlin and other billfish. Marine and freshwater research, 49(5), 383-388.

Inniss, L., Simcock, A., Ajawin, A. Y., Alcala, A. C., Bernal, P., Calumpong, H. P., Araghi, P.E., Green, S.O., Harris, P., Kamara, O.K., & Kohata, K. (2016). The first global integrated marine assessment. United Nations. Accessed at on 5th February.

IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. (http://www.iucnredlist.org). Downloaded on 24 February 2018.

Johnson, G. D. (1986). Scombroid phylogeny: an alternative hypothesis. Bulletin of Marine Science, 39(1), 1-41.

Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. F., & Yonekawa, H. (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(10), 4542-4546.

Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. Bioinformatics, 33(11), 1630-1638.

Kar, A. B., Ramalingam, L., & Govindaraj, K. (2015). Age and growth of Indo-Pacific Sailfish, *Istiophorus platypterus* (Shaw and Nodder, 1792) in the Andaman and Nicobar waters.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28(12), 1647-1649.

Kenchington, E., Heino, M., & Nielsen, E. E. (2003). Managing marine genetic diversity: time for action?. ICES Journal of Marine Science, 60(6), 1172-1176.

Keigwin, L. D. (1969). North atlantic late miocene stable-isotope stratigraphy, biostratigraphy, and magnetostratigraphy1. Initial Reports of the Deep-Sea Drilling Project: A Project Planned by and Carried Out with the Advice of the Joint Oceanographic Institutions for Deep Earth Sampling, 94, 935.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular evolution, 16(2), 111-120.

Kingman, J. F. C. (1982). The coalescent. Stochastic processes and their applications, 13(3), 235-248.

Kitchell, J. F., Martell, S. J., Walters, C. J., Jensen, O. P., Kaplan, I. C., Watters, J., Essington, T. E., & Boggs, C. H. (2006). Billfishes in an ecosystem context. Bulletin of Marine Science, 79(3), 669-682.

Klanten, O. S., Choat, J. H., & van Herwerden, L. (2007). Extreme genetic diversity and temporal rather than spatial partitioning in a widely distributed coral reef fish. Marine Biology, 150(4), 659-670.

Knutsen, H., Jorde, P. E., André, C., & Stenseth, N. C. H. R. (2003). Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. Molecular ecology, 12(2), 385-394.

Krebs, C. J. (1996). Population cycles revisited. Journal of mammalogy, 77(1), 8-24.

Kritzer, J. P., & Sale, P. F. (2010). Marine metapopulations. Academic Press.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution, 33(7), 1870-1874.

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., & Hedges, S. B. (2017). TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. Molecular Biology and Evolution, 34(7), 1812-1819.

Laikre, L., Palm, S., & Ryman, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. AMBIO: A Journal of the Human Environment, 34(2), 111-119.

Lam, C. H., Galuardi, B., Mendillo, A., Chandler, E., & Lutcavage, M. E. (2016). Sailfish migrations connect productive coastal areas in the West Atlantic Ocean. Scientific reports, 6, 38163.

Lanave, C., Preparata, G., Sacone, C., & Serio, G. (1984). A new method for calculating evolutionary substitution rates. Journal of molecular evolution, 20(1), 86-93.

Le Manach, F., Andriamahefazafy, M., Harper, S., Harris, A., Hosch, G., Lange, G. M., Zeller, D., & Sumaila, U. R. (2013). Who gets what? Developing a more equitable framework for EU fishing agreements. Marine Policy, 38, 257-266.

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, 6(9), 1110-1116.

Lesack, K., & Naugler, C. (2011). An open-source software program for performing Bonferroni and related corrections for multiple comparisons. Journal of pathology informatics, 2.

Little, A. G., Lougheed, S. C., & Moyes, C. D. (2010). Evolutionary affinity of billfishes (Xiphiidae and Istiophoridae) and flatfishes (Plueronectiformes): Independent and trans-subordinal origins of endothermy in teleost fishes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 56(3), 897-904.

Lu, C. P., Smith, B. L., Hinton, M. G., & Bremer, J. R. A. (2016). Bayesian analyses of Pacific swordfish (*Xiphias gladius L.*) genetic differentiation using multilocus single nucleotide polymorphism (SNP) data. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 482, 1-17.

Ludt, W. B., & Rocha, L. A. (2015). Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. Journal of Biogeography, 42(1), 25-38.

Mamoozadeh, N. R., McDowell, J. R., Rooker, J. R., Graves, J. E., & Handling editor: Lorenz Hauser. (2017). Genetic evaluation of population structure in white marlin (*Kajikia albida*): the importance of statistical power. ICES Journal of Marine Science, 75(2), 892-902.

Marras, S., Noda, T., Steffensen, J. F., Svendsen, M. B., Krause, J., Wilson, A. D., Kurvers, R. H., Herbert-Read, J., Boswell, K. M., & Domenici, P. (2015). Not so fast: swimming behavior of sailfish during predator–prey interactions using high-speed video and accelerometry. Integrative and comparative biology, 55(4), 719-727.

Martínez, P., González, E. G., Castilho, R., & Zardoya, R. (2006). Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). Molecular phylogenetics and evolution, 39(2), 404-416.

Martinez-Takeshita, N., Purcell, C. M., Chabot, C. L., Craig, M. T., Paterson, C. N., Hyde, J. R., & Allen, L. G. (2015). A tale of three tails: cryptic speciation in a globally distributed marine fish of the genus *Seriola*. Copeia, 103(2), 357-368.

McDowell, J. R., & Graves, J. E. (2002). Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. Fishery Bulletin, 100(3), 537-544.

McDowell, J. R., & Graves, J. E. (2008). Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 65(7), 1307-1320.

McDowell, J. R., Carlsson, E. L., & Graves, J. E. (2007). Genetic analysis of blue marlin (*Makaira nigricans*) stock structure in the Atlantic Ocean. Gulf and Caribbean Research, 19(2), 75-82.

McElhany, P., Ruckelshaus, M. H., Ford, M. J., Wainwright, T. C., & Bjorkstedt, E. P. (2000). Viable salmonid populations and the recovery of evolutionarily significant units. US Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC, 42, 156.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010 (pp. 1-8). Ieee.

Miller, S. E. (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(12), 4775-4776.

Miya, M., Friedman, M., Satoh, T. P., Takeshima, H., Sado, T., Iwasaki, W., Yamanoue, Y., Nakatani, M., Mabuchi, K., Inoue, J. G., & Poulsen, J. Y. (2013). Evolutionary origin of the Scombridae (tunas and mackerels): members of a Paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families. PloS one, 8(9), e73535.

Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N. B., Inoue, J. G., Mukai, T., Satoh, T. P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., & Shirai, S. M. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Molecular phylogenetics and evolution, 26(1), 121-138.

Mohan Dey, M., Rab, M. A., Paraguas, F. J., Piumsombun, S., Bhatta, R., Ferdous Alam, M., & Ahmed, M. (2005). Fish consumption and food security: a disaggregated analysis by types of fish and classes of consumers in selected Asian countries. Aquaculture Economics & Management, 9(1-2), 89-111.

Montes, I., Iriondo, M., Manzano, C., Arrizabalaga, H., Jiménez, E., Pardo, M. Á., Goñi, N., Davies, C.A., & Estonba, A. (2012). Worldwide genetic structure of albacore *Thunnus alalunga* revealed by microsatellite DNA markers. Marine Ecology Progress Series, 471, 183-191.

Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. Trends in ecology & evolution, 9(10), 373-375.

Mourato, B. L., Carvalho, F., Musyl, M., Amorim, A., Pacheco, J. C., Hazin, H., & Hazin, F. (2014). Short-term movements and habitat preferences of sailfish, *Istiophorus platypterus* (Istiophoridae), along the southeast coast of Brazil. Neotropical Ichthyology, 12(4), 861-870.

Mourato, B. L., Pinheiro, P., Hazin, F. H., Basante, V., Amorim, A. F., Pimenta, E., & Guimarães, C. (2009). Preliminary analysis of gonad development, spawning period, sex ratio and length at first sexual maturity of sailfish, Istiophorus platypterus in Brazilian coast. Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 64(6), 1927-1940.

Munro, G. R. (1990). The optimal management of transboundary fisheries: game theoretic considerations. Natural Resource Modeling, 4(4), 403-426.

Myers, R. A., & Worm, B. (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. Nature, 423(6937), 280.

Myers, R. A., & Worm, B. (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 360(1453), 13-20.

Nachman, M. W., Boyer, S. N., & Aquadro, C. F. (1994). Nonneutral evolution at the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(14), 6364-6368.

Nakamura, I. (1985). Billfishes of the World: an annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. FAO Species Catalogue, Vol. 5. FAO fisheries synopsis. Rome, 125, 66pp.

Nielsen, J. L. (1995). Evolution and the aquatic ecosystem: defining unique units in population conservation. In American Fisheries Society Symposium. 1995.

Nielsen, R., & Matz, M. (2006). Statistical approaches for DNA barcoding. Systematic biology, 55(1), 162-169.

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.

Nelson, J. S., Crossman, E. J., Espinosa-Perez, H., Findley, L. T., Gilbert, C. R., Lea, R. N., & Williams, J. D. (2004). Common and scientific names of fishes from the United States, Canada and Mexico. American Fisheries Society.

Nielsen, R., & Wakeley, J. (2001). Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. Genetics, 158(2), 885-896.

O'Meara, B. C. (2009). New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. Systematic Biology, 59(1), 59-73.

Orrell, T. M., Collette, B. B., & Johnson, G. D. (2006). Molecular data support separate scombroid and xiphioid clades. Bulletin of Marine Science, 79(3), 505-519.

Ortiz, M., Prince, E. D., Serafy, J. E., Holts, D. B., Davy, K. B., Pepperell, J. G., Lowry, M. B., & Holdsworth, J. C. (2003). Global overview of the major constituent-based billfish tagging programs and their results since 1954. Marine and Freshwater Research, 54(4), 489-507.

Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. Frontiers in zoology, 7(1), 16.

Palumbi, S. R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual review of ecology and systematics, 25(1), 547-572.

Pauly, D. & Zeller, D. (2015). Sea Around Us Concepts, Design and Data. http://www.seaaroundus.org

Pauly, D. (2008). Global fisheries: a brief review. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 9, 3-9.

Pauly, D., & Zeller, D. (2016). Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. Nature communications, 7, ncomms10244.

Pauly, D., Belhabib, D., Blomeyer, R., Cheung, W. W., Cisneros-Montemayor, A. M., Copeland, D., Copeland, D., Harper, S., Lam, V. W., Mai, Y., Le Manach, F., & Österblom, H. (2014). China's distant-water fisheries in the 21st century. Fish and Fisheries, 15(3), 474-488.

Pauly, D., Christensen, V., Dalsgaard, J., Froese, R., & Torres, F. (1998). Fishing down marine food webs. Science, 279(5352), 860-863.

Pillans, B., Chappell, J., & Naish, T. R. (1998). A review of the Milankovitch climatic beat: template for Plio–Pleistocene sea-level changes and sequence stratigraphy. Sedimentary Geology, 122(1-4), 5-21.

Pitcher, T.J. (2012). Fisheries. In Berkshire encyclopedia of sustainability Volume 10: The future of sustainability, eds. I Spellerberg.

Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Systematic biology, 55(4), 595-609.

Potthoff, T., Richards, W. J., & Ueyanagi, S. (1980). Development of *Scombrolabrax heterolepis* (Pisces, Scombrolabracidae) and comments on familial relationships. Bulletin of Marine Science, 30(2), 329-357.

Prince, E. D., & Goodyear, C. P. (2006). Hypoxia-based habitat compression of tropical pelagic fishes. Fisheries Oceanography, 15(6), 451-464.

Prince, E. D., Lee, D. W., Wilson, C. A., & Dean, J. M. (1986). Longevity and age validation of a tag-recaptured atlantic sailfish, *Istiophorus platypterus*, using dorsal spines and otoliths. Fishery Bulletin, 84(3), 493-502.

Prince, E. D., Luo, J., Phillip Goodyear, C., Hoolihan, J. P., Snodgrass, D., Orbesen, E. S., Serafy, J. E., Ortiz, M., & Schirripa, M. J. (2010). Ocean scale hypoxia-based habitat compression of Atlantic istiophorid billfishes. Fisheries Oceanography, 19(6), 448-462.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012a). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. Molecular ecology, 21(8), 1864-1877.

Punt, A. E., Cope, J. M., & Haltuch, M. A. (2008). Reference points and decision rules in US federal fisheries: West coast groundfish experiences. In American Fisheries Society Symposium (Vol. 49, No. 2, p. 1343). American Fisheries Society.

Purcell, C. M., & Edmands, S. (2011). Resolving the genetic structure of striped marlin, *Kajikia audax*, in the Pacific Ocean through spatial and temporal sampling of adult and immature fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 68(11), 1861-1875.

Ray, N., Currat, M., & Excoffier, L. (2003). Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. Molecular Biology and Evolution, 20(1), 76-86.

Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2017). TreeAnnotator v1. 8.4. Available as part of the BEAST package at http://beast.bio.ed.ac.uk

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M.A. (2018). Tracer v1.7. http://beast.community/tracer

Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular biology and evolution, 19(12), 2092-2100.

Rand, D. M. (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology and Systematics, 32(1), 415-448.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Resources, 7(3), 355-364.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2013). A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. PloS one, 8(7), e66213.

Reid, N. M., & Carstens, B. C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. BMC Evolutionary Biology, 12(1), 196.

Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., & Wolff, W. J. (2009). Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. Fish and Fisheries, 10(4), 361-395.

Robins, C. R., & de Sylva, D. P. (1963). A new western Atlantic spearfish, *Tetrapturus pfluegeri*, with a redescription of the Mediterranean spearfish Tetrapturus belone. Bulletin of Marine Science, 13(1), 84-122.

Roff, J. (2013). Marine conservation ecology. Routledge.

Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular biology and evolution, 9(3), 552-569.

Rosas-Alayola, J., Hernández-Herrera, A., Galvan-Magaña, F., Abitia-Cárdenas, L. A., & Muhlia-Melo, A. F. (2002). Diet composition of sailfish (*Istiophorus platypterus*) from the southern Gulf of California, Mexico. Fisheries Research, 57(2), 185-195.

Rosas-Alayola, J., Hernández-Herrera, A., Galvan-Magaña, F., Abitia-Cárdenas, L. A., & Muhlia-Melo, A. F. (2002). Diet composition of sailfish (*Istiophorus platypterus*) from the southern Gulf of California, Mexico. Fisheries Research, 57(2), 185-195.

Rocha, L. A. (2003). Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. Journal of Biogeography, 30(8), 1161-1171.

Roser, M. & Ortiz-Ospina, E. (2018). World Population Growth. Published online at OurWorldInData.org. https://ourworldindata.org/world-population-growth

Ross, K. G., Gotzek, D., Ascunce, M. S., & Shoemaker, D. D. (2009). Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. Systematic biology, 59(2), 162-184.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular biology and evolution, 34(12), 3299-3302.

Rubio-Castro, G. G., Quiñonez-Velázquez, C., & García-Rodríguez, F. J. (2016). Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfish *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific. Fisheries science, 82(2), 241-249.

Sale, P. F., Cowen, R. K., Danilowicz, B. S., Jones, G. P., Kritzer, J. P., Lindeman, K. C., Planes, S., Polunin, N. V., Russ, G. R., Sadovy, Y. J., & Steneck, R. S. (2005). Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. Trends in ecology & evolution, 20(2), 74-80.

Santini, F., & Sorenson, L. (2013). First molecular timetree of billfishes (Istiophoriformes: Acanthomorpha) shows a Late Miocene radiation of marlins and allies. Italian journal of zoology, 80(4), 481-489.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and environmental microbiology, 75(23), 7537-7541.

Schneider, S., & Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. Genetics, 152(3), 1079-1089.

Scholtens, J., & Bavinck, M. (2014). Lessons for legal pluralism: investigating the challenges of transboundary fisheries governance. Current Opinion in Environmental Sustainability, 11, 10-18.

Secor, D. H. (1999). Specifying divergent migrations in the concept of stock: the contingent hypothesis. Fisheries Research, 43(1-3), 13-34.

Seeb, L. W., Antonovich, A., Banks, M. A., Beacham, T. D., Bellinger, M. R., Blankenship, S. M., Campbell, M. R., Decovich, N. A., Garza, J. C., Guthrie Iii, C. M., & Lundrigan, T. A. (2007). Development of a standardized DNA database for Chinook salmon. Fisheries, 32(11), 540-552.

Seijo, J. C., Pérez, E. P., & Caddy, J. F. (2004). A simple approach for dealing with dynamics and uncertainty in fisheries with heterogeneous resource and effort distribution. Marine and Freshwater Research, 55(3), 249-256.

Shimose, T., Yokawa, K., & Saito, H. (2010). Habitat and food partitioning of billfishes (Xiphioidei). Journal of Fish Biology, 76(10), 2418-2433.

Shivji, M. S., Magnussen, J. E., Beerkircher, L. R., Hinteregger, G., Lee, D. W., Serafy, J. E., & Prince, E. D. (2006). Validity, identification, and distribution of the roundscale spearfish, *Tetrapturus georgii* (Teleostei: Istiophoridae): morphological and molecular evidence. Bulletin of Marine Science, 79(3), 483-491.

Simpson, G. G. (1951). The species concept. Evolution, 5(4), 285-298.

Sims, D. W., Southall, E. J., Humphries, N. E., Hays, G. C., Bradshaw, C. J., Pitchford, J. W., James, A., Ahmed, M. Z., Brierley, A. S., Hindell, M. A., & Morritt, D. (2008). Scaling laws of marine predator search behaviour. Nature, 451(7182), 1098.

Slatkin, M. (2005). Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations. Molecular Ecology, 14(1), 67-73.

Slatkin, M., & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129(2), 555-562.

Sorenson, L., McDowell, J. R., Knott, T., & Graves, J. E. (2013). Assignment test method using hypervariable markers for blue marlin (*Makaira nigricans*) stock identification. Conservation Genetics Resources, 5(1), 293-297.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, 30(9), 1312-1313.

Steneck, R. S., & Wilson, J. A. (2010). A fisheries play in an ecosystem theater: challenges of managing ecological and social drivers of marine fisheries at multiple spatial scales. Bulletin of Marine Science, 86(2), 387-411.

Stephenson, R. L. (1999). Stock complexity in fisheries management: a perspective of emerging issues related to population sub-units. Fisheries Research, 43(1-3), 247-249.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. Trends in ecology & evolution, 15(5), 199-203.

Swartz, W., Sala, E., Tracey, S., Watson, R., & Pauly, D. (2010a). The spatial expansion and ecological footprint of fisheries (1950 to present). PloS one, 5(12), e15143.

Swartz, W., Sumaila, U. R., Watson, R., & Pauly, D. (2010b). Sourcing seafood for the three major markets: The EU, Japan and the USA. Marine Policy, 34(6), 1366-1373.

Swearer, S. E., Shima, J. S., Hellberg, M. E., Thorrold, S. R., Jones, G. P., Robertson, D. R., Morgan, S. G., Selkoe, K. A., Ruiz, G. M., & Warner, R. R. (2002). Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. Bulletin of Marine Science, 70(1), 251-271.

Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on mathematics in the life sciences, 17(2), 57-86.

Taylor, M. S., & Hellberg, M. E. (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. Science, 299(5603), 107-109.

Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 19(3), 265.

Thorson, J. T., Branch, T. A., & Jensen, O. P. (2012). Using model-based inference to evaluate global fisheries status from landings, location, and life history data. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 69(4), 645-655.

Towns, J., Cockerill, T., Dahan, M., Foster, I., Gaither, K., Grimshaw, A., Hazlewood, V., Lathrop, S., Lifka, D., Peterson, G. D., & Roskies, R. (2014). XSEDE: accelerating scientific discovery. Computing in Science & Engineering, 16(5), 62-74.

Tsai, C. N., Chiang, W. C., Sun, C. L., Shao, K. T., Chen, S. Y., & Yeh, S. Z. (2014). Trophic size-structure of sailfish *Istiophorus platypterus* in eastern Taiwan estimated by stable isotope analysis. Journal of fish biology, 84(2), 354-371.

van der Straten, K. M., Collette, B. B., Leung, L. K. P., & Johnston, S. D. (2006). Sperm morphology of the black marlin (*Makaira indica*) differs from scombroid sperm. Bulletin of Marine Science, 79(3), 839-845.

Videler, J. J. (1993). Fish swimming (Vol. 10). Springer Science & Business Media.

Vinãs, J., Gordoa, A., Fernández-Cebrián, R., Pla, C., Vahdet, Ü., & Araguas, R. M. (2011). Facts and uncertainties about the genetic population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. Implications for fishery management. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 21(3), 527-541.

Vogler, A. P., & Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 45(1), 1-10.

Voris, H. K. (2000). Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. Journal of Biogeography, 27(5), 1153-1167.

Waldman, J. R. (1999). The importance of comparative studies in stock analysis. Fisheries Research, 43(1-3), 237-246.

Walker, B., & Salt, D. (2012). Resilience thinking: sustaining ecosystems and people in a changing world. Island Press.

Waples, R. S. (1995). Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. In Am Fish Soc Symp (Vol. 17, pp. 8-27).

Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. Journal of Heredity, 89(5), 438-450.

Waples, R. S., & Gaggiotti, O. (2006). INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Molecular ecology, 15(6), 1419-1439.

Waples, R. S., Punt, A. E., & Cope, J. M. (2008). Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better?. Fish and Fisheries, 9(4), 423-449.

Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. Journal of fish biology, 74(2), 329-356.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 360(1462), 1847-1857.

Watson, R., & Pauly, D. (2001). Systematic distortions in world fisheries catch trends. Nature, 414(6863), 534.

Wetterstrand, K. A. (2016). DNA sequencing costs: data from the NHGRI Genome sequencing program (GSP). 2013. http://www. genome. gov/sequencingcosts

Wiemers, M., & Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist?–a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). Frontiers in zoology, 4(1), 8.

Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. Systematic Biology, 56(6), 875-878.

Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. Systematic biology, 54(5), 844-851.

Williams, S. M., Bennett, M. B., Pepperell, J. G., Morgan, J. A., & Ovenden, J. R. (2016). Spatial genetic subdivision among populations of the highly migratory black marlin *Istiompax indica* within the central Indo-Pacific. Marine and Freshwater Research, 67(8), 1205-1214.

Williams, S. M., McDowell, J. R., Bennett, M., Graves, J. E., & Ovenden, J. R. (2018). Analysis of whole mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of istiophorid billfishes. Bulletin of Marine Science, 94(1), 73-84.

Willoughby, J. R., Fernandez, N. B., Lamb, M. C., Ivy, J. A., Lacy, R. C., & DeWoody, J. A. (2015). The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. Molecular Ecology, 24(1), 98-110.

Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Jackson, J.B., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., & Sala, E. (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. science, 314(5800), 787-790.

Worm, B., Hilborn, R., Baum, J. K., Branch, T. A., Collie, J. S., Costello, C., Fogarty, M.J., Fulton, E.A., Hutchings, J.A., Jennings, S., & Jensen, O. P. (2009). Rebuilding global fisheries. science, 325(5940), 578-585.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. Ann. Eugenics, 15: 323-354.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 395-420.

Wright, S. (1978). The relation of livestock breeding to theories of evolution. Journal of Animal Science, 46(5), 1192-1200.

Xia, X. (2017). DAMBE6: new tools for microbial genomics, phylogenetics, and molecular evolution. Journal of Heredity, 108(4), 431-437.

Xia, X., & Lemey, P. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny, 2, 615-630.

Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., & Wang, Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. Molecular phylogenetics and evolution, 26(1), 1-7.

Yeates, D. K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S. L., Joseph, L. E. O., & Trueman, J. W. (2011). Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. Systematic Entomology, 36(2), 209-217.

Ying, Y., Chen, Y., Lin, L., & Gao, T. (2011). Risks of ignoring fish population spatial structure in fisheries management. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 68(12), 2101-2120.

Yule, G. U. (1925). A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, FR S. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 213(402-410), 21-87.

Zeller, D., Booth, S., Davis, G., & Pauly, D. (2007). Re-estimation of small-scale fishery catches for US flag-associated island areas in the western Pacific: the last 50 years. Fishery Bulletin.

Zeller, D., Cashion, T., Palomares, M., & Pauly, D. (2018). Global marine fisheries discards: A synthesis of reconstructed data. Fish and Fisheries, 19(1), 30-39.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics, 29(22), 2869-2876.