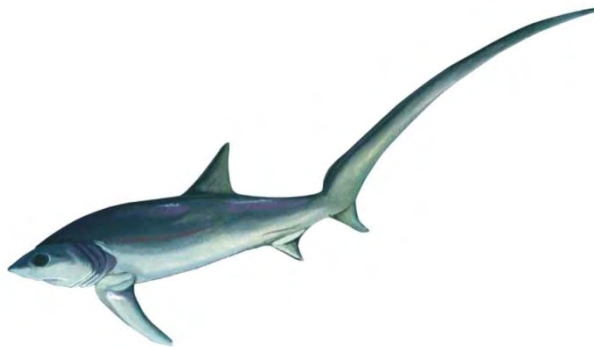


Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética

Análise genética do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando a região controle do DNA mitocondrial.



Millke Jasmine Arminini Morales

Botucatu/SP

Julho/2012

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética

Análise genética do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando região controle do DNA mitocondrial.

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

Millke Jasmine Arminini Morales

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Botucatu/SP

Julho/2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Morales, Millke Jasmine Arminini.

Análise genética do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando região controle do DNA mitocondrial / Millke Jasmine Arminini Morales. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Tubarão – Genética. 2. Atlântico, Oceano. 3. Mitochondria. 4. DNA.

Palavras-chave: *Alopias superciliosus*; Biodiversidade marinha; D-loop; Estoques pesqueiros; Tubarões.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



FCT

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



*Dedico a meus pais, Roberto e Vanda,
meus maiores exemplos.*

Agradecimentos

Agradeço

Ao meu orientador professor Fausto Foresti pela oportunidade e por confiar a mim este trabalho. Muito obrigado pelo apoio, incentivo e compreensão no decorrer de toda essa caminhada.

Ao meu co-orientador Fernando Fernandes Mendonça pela oportunidade no grupo e apoio durante a execução deste estudo. Trabalhar com elasmobrânquios foi uma experiência muito boa. Obrigado!

Ao professor Claudio de Oliveira pelas oportunidades, além da disposição em ensinar e ajudar sempre.

Ao professor Rui Coelho, da Universidade do Algarve - Portugal, pela contribuição na viabilização deste estudo, além do essencial suporte teórico.

À professora Vera Solferini e à Elen Peres, pelas ideias e disposição em ajudar com as análises.

Ao Programa Pós-Graduação em Genética pela qualidade empregada em nossa formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa e pelo suporte financeiro do projeto.

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

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu pelos auxílios teóricos e práticos, além dos ensinamentos dentro e fora do laboratório.

À Lílian pela amizade e companhia de tantos anos. Às amigas que encontrei e reencontrei em Botucatu, Otillie, Daniele, Sergianne, Amanda, Luz, Tatiane, Gleisy, Isabelle, pelo apoio, pelas risadas, pelos abraços, pelos ensinamentos, pelo companheirismo. Com certeza, concluir essa etapa foi bem mais fácil, e divertido, graças à vocês!

Aos amigos Thiesa e Phelipe um muito obrigado especial. É imensurável o quanto o apoio de vocês foi fundamental nessa parte da minha história. Vocês foram, e sempre vão ser, muito importantes para mim.

Por fim agradeço à minha família, minha base, minha fonte incondicional de apoio, carinho e dedicação. Estar aqui só vale a pena porque tenho vocês!

Resumo

As populações de tubarões têm sofrido um acentuado declínio nas últimas décadas principalmente devido à pressão da pesca para provisão de alimento e à valorização das nadadeiras no mercado asiático. Como as espécies deste grupo se caracterizam por sua suscetibilidade aos efeitos da sobre-pesca, questões relacionadas ao status populacional são essenciais para o manejo correto dos estoques pesqueiros. Para a identificação destes estoques, ferramentas genéticas que acessam a variabilidade das espécies são eficientes e têm sido amplamente utilizadas. Considerando os fortes indícios de esgotamento populacional do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* e a falta de informações que permitem viabilizar planos de conservação, o presente estudo buscou abordar questões relacionadas à dinâmica populacional da espécie no Oceano Atlântico utilizando a região controle do DNA mitocondrial como marcador molecular. Assim, 114 indivíduos de *A. superciliosus* foram analisados utilizando sequências nucleotídicas da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial. Os 913 pares de bases analisáveis desta região do genoma permitiram a caracterização de apenas oito haplótipos em todas as amostras analisadas, sendo um único destes haplótipos compartilhado por 91,5% dos indivíduos. Os resultados indicam a ocorrência de uma baixa variabilidade genética ($\pi = 0,00140$ e $h = 0,152 \pm 0,0046$), a ausência de estruturação populacional (valores de F_{ST} e Φ_{ST} não significativos) e a caracterização de um único estoque pesqueiro na região abrangida pela amostragem no Oceano Atlântico. As análises também revelaram a existência de duas linhagens de DNAm distintas, separadas por um mínimo de 9 mutações e com aproximadamente 1,2% de diferença genética, sendo uma delas composta por apenas 6 indivíduos, originando 5 haplótipos distintos. Considera-se, pois, que esta linhagem de haplótipos raros poderia estar relacionada a migrações recentes provenientes do Oceano Índico, que teriam ocorrido logo após as últimas glaciações, em períodos de aquecimento da região da ressurgência de Benguela. Por outro lado, pode-se considerar que processos migratórios também podem estar ocorrendo atualmente, com a transferência intermitente de águas quentes do Oceano Índico para a região do Atlântico Sul. Tais acontecimentos poderiam estar, portanto, diretamente relacionados com o desenvolvimento, colonização e expansão populacional desta espécie nesta região oceânica, constituindo uma base para a caracterização do seu potencial evolutivo global, que deveriam ser urgentemente consideradas para auxiliar na elaboração de medidas mais efetivas para a conservação desta espécie.

Palavras-chave: D-loop, biodiversidade marinha, tubarões, *Alopias superciliosus*, estoques pesqueiros

Abstract

Populations of several shark species have decreased in the last decades, especially because of the fishing pressure and Asian demand for their fins. Since this group is susceptible to overfishing due to its biological traits, studies regarding its populations distribution are necessary for the appropriate management of their fish stocks. Genetic tools addressing species variability are efficient and widely used to the identification of fisheries stocks. Considering the lack of information about *A. superciliosus* populations, the remarkable decline in the abundance of this species around the world, and the lack of information management and conservation strategies, the aim of this study was solve issues about the populational dynamic of the species in the Atlantic Ocean. Using mitochondrial DNA control region (D-loop) sequences with 913 bp from 114 individuals of *Alopias superciliosus*, only eight haplotypes were found, which just one was shared by 91.5% of the analyzed sharks. The results suggest a low genetic variability ($\pi = 0.00140$ and $h=0.152 \pm 0.0046$), no populational structure (F_{ST} values and Φ_{ST} no significant), and the characterization of a single *A. superciliosus* stock in the Atlantic Ocean. In addition, it was found two distinct mtDNA lineages, separated by a minimum of nine mutational steps and about 1.2% genetic difference, one of which consists of only six individuals, resulting in five distinct haplotypes. Thus, this lineage showing rare haplotypes could be related to recent migration events from the Indian Ocean, which would have occurred right after the last glaciations, in warming periods at the region of the Benguela Upwelling. At the other hand, migration processes also can be happening nowadays, with intermittent transference of warm waters from the Indian Ocean to the South Atlantic region. Such events could be, therefore, straight related to the development, colonization and population spread of this species at this oceanic region, constituting a basis for characterizing its global evolutionary potential, which should be immediately taken into account when elaborating more effective actions to preserve this species.

Keywords: D-loop, marine biodiversity, sharks, *Alopias superciliosus*, fisheries stocks.

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação gráfica da espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*. (FAO 2009) 12
- Figura 2. Distribuição da espécie *Alopias superciliosus*. A faixa marcada representa áreas onde a espécie já foi encontrada (Compagno 2001) 13
- Figura 3. Localização dos pontos de captura e área de abrangência das correntes. Os pontos amarelos indicam os locais de captura. As áreas destacadas mostram a localização das correntes. Setas dentro de cada área destacada indicam a direção da corrente correspondente. As siglas indicam os nomes das correntes/populações. CF = Corrente da Flórida, CC = Corrente das Canárias, CG = Corrente da Guiné, CA = Corrente da Angola, COB = Corrente Oceânica de Benguela, CB = Corrente do Brasil e CNB = Corrente Norte do Brasil..... 27
- Figura 4.** Rede de haplótipos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam os haplótipos encontrados no presente estudo. Círculos pretos indicam haplótipos hipotéticos ancestrais ou não amostrados. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Populações diferentes são representadas com cores distintas e estão proporcionalmente mostradas dentro dos círculos. As linhas entre os haplótipos indicam diferença de 1 par de base (1 passo mutacional). As siglas indicam os nomes das correntes/populações - COB = Corrente Oceânica de Benguela; CA = Corrente da Angola; CG = Corrente da Guiné; CC = Corrente das Canárias; CNB = Corrente Norte do Brasil; CB = Corrente do Brasil e CF = Corrente da Flórida. 29
- Figura 5.** Árvore de haplótipos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* construída pelo método Neighbor-Joining, com modelo evolutivo Kimura 2p e com 1000 réplicas de bootstrap. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* e os haplótipos estão indicados como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 E H8..... 29

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Identificação e localização das amostras de <i>Alopias superciliosus</i> analisadas. * Amostra proveniente da região sudeste do Brasil, sem dados de coordenadas geográficas. ** Amostras da costa leste da Flórida, sem dados de coordenadas geográficas..... | 24 |
| Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas ampliações e sequenciamentos de partes da região controle e da subunidade I da região codificante da Citocromo Oxidase nas amostras de <i>A. superciliosus</i> | 26 |
| Tabela 3. Posição de cada sítio polimórfico encontrado na região controle do DNAmT com 913 pares de bases analisáveis, nas sequências obtidas das amostras de tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> . As letras indicam nucleotídeos (A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina) e variam de acordo com as mudanças encontradas em cada haplótipo. Os pontos pretos indicam a não variação da base, de acordo com o primeiro haplótipo listado (H1)..... | 30 |
| Tabela 4. Número de indivíduos por haplótipo de tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> e sua distribuição geográfica. 30 | |
| Tabela 5. Valores de F_{ST} calculados nas comparações par a par das populações do tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> . Nenhum destes valores obteve significância estatística ($p>0,05$)..... | 31 |
| Tabela 6. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e F_S de Fu) para cada população de <i>Alopias superciliosus</i> . A significância estatística considerada é $p<0,05$ para D de Tajima e $p>0,02$ para F_S de Fu. | 31 |
| Tabela 7. Matriz de distância genética par a par entre os haplótipos nas amostras analisadas de tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> | 31 |
| Tabela 8. Diversidade da região controle do DNAmT entre espécies de vertebrados marinhos. Análises globais são representadas, com exceção das marcadas com *. | 36 |

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 12 |
| 1.1 | <i>O tubarão-raposa <i>Alopias superciliosus</i> (Lowe 1841)</i> | 12 |
| 1.2 | <i>Exploração pesqueira de tubarões</i> | 15 |
| 1.3 | <i>Estrutura genética populacional de elasmobrânquios</i> | 17 |
| 2 | Objetivos | 20 |
| 3 | Material e Métodos..... | 21 |
| 3.1 | <i>Coleta de amostras.....</i> | 21 |
| 3.2 | <i>Extração do material genético, amplificação e sequenciamento do DNA.....</i> | 21 |
| 3.3 | <i>Análise das sequências</i> | 23 |
| 4 | Resultados | 28 |
| 5 | Discussão..... | 32 |
| 6 | Considerações finais..... | 37 |
| 7 | Referências | 38 |

1 Introdução

1.1 O tubarão-raposa *Alopias superciliosus* (Lowe 1841)

A espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*, representada na Figura 1, é um elasmobrânquio de ampla distribuição global pertencente à ordem Lamniformes e, juntamente com as outras duas espécies de tubarões-raposa, *Alopias vulpinus* e *Alopias pelagicus*, compõem a família Alopiidae (Compagno 2001). O tubarão-raposa-olhudo, como também é conhecido no Brasil, é facilmente distinguido das outras duas espécies do gênero por possuir olhos grandes e um sulco incomum em forma de “V” na região dorsal da cabeça (Soto 2001, Compagno 2001, Smith et al. 2008).

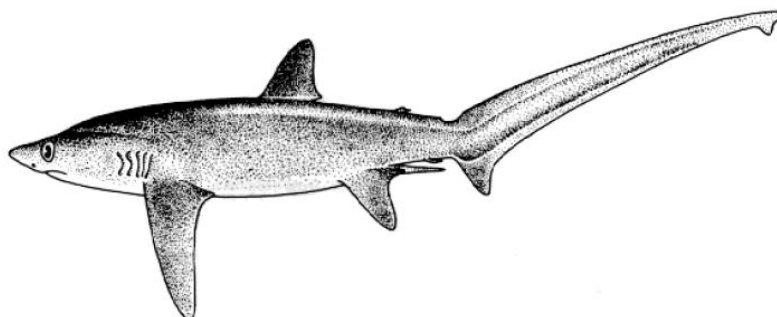


Figura 1. Representação gráfica da espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*. (FAO 2009)

Os tubarões da espécie *Alopias superciliosus* apresentam crescimento lento como característica, sendo de 484 cm o maior comprimento total (CT) registrado em um exemplar proveniente na região nordeste do Oceano Atlântico (Thorpe 1997, Liu et al. 1998). Esta espécie também apresenta baixa fecundidade e maturação tardia (Smith et al. 2008). O período de gestação do tubarão-raposa-olhudo é de 12 meses com apenas dois filhotes por ninhada, com tamanhos entre 135 e 140 cm de comprimento total (CT) ao nascer (Chen et al. 1997, Liu et al. 1998, Compagno 2001). Assim como os demais membros da família Lamnidae, os lamniformes do gênero *Alopias* apresentam viviparidade aplacentária com oofagia embrionária, sendo *A. superciliosus* a espécie que apresenta maturação sexual mais tardiamente (Smith et al. 2008), ocorrendo entre 12 e 13 anos para fêmeas e entre 9 e 10 anos para os machos, quando os indivíduos atingem aproximadamente 340 cm de CT nas fêmeas e cerca de 280 cm de CT nos machos (Chen et al. 1997).

Tubarões-raposa da espécie *Alopias superciliosus* possuem distribuição circungalbal, sendo encontrados em águas tropicais e temperadas (Figura 2 - Compagno 2001). Entre as

duas espécies do gênero com distribuição semelhante, *Alopias superciliosus* e *Alopias vulpinus*, observa-se a concorrência de habitats; porém, *A. superciliosus* é geralmente capturada em águas oceânicas enquanto o tubarão-raposa comum, *A. vulpinus* é predominantemente encontrado em regiões costeiras (Prete et al. 2008). A grande capacidade migratória é característica do tubarão-raposa-olhudo, sendo que para esta espécie são relatadas migrações de mais de 2.700 km, com um registro de marcação próximo a Nova Iorque e movimentação até o leste do Golfo do México (Compagno 2001, Kohler & Turner 2001).

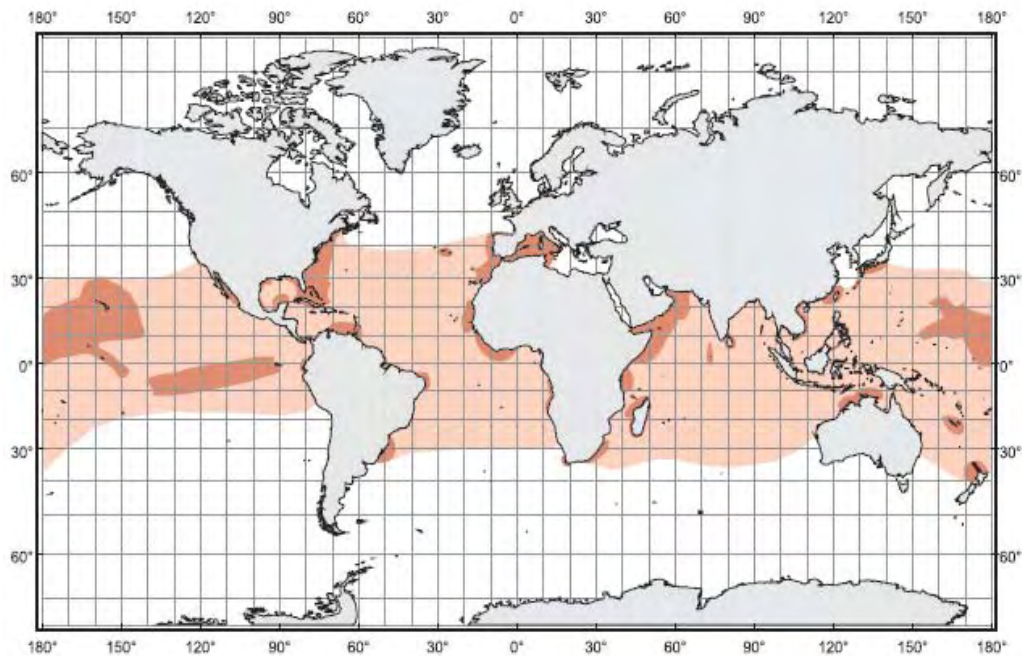


Figura 2. Distribuição da espécie *Alopias superciliosus*. A faixa marcada representa áreas onde a espécie já foi encontrada (Compagno 2001)

A espécie apresenta uma faixa de distribuição latitudinal mais estreita do que outros grandes tubarões pelágicos como o tubarão-azul *Prionace glauca* e o grande tubarão branco *Carcharodon carcharias* (Gruber & Compagno 1981). Estudos avaliando o comportamento nictemeral de deslocamento vertical de *Alopias superciliosus* nos Oceanos Pacífico e Atlântico demonstraram migrações descendentes ao nascer do sol e migrações ascendentes próximas ao por do sol. Nestes estudos, os animais analisados deslocaram-se para profundidades entre 200 e 500 metros, onde a temperatura da água variou entre 6°C e 12°C durante o dia, enquanto durante o período noturno o deslocamento foi em direção a

águas mais quentes, em profundidades variando entre 10 e 130 m, onde a temperatura ficou entre 15°C e 26°C (Nakano et al. 2003, Weng & Block 2004).

O tubarão-raposa, bem como o espadarte *Xiphias gladius*, utilizam a região próxima à superfície oceânica durante a noite, pois este comportamento parece oferecer a estas espécies alguma vantagem ecológica durante a alimentação, evitando também ataques de predadores (Carey & Robison 1981, Nakano et al. 2003). Outras características morfológicas como olhos relativamente grandes o uso da longa cauda na caça são comuns para as espécies *Alopias superciliosus* e *X. gladius*. Estas duas espécies parecem ocupar nichos ecológicos semelhantes, que diferem, porém daqueles ocupados por outras espécies pelágicas (Nakano et al. 2003).

Tubarões da espécie *A. superciliosus* são principalmente pescados com a utilização de espinhéis e aparecem como fauna acompanhante na pesca dirigida para peixes teleósteos de alto valor comercial em todo o mundo, como a do espadarte *Xiphias gladius* (Compagno 2001, Nakano et al. 2003).

Atualmente, o tubarão-raposa *Alopias superciliosus* é listado como globalmente vulnerável e embora ainda sejam insipientes as avaliações de grande escala, a espécie vem apresentando fortes indícios da fragilidade populacional frente à pressão pesqueira, constatado pelo acentuado declínio que vem sendo observado em suas populações. Além da avaliação de globalmente vulnerável pela IUCN, uma série de avaliações regionais também tem sido levantada para esta espécie, sendo relacionada como vulnerável no leste do Pacífico central, em perigo no noroeste e na região centro-oeste do Atlântico, quase ameaçada no sudoeste do Atlântico e vulnerável no oeste do Indo-Pacífico (Amorim et al. 2009).

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

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

1.2 Exploração pesqueira de tubarões

Apesar da importância da pesca de elasmobrânquios para alguns países, o grupo é considerado tradicionalmente como fonte barata de proteínas, em comparação com alguns teleósteos (Bonfil 1994). Além do baixo valor da carne, até meados da década de 70 as barbatanas eram consideradas artigos de luxo na China, o que impedia seu consumo pela grande maioria da população. No início dos anos 1980, mudanças políticas e econômicas em todo o mundo afetaram os mercados consumidores, o que possibilitou o aumento do poder de compra das populações, principalmente graças à diminuição de impostos sobre a importação de nadadeiras de tubarões no mercado oriental (Castro et al. 1999).

Mesmo com o baixo valor da carne, parte da pesca marinha mundial foi, então, direcionada para a captura de elasmobrânquios nas últimas décadas devido principalmente ao valor elevado e aumento do consumo de nadadeiras pelo mercado asiático (Castro et al. 1999, Bonfil 1994). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) o Brasil é responsável pela captura de mais de 21.000 toneladas anuais de elasmobrânquios (FAO 2009) e a partir do ano 2000 passou a ser considerado pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) como um dos países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria "Major Shark Fishing State" (FAO 2009, Lack & Sant 2006). Hoje o Brasil é considerado o 13º país que mais capturam elasmobrânquios, sendo responsável por aproximadamente 2,4% da pesca mundial (Lack & Sant 2011).

A maioria dos tubarões possui uma rara combinação de características biológicas que determinam o baixo potencial reprodutivo de muitas espécies (Castro et al. 1999). Características comuns a organismos K-estrategistas como crescimento lento, maturação tardia, longos ciclos reprodutivos e baixa fecundidade, tornam os componentes do grupo muito mais suscetível à sobrepesca que os peixes teleósteos (Bonfil 1994, Stevens et al. 2000). Além disso, elasmobrânquios são predadores e normalmente estão no topo da cadeia alimentar, sendo sua abundância relativamente pequena, em comparação com organismos de níveis tróficos inferiores (Bonfil 1994).

Devido às características naturais do grupo e ao aumento contínuo das capturas, a vulnerabilidade das espécies põe em risco à sustentabilidade da pesca de elasmobrânquios, já que após esgotamentos graves causados por fenômenos naturais ou

pela ação humana, a recuperação das populações pode levar muitos anos para a maioria das espécies (Bonfil 1994). Várias espécies já demonstram atualmente indícios de diminuições populacionais drásticas em algumas regiões do planeta e, em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido progressivamente incluídas nas listas de risco iminente de extinção pela IUCN (Compagno 2001; Baum et al. 2003, Camhi et al. 1998).

O real impacto da sobrepesca sobre os elasmobrânquios é praticamente desconhecido (Castro et al. 1999, Dulvy et al. 2008). Grande parte da dificuldade em determinar este impacto deve-se ao pouco conhecimento biológico dos componentes do grupo, à escassez de estatísticas pesqueiras espécie-específicas e à falta de modelos de avaliação demográfica específicos para elasmobrânquios. (Castro et al. 1999). Adicionalmente à falta de dados biológico-pesqueiros entre os tubarões e raias mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento das populações devido à sua distribuição abrangendo vastas áreas geográficas, chegando a ser, muitas vezes, circunglobal (Baum et al. 2003). Além disso, o risco de extinção parece estar mais relacionado ao tamanho grande do corpo do animal do que com a reduzida distribuição geográfica e especialização de habitat. Tubarões pelágicos se distribuem em grandes áreas e não são especialistas de habitat, porém, em sua grande maioria, são animais de grande porte e fortemente explorados, o que implica em um aumento do risco de extinção (Pikitch et al. 2008). De modo global, o efeito das capturas ainda tem permanecido desconhecido para um grande número de espécies cosmopolitas, sendo a maioria das avaliações para detectar o colapso destes recursos e para viabilizar programas de manejo e conservação, realizada apenas regionalmente (Castro et al. 1999).

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

Pode ser considerado, portanto, que para avaliar adequadamente a situação atual dos elasmobrânquios, abordar os vários problemas associados à sua exploração e contribuir com novas ideias sobre gestão e conservação das espécies, torna-se essencial o aumento da compreensão dos impactos da pesca nas populações (Castro et al. 1999, Bonfil

1994), que pode ser equacionado pelo incremento de observações e pela melhor compreensão sobre a distribuição e a dinâmica das populações e das espécies deste grupo de organismos.

1.3 Estrutura genética populacional de elasmobrânquios

O conhecimento da estruturação populacional é essencial para a gestão eficaz de uma espécie, sendo que estoques diferenciados geograficamente podem exigir manejo diferenciado (Keeney 2004). A identificação destes estoques são a base para a criação e implementação de programas que utilizem os recursos pesqueiros de forma sustentável (Bonfil 2005). Quando indivíduos de uma mesma espécie são segregados em diferentes unidades reprodutivas, é possível detectar diferenças genéticas que refletem a magnitude do isolamento reprodutivo entre essas populações. A partir das diferenças entre populações que ocupam localidades distintas, é possível estimar indiretamente padrões de fluxo gênico e, conseqüentemente, os níveis da estruturação da espécie na área amostrada (Heist 2004).

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

Devido às suas propriedades peculiares, como a presença de somente genes ortólogos, falta de recombinação e taxas de substituição aproximadamente 10 vezes maiores que as encontradas para genes nucleares, o DNA mitocondrial tornou-se uma ferramenta comum e eficiente em elucidar as relações entre os indivíduos nos vertebrados, em diferentes escalas evolutivas (Brown et al. 1979, Grissi et al. 2000). Por conter os maiores trechos de DNA não codificante e exibir a maior taxa de substituição do DNA mitocondrial, a região controladora deste genoma, denominada D-loop, tem sido amplamente utilizada para entender a estruturação populacional também em elasmobrânquios (Heist 2004).

O material genético mitocondrial é utilizado há aproximadamente duas décadas para entender a ligação genealógica entre os indivíduos e seus ancestrais comuns (Awise 2000). A observação de que haplótipos de DNA mitocondrial de populações de muitas espécies estão agrupados e que estes agrupamentos acompanham padrões biogeográficos,

introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avise et al. 1987, Avise 2000). Desta maneira, com base na distribuição geográfica dos haplótipos identificados e na divergência encontrada entre eles, Avise (2000) discute a possibilidade de determinar taxas de migração, existência de barreiras ao fluxo gênico, extinção de haplótipos intermediários, ocorrências de zonas híbridas e de realizar inferências cladísticas sobre as espécies.

Mesmo quando se considera a crescente captura de tubarões determinada pela atividade pesqueira, com a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção e também a atual inexistência de mecanismos apropriados e efetivos para o manejo sustentável das espécies mais exploradas, verifica-se que ainda são mundialmente pouco expressivos os estudos sobre a estrutura genética das populações deste grupo de peixes (Mendonça et al. 2011). Em estudos envolvendo a análise de amostras globais do tubarão frade *Cetorhinus maximus*, Hoelzel e colaboradores (2006) encontraram poucos haplótipos e baixa diversidade nucleotídica. Os autores não encontraram estruturação entre os indivíduos capturados em diferentes oceanos e sugeriram a existência de um possível gargalo populacional ocorrido possivelmente no Holoceno como fator determinante da homogeneidade genética atual.

Ao analisar indivíduos de tubarão-cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, de três pontos do sul dos EUA e um ponto próximo a região norte do Brasil, Karl e colaboradores (2011) encontraram menor variabilidade na região controle do DNA mitocondrial do que nos loci de microssatélites analisados, este um marcador nuclear. Tal diferença seria uma indicação de provável filopatria das fêmeas. Além disso, com o auxílio do marcador mitocondrial, foi evidenciada uma forte estruturação entre os tubarões *C. leucas* encontrados nas localidades do norte e sul dos EUA e os tubarões amostrados nas localidades do sul, próximas ao Brasil. Os níveis de estruturação identificados parecem indicar que as regiões de berçários da espécie podem ser geneticamente mais isoladas do que se pensava (Karl et al. 2011).

Recentemente, em um estudo com *Sphyrna lewini*, foram encontrados diferentes padrões de dispersão entre machos e fêmeas, reforçando a hipótese de filopatria sugerida anteriormente para a espécie, sendo proposto que a dispersão através dos oceanos seria realizada principalmente pelos machos (Duncan et al. 2006, Daly-Engel et al. 2012). Estes últimos autores também detectaram forte diferenciação entre as amostras da região oeste do Oceano Atlântico e as demais regiões do Atlântico e dos outros oceanos, propondo, assim, uma reavaliação das unidades de manejo e estratégias de conservação existentes para o tubarão-martelo *S. lewini*, com base nos resultados apresentados. A análise

populacional utilizando marcadores nucleares e mitocondriais com o tubarão-lixia *Ginglymostoma cirratum* no Atlântico Ocidental evidenciou uma moderada estruturação populacional na área analisada, indicando que para este espécie as regiões de mar aberto formam barreiras muito mais efetivas do que longas distâncias em águas rasas, sendo refutada a hipótese de filopatria, já que os padrões encontrados foram similares para todos os marcadores utilizados (Karl et al 2012).

Utilizando amostras de tubarão-azul *Prionace glauca* capturados pela frota pesqueira ao longo da costa do Brasil, Teixeira (2011) encontrou estruturação populacional moderada e diferenciação genética não relacionada à distância geográfica. Já para a espécie também pelágica *Pseudocarcharias kamoharai* não foi encontrada estruturação genética populacional nos exemplares provenientes do Oceano Atlântico em análises utilizando como marcador genético a região controle do DNA mitocondrial (Ferrette 2012) Com relação à espécie de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*, não existem até o momento avaliações sobre sua estrutura genética populacional, sendo raros os dados biológicos e estatísticas de pesca em que constem informações sobre esta espécie nas áreas de ocorrência (Smith et al. 2008).

2 Objetivos

Considerando-se a urgente necessidade da proposição e efetivação de medidas de conservação para um grande número de espécies de tubarões e a atual falta de informações que poderiam viabilizar estas medidas, o presente estudo visou gerar informações sobre a dinâmica populacional da espécie de tubarão-raposa, *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando como marcador molecular a região controle do DNA mitocondrial.

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

- caracterizar a diversidade genética do tubarão *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando como marcador molecular a região D-loop do DNA mitocondrial;
- identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial do tubarão *A. superciliosus* no Oceano Atlântico;
- propor uma hipótese filogeográfica estabelecendo as relações entre as populações desta espécie na área estudada;
- gerar informações para subsidiar programas para o manejo adequado e exploração sustentável dos estoques pesqueiros desta espécie no Oceano Atlântico.

3 Material e Métodos

3.1 Coleta de amostras

As amostras de tecido utilizadas no presente estudo foram retiradas de exemplares de tubarão-raposa-olhudo, *Alopias superciliosus*, capturados por embarcações pesqueiras que atuam no Oceano Atlântico e que usam como arte-pesca para a captura principalmente o espinhel pelágico de deriva. Estas amostras foram obtidas por pesquisadores do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp de Botucatu, por pesquisadores da Unesp de São Vicente, pesquisadores do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve – Portugal e pesquisadores colaboradores do Florida Program for Shark Research, da Universidade da Florida - EUA. Porções de tecido obtidos das nadadeiras e/ou tecido muscular foram coletadas e armazenadas em etanol 95% e depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, credenciada como fiel depositária do patrimônio genético no Ministério do Meio Ambiente -MMA.

Um total de 114 indivíduos de *A. superciliosus*, provenientes de 64 pontos do Oceano Atlântico tiveram parte de seu DNAm sequenciado e analisado. Considerando a capacidade migratória da espécie, bem como a existência de diversos pontos de captura ao longo da área amostrada, as amostras foram agrupadas de acordo com a corrente marítima atuante na região de coleta para delimitação populacional *a priori*. Alguns estudos com tubarões têm mostrado uma estreita ligação entre delimitação da distribuição de estoques genéticos e correntes oceânicas no Atlântico (Mendonça et al. 2011, Teixeira 2011). Os agrupamentos populacionais hipotéticos receberam a mesma nomenclatura da corrente oceânica correspondente. Na Figura 3 é possível visualizar os pontos amostrados e a área de abrangência de cada corrente. Na Tabela 1 são mostradas as coordenadas geográficas dos grupos amostrais.

3.2 Extração do material genético, amplificação e sequenciamento

O DNA genômico total foi extraído com a utilização do kit Phire® Animal Tissue Direct PCR (Finnzymes), seguindo o protocolo do fabricante que consiste em 20 µl de Tampão de diluição; 0,5 µl de DNARelease Additive e uma porção de 0,5 mm do tecido livre de etanol, retirada com auxílio do perfurador Harris Cutting Mat™. Após a mistura dos reagentes, a solução contendo o tecido foi deixada durante 5 minutos a 25°C e logo após, durante 2 minutos a 98°C.

A amplificação da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foi realizada utilizando-se um par de *primers* externos Pro-L e 282H (Tabela 2), que flanqueiam a região genômica de interesse. As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas utilizando o kit Phire® Animal Tissue Direct PCR (Finnzymes), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O volume final da reação de PCR foi de 20 µl com 1x de tampão 2x Phire® Animal Tissue PCR, que inclui dNTPs e MgCl₂; 0,5 mM de cada um dos primers; 0,4 µl de Taq DNA Polimerase (Phire® Hot Star II DNA Polymerase) e 1 µl da solução de extração do material genético. O programa para a PCR foi realizado pela denaturação inicial do material a 98°C durante 5 minutos; 30 ciclos com denaturação a 98°C durante 5 segundos; permanência a 55°C durante 5 segundos para anelamento e extensão a 72°C durante 25 segundos, seguindo-se a extensão final durante 1 minuto a 72°C.

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando o corante BlueGreen sob luz azul. Posteriormente foi realizada a purificação enzimática do produto de PCR usando o kit *ExoSAP-IT*®, seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de sequenciamento (Sanger et al. 1977), foi utilizado 1 µl da solução proveniente da purificação enzimática e empregado um *primer* interno (F 5'-CTC CCA CCA AGA AAG TTC TG-3') à região amplificada. A reação foi realizada em um volume final de 10 µl, utilizando entre 30-40 ng/µl do material amplificado e purificado para cada um dos dois *primers*, seguindo o protocolo do kit de sequenciamento DYEEnamic ET dye terminator (Applied Biosystems). O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando-se EDTA (0,5Mm) como agente quelante para a eliminação dos *primers*, dNTPs e ddNTPs não incorporados durante a amplificação de sequenciamento e acetato de sódio como agente protetor do produto amplificado, sendo utilizado o protocolo recomendado pelo fabricante, seguindo o manual do kit de sequenciamento DYEEnamic ET dye terminator (Applied Biosystems). A leitura dos fragmentos de DNA sequenciados foi realizada em sequenciadores automáticos, modelos ABI 3130 e ABI 3500 (Applied Biosystems).

Para confirmação molecular da identificação das amostras, parte da região codificadora da subunidade I da Citocromo Oxidase também foi seqüenciada utilizando os *primers* FishF1 e FishR1 (Tabela 2), seguindo os mesmos procedimentos descritos acima para extração, amplificação e sequenciamento.

Para determinação da composição nucleotídica da região controle do DNAm_t de *A. superciliosus*, cada uma das amostras foi processada com no mínimo uma réplica e, em casos não satisfatórios, mais seqüências réplicas foram geradas de acordo com os padrões observados no eletroferograma.

3.3 Análise das sequências

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). Para a determinação do número de haplótipos e de sítios segregantes, frequência e diversidade de haplótipos, assim como valores de diversidade nucleotídica e haplotípica, foi utilizado o programa DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas et al. 2003).

A matriz de distância genética, a distância genética entre filogrupos e a árvore de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Network 4.6 (Bandelt et al. 1999).

O coeficiente F_{ST} mede a razão entre a deriva genética e o fluxo gênico e o modo como esta razão influencia a estrutura populacional quando se consideram os processos, sendo esta uma das medidas de estrutura populacional mais utilizadas na genética evolutiva. (Templeton 2011). Os cálculos dos índices de fixação F_{ST} par a par foram feitos com a aplicação do programa Arlequin 3.01 (Excoffier et al. 2005).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) testa a heterogeneidade genética particionando a variância molecular em variância interpopulacional e variância intrapopulacional, de acordo com estruturas populacionais definidas *a priori* (Excoffier et al. 1992, Excoffier et al. 2005). O programa utilizado para esta análise, Arlequin 3.01, possui um algoritmo que, a partir de uma matriz de distância entre os haplótipos, calcula as estatísticas Φ , que são análogas às estatísticas F de Wright (Excoffier et al. 2005, Wright 1949, 1965). A significância estatística da F_{ST} é determinada pelas permutações não-paramétricas, considerando-se 1000 permutações (Excoffier et al. 2005).

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1989) e F_S de Fu (Fu 1996) foram realizados no programa Arlequin 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequencias da região controle do DNAm (Excoffier et al. 2005). Estes testes foram desenvolvidos para verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma, mas considerando um desvio significativo é possível detectar expansão ou redução (*bottleneck*) populacional recente (Fu & Li 1993, Tajima 1996, Rand & Kann 1998).

Tabela 1. Identificação e localização das amostras analisadas. * Amostra proveniente da região sudeste do Brasil, sem dados de coordenadas geográficas. ** Amostras da costa leste da Flórida, sem dados de coordenadas geográficas.

| População | Identificação da amostra | Latitude | Longitude | |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|--------|
| CC (Corrente das Canárias) | PM08020615 | 14,36 | -25,44 | |
| | PM08020628 | 14,36 | -25,44 | |
| | PM08020675 | 14,48 | -25,59 | |
| | PM08021142 | 15,66 | -26,04 | |
| | PM08021756 | 15,88 | -24,92 | |
| | PM08021925 | 16,28 | -25,07 | |
| | PM08022147 | 17,01 | -27,09 | |
| | PM08022227 | 16,20 | -27,36 | |
| | PM08022228 | 16,20 | -27,36 | |
| | PM08022254 | 15,48 | -27,43 | |
| | PM08022262 | 15,48 | -27,43 | |
| | PM08022364 | 15,48 | -27,43 | |
| | PM08022528 | 15,30 | -26,30 | |
| | PM08022545 | 15,30 | -26,30 | |
| | PM08022600 | 15,30 | -26,30 | |
| | PM08022601 | 15,30 | -26,30 | |
| | PM08022646 | 15,09 | -26,83 | |
| | PM08023002 | 15,38 | -27,00 | |
| | PM08023139 | 15,95 | -27,10 | |
| | PM08031425 | 12,92 | -29,77 | |
| | PM08031427 | 12,92 | -29,77 | |
| | PM08032297 | 18,13 | -27,27 | |
| | PM08032306 | 18,13 | -27,27 | |
| | PM08032372 | 18,13 | -27,27 | |
| | PM08032491 | 18,18 | -27,43 | |
| | PM10012143 | 14,71 | -22,95 | |
| | PM10012170 | 14,71 | -22,95 | |
| | PM10012191 | 14,78 | -22,96 | |
| | PM10012197 | 14,78 | -22,96 | |
| | PM10012203 | 14,78 | -22,96 | |
| | CB (Corrente do Brasil) | AL080100418 | -27,57 | -43,35 |
| | | AL080102058 | -27,60 | -41,55 |
| AL080102102 | | -27,56 | -41,60 | |
| AL080102316 | | -25,48 | -32,31 | |
| AL080102341 | | -25,48 | -32,31 | |
| AL080103267 | | -25,63 | -30,47 | |
| AL080103428 | | -24,32 | -26,38 | |
| AL080103497 | | -24,91 | -32,33 | |
| AL080103619 | | -24,07 | -27,03 | |
| AL080103646 | | -24,07 | -27,03 | |
| AL080104028 | | -22,58 | -25,13 | |
| 19056 * | - | - | | |
| CG (Corrente da Guiné) | PM09010119 | 6,96 | -18,67 | |
| | PM09010126 | 6,96 | -18,67 | |
| | PM09010322 | 6,93 | -18,45 | |
| | PM09010402 | 6,68 | -17,79 | |
| | PM09010595 | 6,75 | -17,56 | |
| | PM09010644 | 6,34 | -17,52 | |

Tabela 1. Continuação

| População | Identificação da amostra | Latitude | Longitude |
|-------------------------------------|--------------------------|----------|-----------|
| | PM09010697 | 5,80 | -17,74 |
| | PM09010832 | 4,21 | -17,54 |
| | PM09011418 | 0,28 | -9,53 |
| | PM09011561 | 1,11 | -10,78 |
| CNB (Corrente Norte do Brasil) | AL09011177 | 4,41 | -40,87 |
| | AL09011263 | 4,44 | -40,75 |
| CA (Corrente da Angola) | AL09012434 | 0,83 | 4,32 |
| | AL09012443 | 0,83 | 4,32 |
| | AL09012463 | 0,83 | 4,32 |
| | AL09012513 | 0,83 | 4,32 |
| | AL09012563 | 0,78 | 3,95 |
| | AL09012657 | 0,78 | 3,95 |
| | AL09013134 | 1,24 | 5,16 |
| | AL09013160 | 1,24 | 5,16 |
| | AL09013346 | 1,27 | 4,50 |
| | AL09013358 | 1,78 | 3,85 |
| | AL09014082 | 1,73 | 6,00 |
| | AL09014284 | 1,61 | 6,63 |
| | AL09015234 | 0,68 | 3,21 |
| | AL09015614 | 1,54 | 4,05 |
| | AL09015392 | -0,23 | 6,54 |
| | AL09015420 | -0,23 | 6,54 |
| | AL09015426 | -0,23 | 6,54 |
| | AL09015495 | -0,33 | 6,98 |
| | AL09015511 | -0,77 | 7,14 |
| | AL09015514 | -0,77 | 7,14 |
| | AL09014634 | -6,28 | 8,28 |
| | AL09014635 | -6,28 | 8,28 |
| | AL09014641 | -6,28 | 8,28 |
| | AL09014697 | -6,91 | 8,73 |
| | AL09014785 | -6,10 | 8,06 |
| | AL09014790 | -6,10 | 8,06 |
| | AL09014793 | -6,10 | 8,06 |
| | AL09014803 | -6,10 | 8,06 |
| | AL09015012 | -5,93 | 6,00 |
| | AL09015026 | -5,93 | 6,00 |
| | AL09015030 | -5,93 | 6,00 |
| | AL09015050 | -5,93 | 6,00 |
| COB (Corrente Oceânica de Benguela) | AL09015900 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015906 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015907 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015917 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015918 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015919 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015929 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09015956 | -11,55 | -1,31 |
| | AL09016020 | -14,85 | 0,65 |
| | AL09016034 | -14,85 | 0,65 |
| | AL09016036 | -14,85 | 0,65 |

Tabela 1. Continuação

| População | Identificação da amostra | Latitude | Longitude |
|-----------------------|--------------------------|----------|-----------|
| | AL09016045 | -14,85 | 0,65 |
| | AL09016052 | -14,85 | 0,65 |
| | AL09016087 | -15,50 | 0,88 |
| | AL09016094 | -15,50 | 0,88 |
| | AL09016115 | -15,50 | 0,88 |
| | AL09016162 | -16,18 | 0,48 |
| | AL09016202 | -16,18 | 0,48 |
| | AL09016223 | -16,18 | 0,48 |
| | AL09016282 | -16,81 | 0,19 |
| | AL09016414 | -17,28 | 1,19 |
| | AL09016470 | -17,28 | 1,19 |
| | AL09016733 | -19,61 | 1,38 |
| | AL09016839 | -19,89 | 2,93 |
| | AL09016849 | -19,89 | 2,93 |
| | AL09017131 | -21,57 | 4,02 |
| CF | 010302004-01 ** | - | - |
| (Corrente da Flórida) | 080306619-17 ** | - | - |
| | 09306221-72 ** | - | - |

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados nas ampliações e seqüenciamentos de partes da região controle e da subunidade I da região codificante da Citocromo Oxidase nas amostras de *A. superciliosus*.

| Primer | Sequência (5' - 3') | Referência |
|--------|------------------------------------|---------------------|
| Pro-L | AGG GRA AGG AGG GTC AAA CT | Keeney & Heist 2006 |
| 282H | AAF GCT AFF ACC AAA CCT | Keeney & Heist 2006 |
| FishF1 | TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC | Ward et al. 2005 |
| FishR1 | TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA | Ward et al. 2005 |

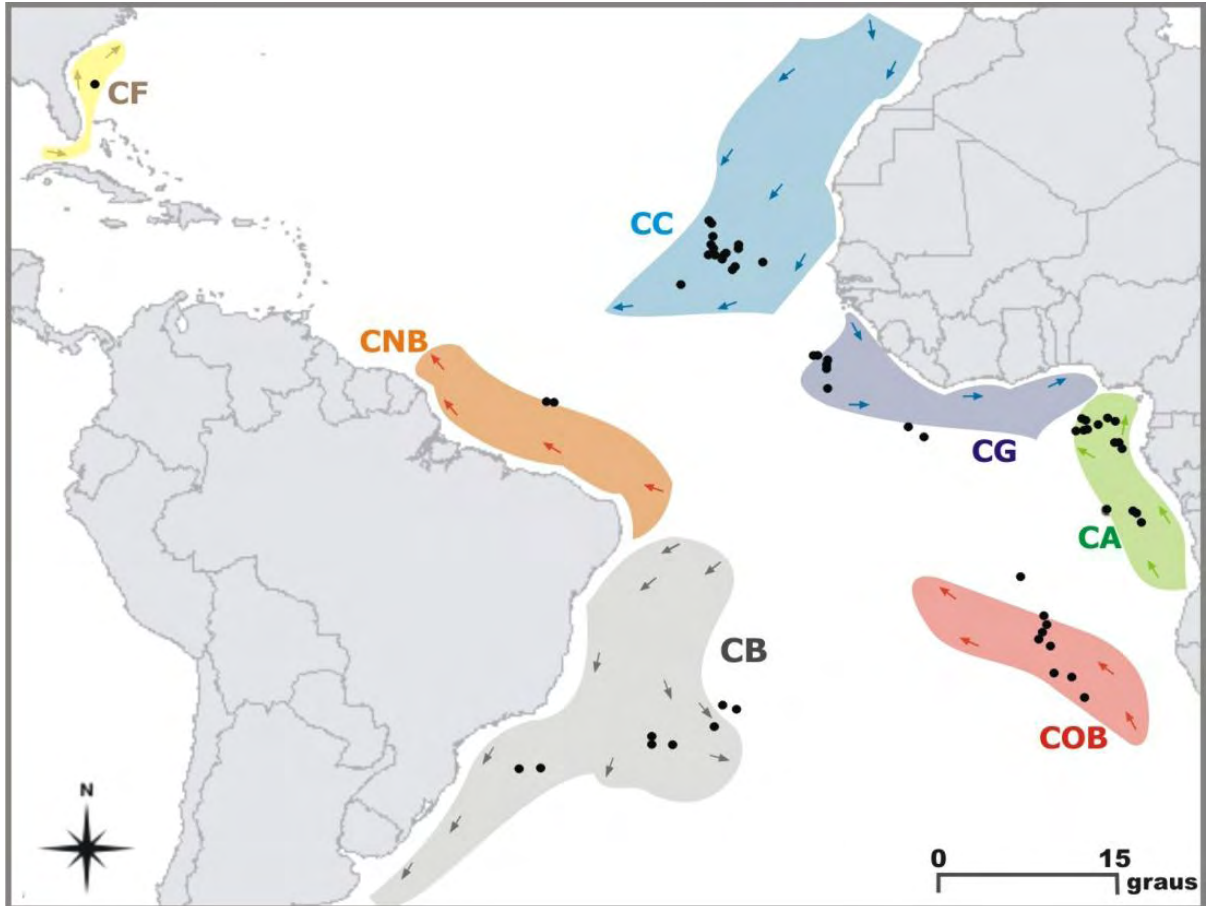


Figura 3. Localização dos pontos de captura e área de abrangência das correntes. Os pontos amarelos indicam os locais de captura. As áreas destacadas mostram a localização das correntes. Setas dentro de cada área destacada indicam a direção da corrente correspondente. As siglas indicam os nomes das correntes/populações. CF = Corrente da Flórida, CC = Corrente das Canárias, CG = Corrente da Guiné, CA = Corrente da Angola, COB = Corrente Oceânica de Benguela, CB = Corrente do Brasil e CNB = Corrente Norte do Brasil.

4 Resultados

No segmento genômico correspondente à região D-Loop do DNAmT, o fragmento analisado é composto por 913 pares de bases (pb) e representa uma parte da região controle do DNA mitocondrial que corresponde aos nucleotídeos compreendidos entre os sítios 16.701 a 17.614 do genoma mitocondrial completo de espécie de tubarão da ordem Lamniformes *Mitsukurina owstoni* (GenBank EU528659.1), considerada ancestral de *A. superciliosus*. O conjunto gênico sequenciado é composto, em média, por 32,3% de timina, 32,4% de adenina, 21,5% de citosina e 13,8% de guanina. Foram encontrados oito haplótipos ($h=8$) gerados a partir de 14 sítios segregantes ($S=14$). O valor de diversidade nucleotídica encontrado foi de $\pi=0,00140$ e de variabilidade haplotípica de $h=0,152\pm 0,046$. A posição dos sítios polimórficos e a variação em cada haplótipo podem ser visualizadas na Tabela 3.

Dentre os oito haplótipos encontrados, identificados de H1 a H8, um único haplótipo (H1) é compartilhado por 105 indivíduos, o que representa aproximadamente 92,1% dos indivíduos analisados. Os haplótipos e suas relações estão representados em uma rede haplotípica na Figura 4 e o número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição geográfica estão indicados na Tabela 4.

Para o cálculo do índice de fixação par a par foram consideradas as sete populações definidas, identificadas como CC, CA, CG, COB, CB, CNB e CF e os valores resultantes deste cálculo podem ser visualizados na Tabela 5. Na Análise de Variância Molecular (AMOVA), o índice de fixação global calculado considerando as sete populações como somente um agrupamento foi de $\Phi_{ST}=0,00986$ ($p>0,05$). Extraíndo-se as populações com dois e três indivíduos (CNB e CF) da análise, o valor encontrado foi de $\Phi_{ST}=0,01010$ ($p>0,05$).

Na rede de haplótipos (Figura 4) e no dendograma (Figura 5) é possível estabelecer dois agrupamentos genéticos. O primeiro agrupamento identificado como Linhagem 1, é formado pelos haplótipos 1, 2 e 4 e o segundo agrupamento, identificado como Linhagem 2, pelos haplótipos 3, 5, 6, 7 e 8. Entre estes dois grupos foram encontrados um mínimo de nove passos mutacionais, com 1,2% de divergência genética.

Foram também realizados testes de neutralidade (D de Tajima e F_S de Fu), cujos valores são encontrados na Tabela 6. As distâncias genéticas entre os haplótipos, medidas par a par, podem ser visualizadas na Tabela 7.

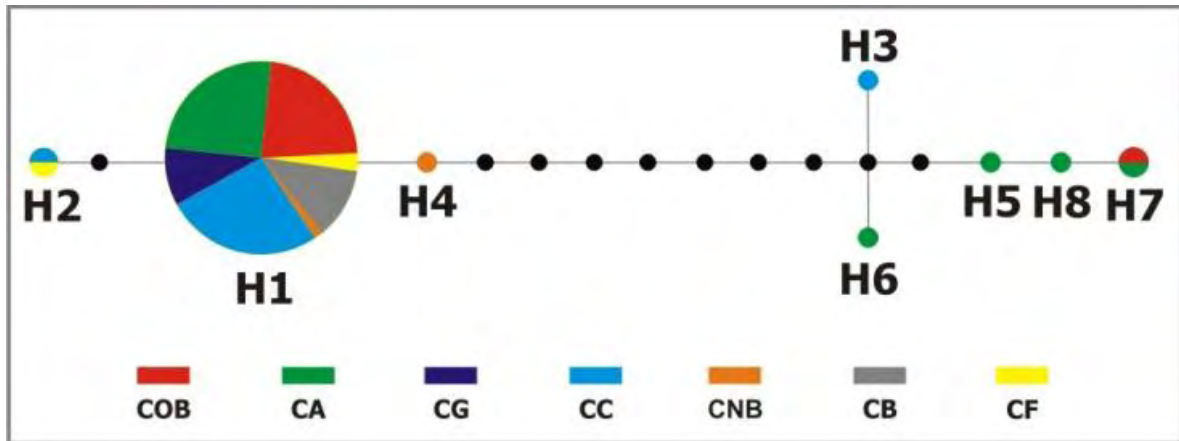


Figura 4. Rede de haplótipos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam os haplótipos encontrados no presente estudo. Círculos pretos indicam haplótipos hipotéticos ancestrais ou não amostrados. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Populações diferentes são representadas com cores distintas e estão proporcionalmente mostradas dentro dos círculos. As linhas entre os haplótipos indicam diferença de 1 par de base (1 passo mutacional). As siglas indicam os nomes das correntes/populações - COB = Corrente Oceânica de Benguela; CA = Corrente da Angola; CG = Corrente da Guiné; CC = Corrente das Canárias; CNB = Corrente Norte do Brasil; CB = Corrente do Brasil e CF = Corrente da Flórida.

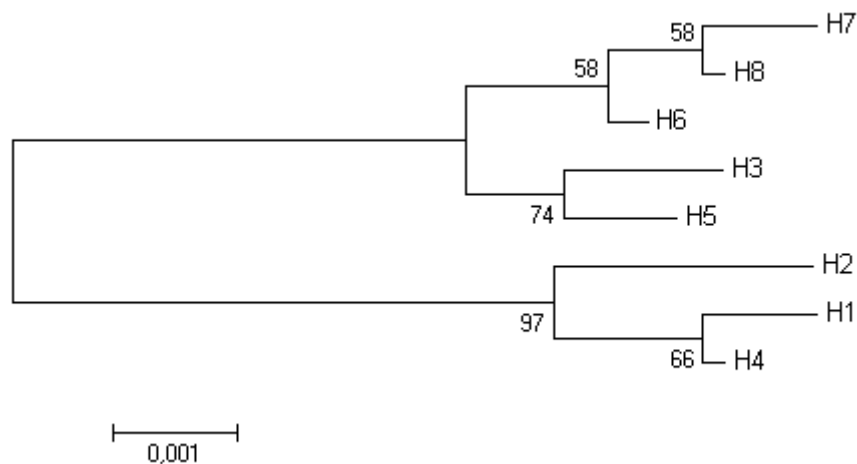


Figura 5. Árvore de haplótipos do tubarão-raposa *Alopias superciliosus* construída pelo método Neighbor-Joining, com modelo evolutivo Kimura 2p e com 1000 réplicas de bootstrap. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* e os haplótipos estão indicados como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 E H8.

Tabela 3. Posição em pares de bases de cada sítio polimórfico encontrado na região controle do DNAm com 913 pares de bases analisáveis, nas sequências obtidas das amostras de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*. As letras indicam nucleotídeos (A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina) que variam de acordo com as mudanças encontradas em cada haplótipo. Os pontos indicam a não variação da base, de acordo com o primeiro haplótipo listado (H1).

| Haplótipos | Posição do sítio polimórfico | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 103 | 120 | 232 | 249 | 251 | 257 | 263 | 308 | 310 | 435 | 472 | 741 | 829 | 890 |
| H1 | C | T | T | T | A | A | A | G | T | A | C | C | A | C |
| H2 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | T | T |
| H3 | G | C | C | A | T | T | . | A | A | T | A | . | . | . |
| H4 | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H5 | G | C | C | A | T | . | T | A | A | T | A | . | . | . |
| H6 | G | C | C | A | T | . | . | A | A | T | A | . | T | T |
| H7 | G | C | C | A | T | . | T | A | A | T | A | T | T | T |
| H8 | G | C | C | A | T | . | . | A | A | T | A | T | T | T |

Tabela 4. Número de indivíduos por haplótipo de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* e sua distribuição geográfica.

| População | Haplótipo | | | | | | | | Total |
|-----------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | |
| COB | 25 | - | - | - | - | - | 1 | - | 26 |
| CA | 26 | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 30 |
| CG | 10 | - | - | - | - | - | - | - | 10 |
| CC | 28 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 30 |
| CNB | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | 2 |
| CB | 13 | - | - | - | - | - | - | - | 13 |
| CF | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| Total | 105 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 114 |

Tabela 5. Valores de F_{ST} calculados nas comparações par a par das populações do tubarão-raposa *Alopias superciliosus*. Nenhum destes valores obteve significância estatística ($p > 0,05$).

| | | CC | CA | CG | COB | CB | CNB | CF |
|--------------------|-----|----------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|
| C. das Canárias | CC | 0,00000 | | | | | | |
| C. da Angola | CA | 0,02395 | 0,00000 | | | | | |
| C. da Guiné | CG | -0,04693 | 0,02183 | 0,00000 | | | | |
| C. Oc. de Benguela | COB | -0,03409 | 0,01555 | -0,04502 | 0,00000 | | | |
| C. do Brasil | CB | -0,03259 | 0,03927 | 0,00000 | -0,03011 | 0,00000 | | |
| C. Norte do Brasil | CNB | -0,00136 | -0,18262 | 0,68750 | -0,00187 | 0,74757 | 0,00000 | |
| C. da Flórida | CF | 0,10377 | -0,06069 | 0,41176 | 0,11842 | 0,49020 | -0,07143 | 0,00000 |

Tabela 6. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e F_S de Fu) para cada população. A significância estatística considerada é $p < 0,05$ para D de Tajima e $p < 0,02$ para F_S de Fu.

| População | D de Tajima | Valor de p | F_S de Fu | Valor de p |
|-----------|-------------|------------|-------------|------------|
| CC | -2,43013 | 0,00100 | 1,25663 | 0,76200 |
| CA | -0,50302 | 0,35400 | 2,50254 | 0,88300 |
| CG | 0,00000 | 1,00000 | 0,00000 | N.A. |
| COB | -2,34784 | 0,00000 | 2,74952 | 0,85400 |
| CB | 0,00000 | 1,00000 | 0,00000 | N.A. |
| CNB | 0,00000 | 1,00000 | 0,00000 | 0,25900 |
| CF | 0,00000 | 0,87600 | 1,60944 | 0,71800 |

Tabela 7. Matriz de distância genética par a par entre os haplótipos nas amostras analisadas de tubarão-raposa *Alopias superciliosus*.

| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| H1 | - | | | | | | | |
| H2 | 0,003 | - | | | | | | |
| H3 | 0,011 | 0,014 | - | | | | | |
| H4 | 0,001 | 0,004 | 0,010 | - | | | | |
| H5 | 0,011 | 0,014 | 0,002 | 0,010 | - | | | |
| H6 | 0,012 | 0,011 | 0,003 | 0,011 | 0,003 | - | | |
| H7 | 0,014 | 0,011 | 0,005 | 0,013 | 0,003 | 0,002 | - | |
| H8 | 0,013 | 0,010 | 0,004 | 0,012 | 0,004 | 0,001 | 0,001 | - |

5 Discussão

Baixos índices de diversidade nucleotídica são resultados obtidos na maioria dos estudos utilizando a região controle do DNAm em espécies de tubarões, tanto oceânicas quanto costeiras. Alguns estudos realizados sobre a diversidade da região controle do DNAm entre diferentes espécies de vertebrados marinhos, incluindo os elasmobrânquios, peixes ósseos e cetáceos (Tabela 8), descrevem valores muito próximos aos observados para *Alopias superciliosus* no presente trabalho, incluindo três espécies de tubarões costeiros, sendo estes *Mustelus schmitti* (Pereyra et al. 2010), *Carcharhinus limbatus* (Keeney et al. 2005) e *Carcharhinus leucas* (Karl et al. 2011). Para algumas espécies pelágicas com distribuição oceânica e hábitos comuns ao tubarão-raposa-olhudo, os valores de diversidade nucleotídica encontrados em estudos populacionais também foram baixos e próximos aos demonstrados no presente estudo. Dentre essas espécies, podemos citar o tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* (Ferrette 2012), o tubarão-frade *Cetorhinus maximus* (Hoelzel et al. 2006) e o tubarão-azul *Prionace glauca* (Teixeira 2011). Apesar de valores muito baixos de diversidade nucleotídica (menores que 1%) da região controle do DNAm não serem um padrão em elasmobrânquios, resultados próximos aos obtidos para *Alopias superciliosus* têm sido encontrados em tubarões, principalmente em espécies de grandes migradores

Em relação à diversidade haplotípica, o menor valor para o segmento da região controladora do DNAm em elasmobrânquios havia sido registrado para o tubarão-limão *Negaprion acutidens*, que apresentou $h=0,28$ em um estudo feito por Schultz e colaboradores (2008). Na relação de espécies com índices de diversidade genética semelhantes ao encontrado no presente estudo (Tabela 8), observa-se a presença de espécies costeiras ameaçadas de extinção, segundo listagem da IUCN (2012) tais como *Mustelus schmitti* (Pereyra et al. 2010) e as três espécies do gênero *Pristis* (Phillips et al. 2011), além da atualmente categorizada como vulnerável *Stegostoma fasciatum* (Dudgeon et al. 2009). Em tubarões pelágicos oceânicos, os valores deste índice são mais altos, em alguns casos chegando próximo a 1,0 como em *Rhincodon typus* (Castro et al. 2007). O compartilhamento de um haplótipo único pela grande maioria dos indivíduos, gerando baixa diversidade haplotípica, é um resultado pouco comum, tendo sido encontrado entre poucas espécies de elasmobrânquios, como em *N. acutidens* (Schultz et al. 2008) e *Ginglymostoma cirratum* (Karl et al. 2012). O resultado de $h=0,152\pm 0,046$ obtido como índice de diversidade haplotípica para as amostras de tubarão-raposa-olhudo analisadas no presente estudo

mostra uma expressão de diversidade ainda menor que o encontrado em *N. acutidens*, e evidencia a mais restrita diversidade genética entre as espécies de tubarões já estudadas.

Os valores negativos e não significativos de F_{ST} e Φ_{ST} obtidos nas análises das amostras indicam a ausência de estruturação populacional em *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico. Tal resultado também havia sido observado em um estudo global para a avaliação do *status* genético populacional do tubarão-frade *Cetorhinus maximus*, onde foi demonstrada a ausência de estruturação genética para a espécie, com valores negativos e não significativos dos índices de fixação global, quando calculados par a par (Hoelzel et al. 2006). Em estudos globais com espécies de peixes altamente migratórias, como o tubarão-baleia *Rhincodon typus* (Castro et al. 2007), a espécie de atum *Thunnus obesus* (Martínez et al. 2006) e o marlim azul *Makaira nigricans* (Buonaccorsi et al. 2001), também foi detectada a ausência de estruturação na bacia oceânica do Atlântico. Outros migradores oceânicos, como o tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* (Ferrette 2012) e o marlim branco *Tetrapturus albidus* (Graves & McDowell 2006) também não apresentaram distribuição estruturada em populações distintas na bacia atlântica, em análises regionais utilizando região controle do DNAm. Parece tornar-se comum a observação de que entre espécies pelágicas oceânicas de alguns tubarões e peixes teleósteos com capacidade de migrar longas distâncias, não são identificadas barreiras que atuem para a separação de linhagens distintas destas espécies no Oceano Atlântico (Dudgeon et al. 2012, Graves & McDowell 2003). No entanto, a presença de diferentes linhagens mitocondriais, como as duas encontradas neste estudo tem sido identificada também em vários peixes pelágicos e altamente migratórios, com distribuição semelhante a do *Alopias superciliosus* (Brendtro et al. 2008).

No estudo global realizado com o tubarão-baleia *Rhincodon typus*, Castro e colaboradores (2007) observaram uma estruturação bem definida entre as localidades Atlântico e Indo-Pacífico, considerando os oceanos Índico e Pacífico. Resultados similares, indicando forte estruturação entre Atlântico e Indo-Pacífico, também foram encontrados em algumas espécies de teleósteos como *Thunnus obesus* (Martínez et al. 2006), *Makaira nigricans* (Buonaccorsi et al. 2001) e o perciforme conhecido como escolar-negro *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro et al. 2008). A ocorrência de duas linhagens mitocondriais tem sido atribuída aos processos de vicariância que separaram o Atlântico do Indo-Pacífico durante o Plioceno, como o surgimento do Istmo do Panamá, ocorrido em torno de 3,6 a 3,5 milhões de anos atrás (Coates et al. 1992) e durante o Pleistoceno, como o aparecimento da ressurgência de águas geladas de Benguela ocorrido em torno de 2,0 a

2,5 milhões de anos (Shannon 1985) na costa sudoeste do continente africano (Alvarado Bremer et al. 2005, Martínez et al. 2006, Brendtro et al. 2008).

Boa parte dos haplótipos encontrados em *Rhincodon typus* (Castro et al. 2007) no Atlântico foram exclusivos. Além destes, Castro e colaboradores (2007) verificaram nesta espécie que existiam outros haplótipos em exemplares encontrados no Atlântico que eram compartilhados com aqueles encontrados em indivíduos da região do Indo-Pacífico, sendo possível notar na rede de haplótipos mostrada pelos autores a identificação de 11 mutações entre estes haplótipos exclusivos do Atlântico e os dos animais do Indo-Pacífico. Esta diferença genética assemelha-se à diferença encontrada entre as Linhagens 1 e 2 de *A. superciliosus* apresentadas no presente estudo. Em estudos globais com as espécies *Thunnus obesus* (Martínez et al. 2006), *Makaira nigricans* (Buonaccorsi et al. 2001) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro et al. 2008), um padrão similar também foi identificado. Nestes estudos foram encontradas duas linhagens mitocondriais bem marcadas, sendo compostas por características genéticas presentes exclusivamente entre os indivíduos encontrados no Oceano Atlântico, divergindo dos haplótipos encontrados entre os indivíduos do Indo-Pacífico e de alguns poucos haplótipos capturados no Atlântico (Martínez et al. 2006, Buonaccorsi et al. 2001, Brendtro et al. 2008).

Uma hipótese levantada para explicar a existência de duas linhagens distintas do tubarão *Alopias superciliosus* na bacia do Atlântico apontaria para o fato de que a Linhagem 1, com maior abundância relativa, seria derivada de um evento de colonização mais antigo e distinto da Linhagem 2. Este fato também seria evidenciado pelas diferenças genéticas que separam os dois grupos por pelo menos 9 mutações e aproximadamente 1,2% de divergência genética. Assim, considera-se a possibilidade de uma origem dos indivíduos de *A. superciliosus* da Linhagem 2 a partir de elementos da região do Indo-Pacífico, sendo sua presença no Oceano Atlântico explicada por eventos de migração posteriores ao isolamento da população original do Atlântico.

Evidências fósseis permitiram a constatação que em períodos interglaciais, após as cinco últimas glaciações, houve aquecimento da região da ressurgência de Benguela (Peeters et al. 2004). Esses episódios de aquecimentos podem ter permitido a migração de indivíduos de espécies tropicais de linhagens da região do Indo-Pacífico para o Oceano Atlântico, o que já foi sugerido ter ocorrido com algumas espécies de elasmobrânquios e de peixes teleósteos, como para *Rhincodon typus* (Castro et al. 2007), *Sphyrna lewini* (Duncan et al. 2006), *Thunnus obesus* (Martínez et al. 2006), *Makaira nigricans* (Buonaccorsi et al. 2001) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro et al. 2008).

Embora eventos recentes de dispersão de algumas espécies de peixes entre os oceanos Índico e Atlântico sejam raros, dados de DNAm demonstram que algumas espécies de peixes tropicais e sub-tropicais encontradas no Oceano Índico podem atravessar a barreira de Benguela (Rocha et al. 2005). Essa permeabilidade atualmente é possível, em um período interglacial, devido à transferência ocasional de águas quentes do Oceano Índico para o Atlântico Sul (*Agulhas leakage*) através da região da retroflexão da Corrente das Agulhas (Peeters et al. 2004, Sigman et al. 2010). A hipótese de migrações recentes de animais do Oceano Índico para o Oceano Atlântico, utilizando a transferência de águas quentes através da corrente das Agulhas, foi proposta para algumas espécies marinhas como o tubarão-martelo *Sphyrna lewini* (Duncan et al. 2006) e os teleósteos *Gnatholepis thompsoni* (Rocha et al. 2005) e *Lepidocybium flavobrunneum* (Brendtro et al. 2008), como parece estar ocorrendo também para *Alopias superciliosus*.

Considerando a hipótese dos indivíduos de *Alopias superciliosus* da Linhagem 2 serem descendentes de tubarões-raposa da linhagem do Indo-Pacífico, a presença dos mesmos no Oceano Atlântico poderia ser explicada por eventos de migração nos períodos de aquecimento da ressurgência de Benguela, após as cinco últimas glaciações, como proposto por Peeters e colaboradores (2004). Contudo, a hipótese de migração recente também não pode ser descartada. Apesar de menos expressivas, capturas de *Alopias superciliosus* são registradas na África do Sul, próximas à província do Cabo Ocidental no Oceano Atlântico e às províncias do Cabo Oriental e de Kwazulu-Natal, no Oceano Índico (Compagno 2001, Petersen et al. 2009). A passagem de indivíduos de *A. superciliosus* da linhagem do Indo-Pacífico para o Atlântico Sul pode ser possível atualmente devido à transferência intermitente de águas quentes pela região de retroflexão da corrente das Agulhas.

Os testes de neutralidade utilizados refutam a hipótese de que a baixa diversidade encontrada para *Alopias superciliosus* seja decorrente da pressão de pesca atual, assim como foi verificado também para *Negaprion acutidens* (Schultz et al. 2008) e *Cetorhinus maximus* (Hoelzel 2006), uma vez que não há indicações de que as populações estejam passando por algum evento de gargalo ou expansão populacional recente. Porém, o tubarão-raposa é atualmente considerado globalmente vulnerável em decorrência do aumento da pesca e conseqüente diminuição populacional (Amorim et al. 2009).

Tabela 8. Diversidade da região controle do DNAm entre espécies de vertebrados marinhos. Análises globais são representadas com exceção das marcadas com *.

| Espécie | Diversidade nucleotídica | Diversidade haplotípica | Referência |
|---|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Elasmobranchii | | | |
| <i>Alopias superciliosus</i> | 0,00140 | 0,152±0,046 | Presente estudo |
| <i>Carcharhinus leucas</i> | 0,0012±0,0012 | 0,51±0,26 | Karl et al. (2011) |
| <i>Carcharhinus limbatus</i> | 0,0021±0,0013 | 0,805±0,018 | Keeney et al. (2005) |
| <i>Carcharias taurus</i> | 0,004±0,00003 | 0,725±0,002 | Ahonen et al. (2009) |
| <i>Cetorhinus maximus</i> | 0,0013±0,0009 | 0,720±0,028 | Hoelzel et al. (2006) |
| <i>Galeorhinus galeus</i> | 0,0071±0,0037 | 0,92±0,01 | Chabot & Allen (2009) |
| <i>Ginglymostoma cirratum</i> | 0,008±0,006 | 0,48±0,05 | Karl et al. (2012) |
| <i>Mustelus schimitti*</i> | 0,0015 | 0,226 | Pereyra et al. (2010) |
| <i>Negaprion acutidens</i> | 0,00056 | 0,28 | Schultz et al. (2008) |
| <i>Negaprion brevirostris</i> | 0,00585 | 0,78 | Schultz et al. (2008) |
| <i>Prionace glauca*</i> | 0,00258±0,00013 | 0,89±0,020 | Teixeira (2011) |
| <i>Pristis zijsron*</i> | 0,0036±0,0026 | 0,555±0,078 | Phillips et al. (2011) |
| <i>Pristis clavata*</i> | 0,004±0,0028 | 0,489±0,0072 | Phillips et al. (2011) |
| <i>Pristis microdon*</i> | 0,0044±0,0029 | 0,65±0,0032 | Phillips et al. (2011) |
| <i>Pseudocarcharia kamoharui*</i> | 0,00167 | 0,627 | Ferrete (2012) |
| <i>Rhincodon typus</i> | 0,011±0,006 | 0,97±0,01 | Castro et al. (2007) |
| <i>Rhizoprionodon lalandii*</i> | 0,004843±0,00294 | 0,8239 | Mendonça et al. (2009) |
| <i>Sphyrna lewini</i> | 0,013±0,0068 | 0,80±0,02 | Duncan et al. (2006) |
| <i>Stegostoma fasciatum*</i> | 0,089±0,086 | 0,484±0,112 | Dudgeon et al. (2009) |
| Teleostei | | | |
| <i>Acanthocybium solandri</i> | 0,053 | 0,999 | Garber et al. (2005) |
| <i>Lepidocybium flavobrunneum</i> | 0,026±0,013 | 0,982±0,004 | Brendtro et al. (2008) |
| <i>Tetrapturus albidus</i> | 0,0320 | 0,9979 | Graves & McDowell (2006) |
| <i>Thunnus obesus</i> | 0,054 | 0,999 | Martínez et al. (2006) |
| <i>Thunnus thynnus*</i> | 0,015 | 0,991 | Carlsson et al. (2004) |
| <i>Xiphias gladius*</i> | 0,0148±0,0005 | 0,997 | Lu et al. (2006) |
| Cetacea | | | |
| <i>Balaenoptera musculus intermedia</i> | 0,014±0,007 | 0,968±0,004 | Sremba et al. (2012) |
| <i>Megaptera novaeangliae</i> | 0,018-0,025 | 0,691-0,980 | Rosenbaum et al. (2009) |
| <i>Orcinus orca</i> | 0,0053±0,0031 | 0,874±0,013 | Hoelzel et al. (2002) |

6 Considerações finais

No presente trabalho apresentam-se os primeiros resultados sobre a estrutura genética populacional do tubarão-raposa-olhudo, *Alopias superciliosus*, utilizando como marcador genético molecular sequências da região controladora do DNA mitocondrial de grupos amostrais representativos do Oceano Atlântico. A hipótese filogeográfica levantada neste estudo é de que uma linhagem mais antiga que habita o Oceano Atlântico seria representada pelos indivíduos que compartilham haplótipos filogeneticamente mais relacionados e provavelmente derivados de um mesmo evento de expansão populacional, sendo que os seis indivíduos diferenciados representariam, então, uma segunda linhagem de migrantes provenientes do Oceano Índico. Eventos de migração podem ter ocorrido durante o aquecimento da região de Benguela após as últimas cinco glaciações, bem como podem estar ocorrendo atualmente, com a transferência intermitente de águas quentes do Oceano Índico para a região do Atlântico Sul. Não há evidência da ocorrência de efeito gargalo ou de expansão populacional recente, mas não se pode descartar a hipótese de que a pressão pesqueira esteja comprometendo a manutenção da variabilidade genética da espécie na atualidade.

Mesmo considerando a existência de duas linhagens distintas, não há evidências de estruturação populacional da espécie na bacia Atlântica e, desta forma, pode ser considerada a existência de um único estoque pesqueiro de *Alopias superciliosus* na região estudada, a partir das amostras analisadas no presente trabalho. Essa inferência genética é sustentada pela distribuição geográfica da espécie ao longo do tempo e pela sua alta vagilidade. Contudo, apesar da evidência de uma população única, os índices relacionados à variabilidade genética e à existência de haplótipos raros, além de uma linhagem com origem no Oceano Índico ainda não comprovada, ressaltam a importância da manutenção destes estoques em níveis sustentáveis de exploração das Unidades Evolutivas Significativas.

7 Referências

- Ahonen H, Harcourt RG, Stow AJ. Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Molecular Ecology*. 2009; 18(21): 4409-4421.
- Alvarado Bremer JR, Viñas J, Mejuto J, Ely B, Pla C. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005; 36(1): 169-187.
- Amorim A, Baum J, Cailliet GM, Clò S, Clarke SC, Fergusson I, Gonzalez M, Macias D, Mancini P, Mancusi C, Myers R, Reardon M, Trejo T, Vacchi M & Valenti SV. *Alopias superciliosus*. 2009. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. [acesso em 2012 Feb 22]. Disponível em <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/161696/0>.
- Avice JC. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 2000.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Sauders NC. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1987; 18: 489-522.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999; 16: 37-48.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA. Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science*. 2003; 299: 389-392.
- Bonfil R. Overview of world elasmobranch fisheries. Rome: FAO Fisheries Technical Paper; 1994.
- Bonfil R. "The purpose of stock assessment and the objectives of fisheries management." , in: Musick JA, Bonfil R, Management techniques for elasmobranch fisheries. Rome: FAO Fisheries Technical Paper; 2005.
- Brendtro KS, McDowell JR, Graves JE. Population genetic structure of escolar (*Lepidosybium flavobrunneum*). *Marine Biology*. 2008; 155: 11-22.

- Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. 1979; 76(4): 1967-1971.
- Buonaccorsi VP, McDowell JR, Graves JE. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). Molecular Ecology. 2001; 10(5): 1179-1196.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Brautigam, Fordham FS. Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission No 20; 1998.
- Carey FG, Robison BH. Daily patterns in the activities of swordfish, *Xiphias gladius*, observed by acoustic telemetry. Fishery Bulletin. 1981; 79: 277-292.
- Carlsson J, McDowell JR, Díaz-Jaimes P, Carlsson JEL, Boles SB, Gold JR, Graves JE. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. Molecular Ecology. 2004; 13(11): 3345-3356.
- Castro JI, Woodley CM, Brudek RL. A preliminary evaluation of the status of shark species. FAO Fisheries Technical Paper. 1999; 380: 1-72.
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG, Hueter RE, Meekan MG, Motta PJ, Bowen, BW, Karl SA. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). Molecular Ecology. 2007; 16: 5183-5192.
- Chabot CL, Allen LG. Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. Molecular Ecology. 2009; 18: 545-552.
- Chen CT, Liu KM, Chang YC. Reproductive biology of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Lowe, 1839) (Chondrichthyes: Alopiidae), in the northwestern Pacific. Ichthyological Research. 1997; 44(2-3): 227-235.
- Coates AG, Jackson JBC, Collins LS, Gronin TM, Dowsett HJ, Bybell LM, Jung P, Obando JA. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. Geological Society of America Bulletin. 1992; 104(7): 814-828.
- Compagno L. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Vol. 2. Bullhead, mackerel, and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). No 1, Vol. 2. Rome: FAO Species Catalogue for Fishery Purposes; 2001.

Daly-Engel TS, Seraphin KD, Holland KN, Coffey JP, Nance HA, Toonen RJ, Bowen BW. Global phylogeography with micro-marker analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). PLoS ONE. 2012; 7(1): e29986. doi:10.1371/journal.pone.0029986

Dudgeon CL, Blower DC, Broderick D, Giles JL, Holme BJ, Kashiwagi T, Krück NC, Morgan JAT, Tillett BJ, Ovenden JR. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of shark and rays. Journal of Fish Biology. 2012; 80(5): 1789-1843.

Dudgeon CL, Broderick D, Ovenden JR. IUCN classification zones concord with, but underestimate, the population genetic structure of the zebra shark *Stegostoma fasciatum* in the Indo-West Pacific. Molecular Ecology. 2009; 18(2): 248-261.

Dulvy NK, Baum JK, Clarke S, Compagno LJV, Cortés R, Domingo A, Fordham S, Fowler S, Francis MP, Gibson C, Martínez J, Musick JA, Soldo A, Stevens JD, Valenti S. You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 2008; 18(5): 459-482.

Duncan KM, Martin APB, Bowen W, De Couet HG. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) Molecular Ecology. 2006; 15: 2239–2251.

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

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 2005; 1: 47-50.

FAO FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistics Unit, FAO Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome; 2009.

Ferrette BLS. Caracterização da estrutura genética populacional do tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamohara*) no Atlântico Equatorial utilizando marcadores moleculares. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2012.

Fu YX. Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. Genetics. 1996; 144: 829-838.

Fu XY, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics. 1993; 133: 693-709.

- Garber AF, Tringali MD, Franks JS. Population genetic and phylogeography structure of wahoo, *Acanthocybium solandri*, from the western central Atlantic and central Pacific Oceans. *Marine Biology*. 2005; 147(1): 205-214.
- Graves JE, McDowell JR. Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. *Marine and Freshwater Research*. 2003; 54: 287-298.
- Graves JE, McDowell JR. Genetic analysis of the white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. *Bulletin of Marine Science*. 2006; 79(3): 469-482.
- Grissi C, Reyes A, Pesole G, Saccone C. Linage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA. *Molecular Biology and Evolution*. 2000; 17(7): 1022-1031.
- Gruber SH, Compagno LJV. The taxonomic status and biology of the bigeye thresher, *Alopias superciliosus*. *Fishery Bulletin*. 1981; 79: 617-640.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41:95-98.
- Heist EJ. "Genetics: stock identification.", in: Musick JA, Bonfil R, Elasmobranch fisheries management techniques. Singapore: APEC Fisheries Working Group, IUCN; 2004.
- Hoelzel AR, Natoli A, Dahlheim ME, Olavarria C, Baird RW, Black NA. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of The Royal Society*. 2002; 269(1499): 1467-1473.
- Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters* 2006; 2(4): 639-642.
- ICCAT. Recomendação 08-07. 2008. [acesso em 2011 Nov 04]. Disponível em <http://www.iccat.int/Documents/Recs/compendiopdf-e/2008-07-e.pdf>.
- IUCN. Shark Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission. Review of Chondrichthyan Fishes. Germany: IUCN e UNEP/CMS Secretariat; 2012.
- Karl AS, Castro ALF, Garla RC. Population genetics of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) in the western Atlantic. *Marine Biology*. 2012; 159: 489-498.
- Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*. 2011; 12: 371-382.

Keeney DB. Population genetics and phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). Carbondale (IL): Southern Illinois University; 2004.

Keeney DB, Heist EJ. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*. 2006; 1: 365-294

Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) burseries in the northwestern Atlantic Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*. 2005; 14(7): 1911-1923.

Kohler NE, Turner PA. Shark tagging: a review of conventional methods and studies. *Environmental Biology of Fishes*. 2001; 60(1-3): 191-224.

Kuusipalo L. Genetic differentiation of endemic nile perch *Lates niloticus* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*. 1999; 407: 141-148.

Lack M, Sant G. The future of sharks: a review of action and inaction. Cambridge: TRAFFIC International and the Pew Environment Group; 2011.

Lack M, Sant G. World Shark Catch, Production and Trade 1990-2003. Paper to the Technical Workshop on the Conservation and Management of Sharks, Intersessional Shark Working Group of the CITES Animals Committee. Oceania: Australian Department of the Environment and Heritage and TRAFFIC; 2006.

Liu KM, Chiang PJ, Chen CT. Age and growth estimates of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus*, in northeastern Taiwan waters. *Fishery Bulletin*. 1998; 96:482-491.

Lu CP, Chen CA, Hui CF, Tzeng TD, Yeh SY. Population genetic structure of the swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the Indian Ocean and West Pacific inferred from the complete DNA sequence of the mitochondrial control region. *Zoological Studies*. 2006; 45(2): 269-279.

Martínez P, González EG, Castilho R, Zardoya R. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006; 39(2): 404-416.

Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São

Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology*. 2009; 7(2): 213-216.

Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F. Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2011; 21(4): 799-814.

MMA. Instrução Normativa Interministerial nº 5/2011. Diário Oficial da União nº 74, Ano CXLVIII, dia 18.04.2011. 2011; Sessão 1: página 60.

Nakano H, Matsunaga H, Okamoto H, Okazaki M. Acoustic tracking of bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* in the eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*. 2003; 265: 255-261.

Peeters FJC, Acheson R, Brummer GJA, Ruijter WPM, Schneider RR, Ganssen GM, Ufkes E, Kroon D. Vigorous exchange between the Indian and Atlantic oceans at the end of the past five glacial periods. *Nature*. 2004; 430: 661-665.

Pereyra S, García G, Miller P, Oviedo S, Domingo A. Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). *Fisheries Research*. 2010; 106(3): 468-473.

Petersen SL, Honig MB, Ryan PG, Underhill LG, Compagno LJV. Pelagic shark bycatch in the tuna – and swordfish – directed longline fishery off southern Africa. *African Journal of Marine Science*. 2009; 31(2): 215-225.

Phillips NM, Chalpin JA, Morgan DL, Peverell SC. Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered *Pristis* sawfishes in Australian waters. *Marine Biology*. 2011; 158(4): 903-915.

Pikitch EL, Camhi MD, Babcock EA. "Introduction to Sharks of the Open Ocean", in: Camhi MD, Pikitch EA, Babcock, *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.

Preti A, Kohin S, Dewar H, Ramon AD. Feeding habits of the bigeye thresher shark (*Alopias superciliosus*) sampled from the California-based drift gillnet fishery. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations*. 2008. [acesso em 2012 May 10]. Disponível em http://calcofi.org/publications/calcofireports/v49/Vol_49_Preti_web.pdf.

Rand DM, Kann LM. Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetica*. 1998, 102/103:393-407.

- Rocha LA, Roberston DR, Rocha CR, Van Tassell JL, Craig MT, Bowen BW. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*. 2005; 14: 3921–3928.
- Rosenbaum HC, Pomilla C, Mendez M, Leslie MS, Best PB, Findlay KP, Minton G, Ersts PJ, Collins T, Engel MH, Bonatto SL, Kotze DPGN, Meÿer M, Barendse J, Thornton M, Razafundrakoto Y, Ngouesso S, Vely M, Kiszka J. Population structure of humpback whales from their breeding grounds in the South Atlantic and Indian Oceans. *PLoS ONE*. 2009; 4(10): e7318. doi:10.1371/journal.pone.0007318
- Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19: 2496–2497.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science*. 1977; 74: 5463-5467.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*. 2008; 17(24): 5336-5348.
- Shannon LV. The Benguela ecosystem I: evolution of the Benguela physical features and processes. *Oceanography and Marine Biology*. 1985; 23: 105-182.
- Sigman DM, Hain MP, Haug GH. The polar ocean and glacial cycles in atmospheric CO₂ concentration. *Nature*. 2010; 466: 47-55.
- Smith PJ, Jamieson A, Birley AJ. Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Int. Explor. Mer*. 1990; 47: 231-328.
- Smith SE, Rasmussen RC, Ramon DA, Cailliet GM. “The Biology and Ecology of Thresher Sharks (Alopiidae)”, in: Camhi MD, Pikitch EA, Babcock, *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
- Soto JMR. Annotated systematic checklist and bibliography of the coastal and oceanic fauna of Brazil. *Mare Magnum*. 2001; 1(1): 51-120.
- Sremba AL, Hancock-Hanser B, Branch TA, LeDuc RL, Baker CS. Circumpolar diversity and geographic differentiation of mtDNA in the critically endangered Antarctic blue whale (*Balaenoptera musculus intermedia*). *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e32579. doi:10.1371/journal.pone.0032579

Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (Chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*. 2000; 57: 476-494.

Tajima F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. 1989; 123: 585-595.

Tajima F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 1996; 143: 1457-1465.

Templeton AR. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética-SBG; 2011.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28: 2731-2739.

Teixeira AF. *Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial*. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2011.

Thorpe T. First occurrence and new length record for bigeye thresher shark in the north-east Atlantic. *Journal of Fish Biology*. 1997; 50(1): 222-224.

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

Ward ED, Woodwark M, Skibinski DOF. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 1994; 44(2): 213-232.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 2005; 360(1462): 1847-57.

Weng KC, Block BA. Diel vertical migration of the bigeye thresher shark (*Alopias superciliosus*), a species possessing orbital retia mirabilia. *Fishery Bulletin*. 2004; 102(1): 221-229.

Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics*. 1949; 15(1): 323-354.

Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965. 19: 395-420.