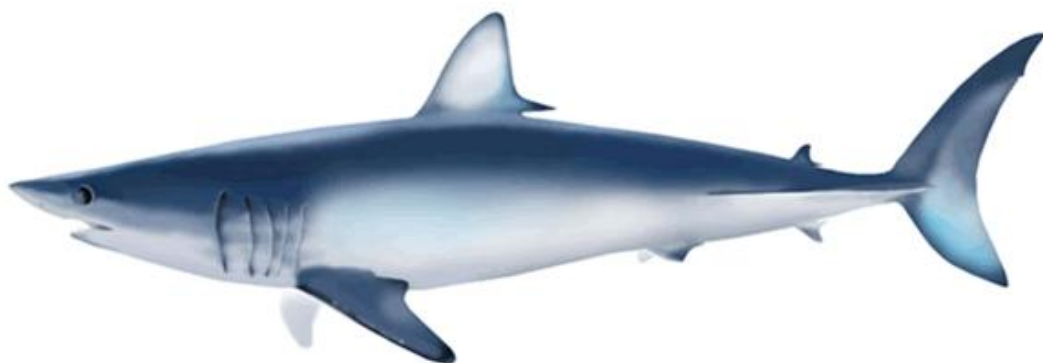


Filogeografia do tubarão mako *Isurus oxyrinchus* utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial



Ronald Ribeiro Alves



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Filogeografia do tubarão mako *Isurus oxyrinchus* utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial

Ronald Ribeiro Alves

Orientador: **Dr. Fausto Foresti**

Co-orientador: **Dr. Fernando F. Mendonça**

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

**BOTUCATU – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Alves, Ronald Ribeiro.
Filogeografia do tubarão mako (*Isurus oxyrinchus*) utilizando marcadores
moleculares do DNA mitocondrial / Ronald Ribeiro Alves. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Fernando Fernandes Mendonça

Capes: 20204000

1. Tubarão - Pesca. 2. Filogeografia. 3. Anequim - Distribuição geográfica. 4.
Genética de populações.

Palavras-chave: Dloop; Estoques pesqueiros; Estruturação genética.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por me proporcionar o sentimento singular de se trabalhar com um grande pesquisador.

Ao Dr. Fernando F. Mendonça, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos, pela impecável condução deste meu trabalho, por ser um grande incentivador na superação dos meus limites.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, exemplo de pesquisador, pela oportunidade e colaboração inestimável.

Ao Guiodai, grande amigo e companheiro, não esquecerei os momentos de aprendizado, você foi sempre prestativo e gentil.

Ao professor Rui Coelho, da Universidade do Algarve - Portugal, pela contribuição na produção deste estudo.

Às colegas, Cristiane e Milke, sempre pacientes e dispostas a ajudar e ensinar.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, pelos momentos divertidos e pelos ensinamentos teóricos e práticos.

Ao programa de Pós-Graduação em genética pela excelência em nossa formação.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

Ao Yuldi, pela inenarrável amizade, por ensinar, incentivar, e cuidar dos meus prazos e obrigações, se tornou um dos maiores colaboradores desta grande etapa realizada em minha vida.

À Fernanda Pereira, pela grande contribuição nos momentos conclusivos desta dissertação.

À minha esposa Soraia, pelo incentivo, compreensão e carinho, você é sempre um porto para mim.

Resumo

Até poucas décadas atrás, a pesca de tubarões era incidental e sem efeitos significativos para as suas populações. No entanto, devido ao grande aumento no valor de suas nadadeiras na Ásia e ao declínio das populações de peixes mais tradicionais para o consumo humano, os tubarões passaram a ser alvo de pescarias em quase todo o mundo, promovendo a inclusão de diversas espécies na lista de espécies ameaçadas de extinção. Entre os tubarões mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento de suas populações devido à sua distribuição em vastas áreas geográficas. Destas, o tubarão mako, *Isurus oxyrinchus*, com ocorrência circunglobal, está entre as principais espécies que apresentam sinais de vulnerabilidade, com tendência ao esgotamento populacional e, no entanto, avaliações que viabilizem o manejo adequado da pesca ainda são inconsistentes. Estudos relacionados à estruturação genética populacional de peixes têm contribuído substancialmente para a elucidação de questões como a variabilidade genética, distribuição geográfica, padrões de migração, estoques reprodutivos, taxonomia, sistemática e eventos históricos. Tais aspectos são especialmente relevantes para o setor pesqueiro, fornecendo subsídios para o manejo e conservação dos estoques. Considerando a urgente necessidade de controle sustentável da pesca, dificultada principalmente pela falta de informações, este estudo buscou caracterizar a estrutura genética populacional da espécie *I. oxyrinchus* no Oceano Atlântico, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop). Foram analisados 144 indivíduos e a análise de 729 pares de bases nucleotídicas desta região genômica permitiu a caracterização de 27 haplótipos, sendo que 18 destes haplótipos (67%) estão compartilhados por todas as regiões amostradas. Os resultados indicam a ocorrência de uma variabilidade genética moderada ($\pi = 0,004$ e $h=0,791 \pm 0,029$), com alta estruturação populacional entre os hemisférios Norte e Sul (valores de F_{ST} : 0,245) e a caracterização de dois estoques pesqueiros na região amostrada. As análises também revelaram a existência de uma relação entre a distância geográfica e a variabilidade genética entre os grupos citados, além de uma possível interferência das correntes oceânicas de águas quentes na migração de indivíduos. O entendimento de como essas populações se comportam, seus padrões de fluxo gênico e a distinção de unidades evolutivas diferenciadas devem ser considerados para o planejamento de ações conservacionistas efetivas do *I. oxyrinchus*.

Palavras-chave: estruturação genética, marcadores moleculares, estoques pesqueiros, D-loop.

Abstract

Until a few decades ago, shark fishing was only incidental and had no significant effects on their populations. However, due to the large increase in the value of shark's fins in Asia and the decline of more traditional fish populations for human consumption, sharks became target fishing around the world, promoting the inclusion of several species in the list of endangered species. Among the most exploited sharks, the pelagic species exhibit greater complexity in the assessment and monitoring of their populations due to their distribution in broad geographical areas. From these species, the mako shark, *Isurus oxyrinchus*, of global occurrence, is among the main species that show vulnerability signs, with a trend to deplete population, and however, evaluations that facilitate appropriate management of fisheries are still inconsistent. Studies related to genetic structure of fish populations have contributed substantially to the elucidation of issues such as genetic variability, geographical distribution, migration patterns, reproductive stocks, taxonomy, systematics, and historical events. These aspects are especially relevant to fisheries sector, providing subsidies for the management and conservation of fish stocks. Considering the urgent need for a sustainable control of fisheries, hampered mainly by the lack of information, this study aimed to characterize the population genetic structure of the shark *I. oxyrinchus* in the Atlantic Ocean, using sequences of mitochondrial DNA control region (D-loop). We analyzed 144 individuals and analysis of 729 nucleotide base pairs of this genomic region allowed the characterization of 27 haplotypes, with 18 of these haplotypes (67%) being shared by all regions sampled. The results indicate the occurrence of a moderate genetic variability ($\pi = 0.004$ and $h = 0.791 \pm 0.029$), with high population structure between the northern and southern hemispheres (F_{ST} values: 0.245) and characterization of two fish stocks in the sampled area. The analysis also revealed the existence of a relationship between geographic distance and genetic variability among the groups mentioned, plus a possible interference of ocean currents of warm waters in the migration of individuals. Understanding how these populations behave, their patterns of gene flow and the distinction of different evolutionary units must be taken into consideration for the planning of effective conservationist actions of *I. oxyrinchus*.

Keywords: genetic structure, molecular markers, fish stocks, D-loop.

Lista de Figuras

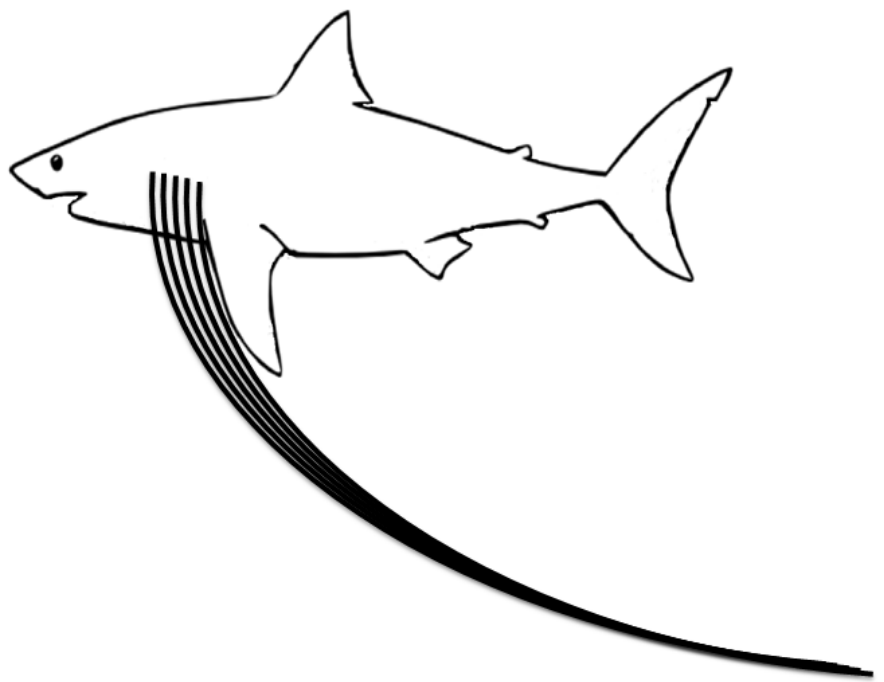
1. Representação gráfica da espécie de tubarão mako <i>Isurus oxyrinchus</i>	14
2. Distribuição geográfica do <i>Isurus oxyrinchus</i>	16
3. Mapa dos Hemisférios Norte e Sul e das regiões Leste e Oeste do Atlântico e correntes marítimas, identificando a distribuição dos grupos amostrais de tubarão mako, <i>Isurus oxyrinchus</i>	22
4. Rede de haplótipos com o agrupamento das localidades de coleta de <i>I. Oxyrinchus</i>	28
5. Gráfico da correlação de distâncias genética/geográfica para as populações de <i>I. oxyrinchus</i> utilizando todos os resultados por pares.....	31
6. Gráfico da correlação de distâncias genética/geográfica de <i>I. oxyrinchus</i> excluindo os resultados obtidos entre Nordeste do Brasil e Sudoeste da África por não apresentar significância estatística no índice F_{ST}	31

Lista de Tabelas

1. Posição dos sítios polimórficos do DNAm _t e a variação em cada haplótipo em <i>I. oxyrinchus</i>	26
2. Distribuição geográfica e número de haplótipos encontrados por grupo amostral em <i>I. oxyrinchus</i>	27
3. Estatísticas populacionais de <i>I. oxyrinchus</i> : N, tamanho amostral; diversidade gênica; Nh, número de haplótipos; Nsp, número de sítios polimórficos e diversidade nucleotídica	28
4. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de populações de <i>I. oxyrinchus</i>	29
5. Valores da AMOVA para os cenários de estruturação testados	29
6. Diversidade haplotípica encontrada nos grupos amostrais de <i>I. oxyrinchus</i> e nas combinações dos grupos conforme as hipóteses elaboradas	30
7. Distância em quilômetros entre os grupos amostrais de <i>I. oxyrinchus</i>	30
8. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para cada população de <i>I. oxyrinchus</i>	32

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1. Exploração pesqueira de tubarões	11
1.2. O tubarão mako <i>Isurus oxyrinchus</i>	13
1.3. Plano de ação para a conservação e gestão dos tubarões	16
1.4. Estrutura genética populacional	17
2. Objetivos	20
3. Material & Métodos	21
3.1. Coleta das amostras	21
3.2. Protocolos para o estudo populacional	22
3.2.1. Métodos moleculares	22
3.2.2. Métodos de análise de sequências	23
4. Resultados	25
5. Discussão	33
6. Considerações Finais	38
7. Referências.....	39



Introdução

1. Introdução

1.1 Exploração pesqueira de tubarões

Até poucas décadas atrás, a captura de elasmobrânquios no mundo era considerada quase totalmente incidental, embora sempre tenha havido comercialização da carne e de subprodutos. No entanto, nas últimas décadas, esse quadro se alterou, seja pela crescente demanda de alimentos em função do aumento do consumo na indústria alimentícia ou pela crescente valorização de produtos, principalmente das nadadeiras comercializadas na Ásia.

Neste novo contexto, a pesca de tubarões passou a ser dirigida a diversas espécies. Estatísticas da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) sobre a exploração pesqueira no ano de 2011 registraram a captura de 750.000 toneladas de elasmobrânquios no mundo, sendo que quase dois terços desse valor corresponderam a tubarões. Segundo a FAO, em 2009 o Brasil foi responsável pela captura de cerca de 12.000 toneladas de tubarões e 5.000 toneladas de raias, e a partir de 2000 passou a ser considerado pela *International Union for Conservation of Nature e Natural Resources* (IUCN) um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “*Major Shark Fishing State*”. Deste grupo também fazem parte os EUA, África do Sul, Costa Rica, Austrália e Oman (Lack & Sant 2006).

Associadas ao alto crescimento da pesca, características biológicas tais como grande longevidade, crescimento lento, maturação tardia e baixa fecundidade, conduzem os elasmobrânquios a um baixo nível de recrutamento e, conseqüentemente, aumentam a susceptibilidade de suas populações (Natanson & Cailliet 1986). Novos resultados sobre a determinação da idade obtidos por Gibson & Campana (2005) indicam que a espécie *Lamna nasus* cresce mais lentamente do que foi relatado anteriormente, tornando-se, assim, menos produtiva e ainda mais suscetível às ações de sobreexploração do que o indicado anteriormente. Em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido incluídas na lista de risco iminente de extinção pela IUCN (Camhi *et al.* 1998).

Entre os tubarões e raias mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento de suas populações. Isso se deve à sua distribuição em vastas áreas geográficas, muitas vezes circunglobais (Baum *et al.* 2003). Deste modo, o efeito das capturas ainda tem permanecido desconhecido para um grande número de espécies cosmopolitas, sendo que a maioria das avaliações para detectar o colapso

destes recursos e viabilizar o manejo e conservação é realizada apenas em nível regional (Castro *et al.* 1999).

A distribuição em enormes áreas oceânicas dificulta estipular o tamanho das populações de tubarões pelágicos, sendo extremamente difícil delinear o tamanho dos estoques. Muitas espécies migram através das fronteiras nacionais ou em águas internacionais, onde são exploradas por frotas pesqueiras de diversos países (Musick *et al.* 2000), dificultando seu controle e manejo. Portanto, a compreensão da localização e do número de estoques destes peixes abundantes, porém vulneráveis, torna-se urgente e essencial para a conservação e a realização de uma gestão adequada.

Dentre as espécies comumente capturadas nas pescarias oceânicas no Atlântico, sete já apresentam declínios populacionais acima de 50%, de acordo com os registros dos últimos 10 anos (Baum *et al.* 2003). Estimativas realizadas a partir de desembarques de frotas pesqueiras dos EUA mostraram um declínio populacional recente de cerca de 80% entre as espécies *Alopias superciliosus* e *A. vulpinus* (tubarões-raposa) no Atlântico Norte. Nesta mesma área, foi estimado o declínio de aproximadamente 90% para as espécies do gênero *Sphyrna* (tubarões-martelo) e declínio de cerca de 70% para as populações do tubarão galh branca *Carcharhinus longimanus* (Compagno 2001). No entanto, a saúde das populações de tubarão mako, *Isurus oxyrinchus*, nunca foi devidamente avaliada, embora alguns estudos mostrem que os desembarques comerciais deste tubarão na década 1999-2009 aumentou quatro vezes (Sernap de 2009 - Chile). Com base em outra análise realizada nos EUA a partir de diários de bordo de embarcações que operam com espinhel pelágico no Atlântico Norte, Baum *et al.* (2003) sugeriram que as populações desta região apresentam um forte declínio desde 1986. Uma primeira tentativa de preparar uma avaliação das unidades populacionais do Atlântico, realizada pela *International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas* (ICCAT), também revelou que foram observados declínios dos estoques. No entanto, devido à baixa qualidade dos dados, esta avaliação foi considerada apenas como provisória (ICCAT, 2004).

Essa atividade pesqueira pode afetar a variabilidade genética de uma espécie e atuar tanto sobre uma espécie alvo, como também sobre outras espécies ditas acompanhantes. Assim, para as espécies de valor comercial e mesmo para as espécies capturadas de forma ‘acidental’, a pesca deve ser considerada como um dos principais fatores de mortalidade de animais adultos e, em certos casos, de juvenis e até neonatos, como é o caso dos tubarões, muitas vezes comprometendo o recrutamento dos estoques (Hiltsdorf 2006).

A percepção de que a sobre-exploração vem afetando a disponibilidade dos estoques de peixes de alguma forma, tem sido um consenso entre os cientistas pesqueiros. Esta realidade, verificada nas estatísticas pesqueiras, parece estar relacionada à seletividade das redes de captura que retiram os animais maiores. Conover e Munch (2002) constataram que a retirada constante de animais maiores ao longo do tempo afeta a composição genética do estoque, eliminando os genes relacionados ao crescimento rápido e diminuindo o tamanho médio dos indivíduos remanescentes. Essa pressão da pesca traz alterações no arranjo genético dos estoques, favorecendo a seleção de alguns genótipos (Olsen *et al.* 2004).

Ward (2000) relata que a exploração dos recursos marinhos nos moldes tradicionais pode ter um grande impacto sobre a diversidade genética das populações, alterando a sua estrutura geral, reduzindo a fecundidade e o tamanho da população. A sobrepesca, adicionada às características biológicas e comportamentais, terá como efeito a incapacidade de regeneração destas, pois a continuidade da produção pesqueira nos níveis elevados, pela captura de um maior número de indivíduos de menor tamanho, torna-se uma atividade insustentável. Entretanto, conforme alguns autores como Dulvy *et al.* (2003), Myers *et al.* (2007), Ferretti *et al.* (2010), existe uma apreensão mundial sobre o impacto da sobrepesca e da possível perda do predador do topo em cadeias alimentares nos ecossistemas marinhos. Esta preocupação é de particular relevância em relação aos tubarões, pois suas características biológicas proporcionam alta vulnerabilidade à sobre-exploração (Stevens *et al.* 2000, Cailliet *et al.* 2005).

1.2 O tubarão mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque 1810)

A espécie *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque 1810), pertencente à família Lamnidae e popularmente conhecida como mako ou anequim (Figura 1), é típica de áreas litorâneas e pelágicas, ocorrendo desde a superfície até 500 metros de profundidade, sendo rara sua frequência em temperaturas menores que 16°C (Compagno 2002). Em todo o mundo, o tubarão *I. oxyrinchus* representa uma das espécies mais importantes comercialmente para a pesca de lazer (Casey & Kohler 1992; Compagno 1984; Holts 1988), sendo um dos componentes mais importantes na pesca de espinhel pelágico em muitos países, onde deixou de ser considerada como espécie *by-catch* (proveniente da pesca acidental) e passou a ser uma espécie-alvo importante. Além de seu aspecto comercial significativo para a obtenção de proteína animal, a reputação do tubarão mako, promovida principalmente por seu comportamento que incluem saltos de longas distâncias, o tornou muito perseguido em

competições e levou ao estabelecimento de torneios de pesca desta espécie em todo o mundo (Casey & Kohler 1992; Holts & Bedford 1993; Pepperell 1992; Stevens 1992).

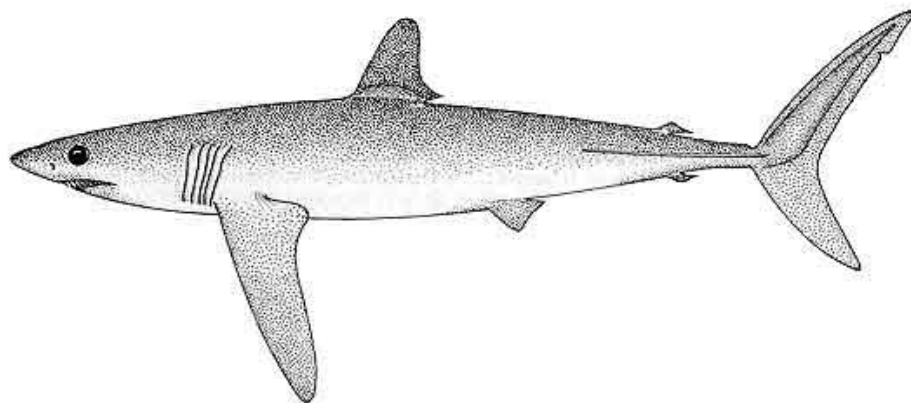


Figura 1. Representação gráfica da espécie de tubarão mako *Isurus oxyrinchus* (FAO 2008).

Apesar do grande interesse comercial e de lazer nesta espécie, pouco se sabe sobre suas características biológicas básicas, como taxas de migração. Estudos de marcações e acompanhamento via satélite têm documentado movimentos superiores a 4000 km, com indivíduos marcados em águas costeiras do Atlântico nos EUA, sendo observado seu deslocamento até os Açores e Venezuela (Casey & Kohler 1992). Compagno (1984) relatou que o tubarão mako tende a se mover para maiores latitudes durante os meses mais quentes e Casey & Kohler (1992) propuseram a hipótese de que alguns indivíduos podem fazer um circuito completo, de regiões costeiras do Atlântico Norte (EUA) na primavera, ao Caribe e Golfo do México no inverno. Esta rota corresponde bem à abundância de peixes que lhe servem como alimento e temperaturas preferenciais.

O tubarão mako é um importante componente da comunidade de tubarões pelágicos, apresentando uma distribuição circunglobal em mares da zona tropical e temperada (Compagno *et al.* 2005), entre 50 N e 50 S (Figura 2). No oceano Atlântico, sua presença é notada do Canadá à Argentina, a oeste, e da Noruega até a África, a leste (Bigelow & Schroeder 1948, Compagno 1984). É comum encontrar esta espécie em águas costeiras e oceânicas, pois se trata de uma espécie de comportamento pelágico (Compagno 1984).

Há evidências de que o tubarão mako apresenta uma preferência por águas mais quentes. Casey & Kohler (1992) relataram que a temperatura da água preferida pelo mako no Atlântico Norte está na faixa entre 17°C e 22°C. Hoey (1983) verificou dados sobre a temperatura da água no golfo do México e constatou que a média mínima e máxima em que

os makos foram capturados ficou entre 18.5°C e 20.5°C, respectivamente. Nota-se também uma relação entre a temperatura das correntes marítimas e o comportamento migratório do mako através de um estudo realizado por Simpfendorfer *et al.* (2001) na costa leste dos EUA, mostrando que os tubarões mako foram capturados em uma área de estudo que corresponde exatamente a área por onde circula a Corrente do Golfo (corrente de águas quentes), mas não ao norte, próximo à Corrente de Labrador (corrente de águas frias) a 41.2 N.

Outra evidência que apresenta a preferência da espécie pela faixa de temperaturas citada acima foi demonstrada por marcação sônica (Carey *et al.* 1978). Alguns tubarões mako foram rastreados por quatro dias na Flórida, através da Corrente do Golfo. Os tubarões nadaram em profundidades desde a superfície a 500 m, mas passaram a maior parte do seu tempo em profundidades menores, onde a faixa de temperatura estava entre 17°C e 22° C (Carey *et al.* 1978). Em outro estudo sobre o comportamento migratório do tubarão mako, um total de 5.333 indivíduos foi marcado por membros da NMFS entre os anos de 1962 e 2000. De acordo com colaboradores que retornaram as informações sobre 608 peixes capturados, as distâncias percorridas pelo tubarão mako chegaram a até 5.309 km, sendo que esta distância máxima foi de um tubarão marcado no nordeste dos EUA e recapturado no noroeste do Saara Ocidental, África, 1,4 anos mais tarde. Nesse caso, o mako seguiu o sentido do fluxo da Corrente do Golfo (Kohler 2002).

Em associação com o comportamento migratório do tubarão mako, que possui uma afinidade por correntes marítimas quentes, aparecem características anatômicas e fisiológicas, como por exemplo, as especializações cardiovasculares, bioquímicas e músculo-tendínea, (Bernal *et al.* 2003, Donley *et al.* 2004, Emballa *et al.* 2006). Estas características são encontradas em outros membros da família Lamnidae e proporcionam a capacidade de conservar o calor metabólico e manter os corpos de 7°C a 10°C acima da temperatura ambiente. Tais características levam a acreditar que tubarão mako e outros membros da família Lamnidae apresentam adaptações comportamentais e fisiológicas direcionadas para a realização de atividade aeróbica intensa (Carey *et al.* 1971, 1985; Graham *et al.* 1990; Bernal *et al.* 2001a, b, 2003, 2005; Donley *et al.* 2004), buscando minimizar a perda de energia e a obter a máxima eficiência na manutenção da temperatura corporal, pois há um grande gasto de energia em decorrência de processos migratórios, em busca de alimento ou pela alta velocidade de natação.

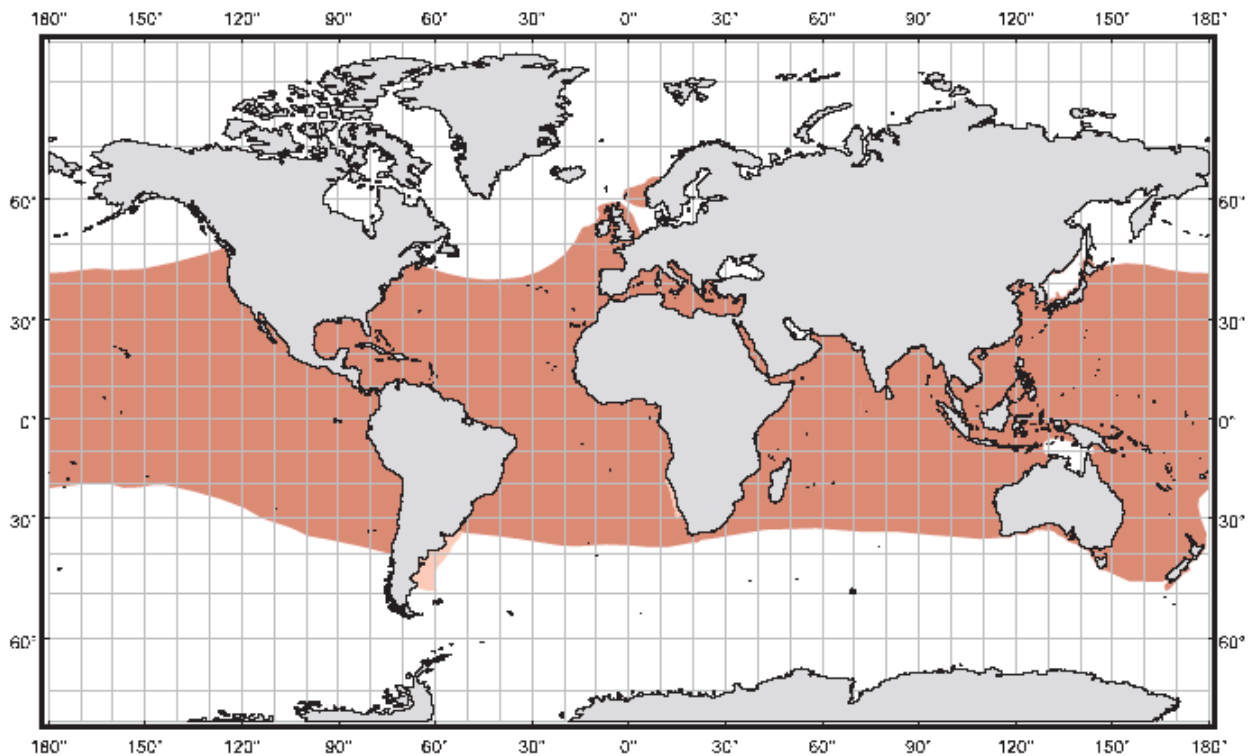


Figura 2. Distribuição geográfica do *Isurus oxyrinchus* (Compagno 2001).

1.3 Plano de Ação para a Conservação e Gestão dos Tubarões

A adoção de medidas efetivas para a conservação desta espécie de tubarão que apresenta distribuição global necessita da participação de diversas nações agindo em conjunto. Em 1999 foi criado o Plano de Ação Internacional para a Conservação e Gestão dos Tubarões (IPOA-Sharks) pela Comissão das Pescas (COFI) da Organização das Nações Unidas Para Alimentação e Agricultura (FAO). Esse plano internacional deu origem a diversos planos nacionais com metas em comum entre os países participantes, tais como o Brasil, EUA, Inglaterra, Austrália, Canadá, Malásia, países do Mediterrâneo, Equador e Senegal, entre outros. No Brasil, este plano foi elaborado em 2005 pela Sociedade Brasileira para o Estudo dos Elasmobrânquios (SBEEL), mas somente em 2009 foi aprovada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) a Proposta de Plano de Gestão para o Uso Sustentável do Grupo de Elasmobrânquios Sobreexplotados ou Ameaçados de Sobreexploração no Brasil. Tal proposta conferiu prioridade na gestão, pesquisa e conservação das espécies listadas na Instrução Normativa do IBAMA de 2004 como ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Na Instrução Normativa de 2004 ficou definido como “espécies ameaçadas de extinção” aquelas com alto risco de desaparecimento na natureza num futuro próximo; como “espécies sobreexplotadas” aquelas cujas condições de captura de uma ou todas as classes de idade são tão elevadas que reduzem a biomassa, o potencial de desova e as capturas no futuro a níveis inferiores aos de segurança e, finalmente, como “espécies ameaçadas de sobreexploração” aquelas cujo nível de exploração encontra-se próximo ao de sobreexploração (MMA 2004). O texto oficial da Instrução Normativa Nº 5/2004 estabeleceu ainda o prazo máximo de cinco anos para desenvolvimento e implantação de planos de recuperação para as espécies ameaçadas, ou planos de gestão para os estoques em risco de agravamento, de forma a retomar o uso sustentável para as espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração, sob a coordenação do IBAMA – MMA e com a participação de outros segmentos da sociedade.

Entre as prioridades estabelecidas no plano nacional constam pesquisas que visem a caracterização genética populacional dos estoques, monitoramento das áreas protegidas ou áreas de berçário, monitoramento dos desembarques nos principais portos comerciais para a obtenção de dados populacionais, pesquisas para a identificação de áreas prioritárias para as espécies sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-exploração e ainda o estímulo a trabalhos de pesquisa em conjunto e a participação em fóruns internacionais para espécies que sejam recursos compartilhados (IBAMA 2009).

1.4 Estrutura genética populacional

A identificação e a preservação de estoques diferenciados são primordiais para o setor pesqueiro, principalmente pela sua relação com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho e Hauser 1994), sendo a conservação da variabilidade genética um dos objetivos nos programas de controle e conservação de espécies ameaçadas (Lacy & Lindenmayer 1995). Esta questão é especificamente relevante para o ambiente marinho onde as barreiras físicas são menos efetivas (Awise 1994; Palumbi 1994), sugerindo uma possível homogeneização genética da população (Ward *et al.* 1995; Levy & Cassano 1994; Bonhomme *et al.* 2002). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes pode estimular a sobreexploração, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e eliminar estoques locais (Smith *et al.* 1990; Kuusipalo 1999).

Os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e estão sendo atualmente incorporados à conservação de espécies, de forma prática e eficiente. Já há algum tempo, os padrões de DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo reconhecidos potencialmente importantes em estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris & Berg 1987; Toledo Filho *et al.* 1992), sendo capazes de distinguir populações, geograficamente distintas, com grande eficiência pela identificação de padrões haplotípicos característicos para cada localidade amostrada (Birmingham e Martin 1998; Patarnello *et al.* 2003; Perdices *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004).

As observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies têm sua distribuição limitada geograficamente introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avice *et al.* 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de sequências entre eles, Avice (2000) propõe e discute categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas.

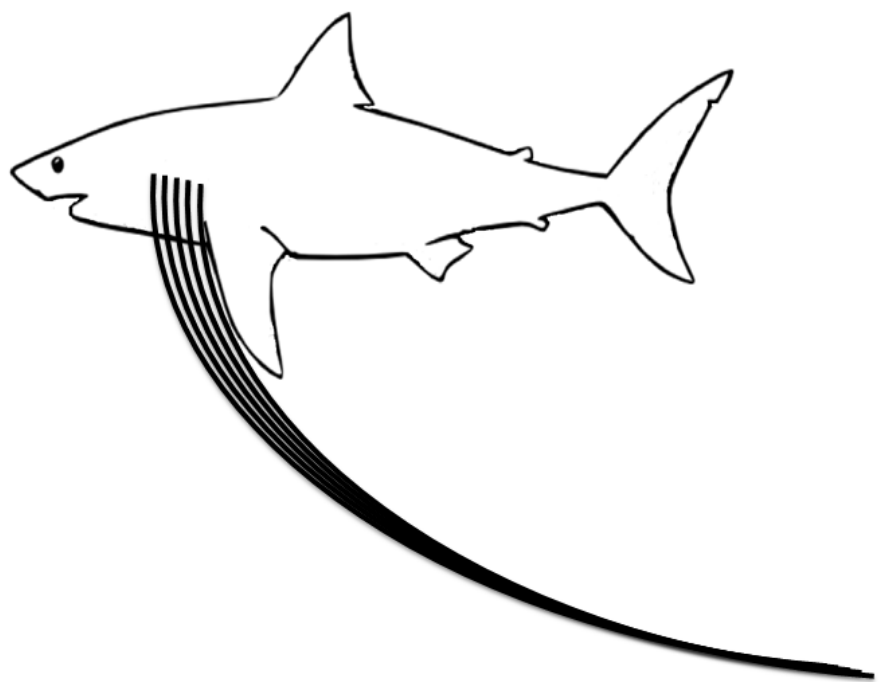
Mesmo considerando a crescente captura de tubarões determinada pela atividade pesqueira, a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção e também a inexistência de mecanismos apropriados para o manejo sustentável das espécies mais exploradas, ainda são mundialmente pouco expressivos os estudos sobre a estrutura genética de populações destes peixes. Duncan *et al.* (2006) elaboraram um primeiro trabalho filogeográfico global para a espécie de tubarão *Sphyrna lewini*, onde foi observada uma forte descontinuidade populacional entre os oceanos. No entanto, o baixo número amostral utilizado não possibilitou a identificação de estruturas populacionais intra-oceânicas. Outro ponto importante levantado por estes mesmos autores foi a possibilidade da ocorrência de uma espécie críptica no gênero *Sphyrna* no Oceano Atlântico.

Para o tubarão *Carcharhinus limbatus* foi verificada a ocorrência de forte estruturação entre as populações do Atlântico Oeste (Golfo do México e Caribe) e populações do Atlântico Leste (África), oceanos Índico e Pacífico, com a existência de estoques reprodutores distintos (Kenney & Heist 2006). No entanto, esta hipótese foi formulada com base em um pequeno número de amostras coletadas na costa africana (n=8) e desta forma, os haplótipos desta região, que poderiam ser correspondentes aos haplótipos do Atlântico Oeste, não teriam sido amostrados. Ainda neste mesmo trabalho, foi sugerida uma possível incerteza taxonômica

entre *C. limbatus* e *C. tilstoni*. Utilizando uma amostragem global do tubarão *Galeorhinus galeus*, Chabot & Allen (2009) identificaram a ocorrência de estruturação populacional também entre os oceanos, sem avaliar, contudo, as suas populações de forma restrita a cada um dos oceanos. E entre amostras globais do tubarão-baleia *Rhincodon typus*, de modo geral, não foram encontradas fortes restrições ao fluxo gênico entre os oceanos, havendo uma moderada diferenciação apenas entre as amostras coletadas de exemplares no Atlântico e no Índico (Castro *et al.* 2007).

Em avaliações de menor escala, Schultz *et al.* (2008) identificaram fortes restrições ao fluxo gênico em populações do tubarão-limão *Negaprion brevirostris* coletadas no Brasil, Bahamas (Atlântico Oeste) e Guiné Bissau (Atlântico Leste). Neste estudo, ficou evidente a estruturação entre as populações do leste e oeste do Oceano Atlântico e ainda uma moderada diferenciação entre as amostras brasileiras coletadas no hemisfério Sul e as amostras das Bahamas, no Caribe. Em outro estudo, de acordo com Chapman *et al.* (2009), *Sphyrna lewini* apresenta uma forte diferenciação no Atlântico, com estoques distintos no Golfo do México, Caribe e América do Sul. E para os tubarões de pequeno porte *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii*, duas das espécies mais capturadas em pescarias costeiras das Américas, foi caracterizada uma forte estruturação entre populações do Atlântico Oeste, que se mostraram diferenciadas nas análises de exemplares capturados nos Hemisfério Norte e Sul. Considerou-se que esta diferenciação pudesse ser modulada pelas correntes marítimas Norte Equatorial e Corrente do Brasil (Mendonça *et al.* 2011, 2013).

Pela observação dos diversos padrões de dinâmica populacional de tubarões estudada do ponto de vista genético (Duncan *et al.* 2006; Chabot & Allen 2009; Castro *et al.* 2007; Schultz *et al.* 2008; Chapman *et al.* 2009; Mendonça *et al.* 2011), acredita-se que cada espécie possui características que, associadas às pressões ambientais, podem determinar padrões independentes para cada uma delas. No entanto, padrões compartilhados, se identificados, poderão possibilitar o desenvolvimento de planos de manejo que sejam eficientes para um grupo de espécies e não apenas para uma única delas. Desta forma, sendo determinada uma região prioritária de proteção que englobe importantes estoques de diversas espécies, é possível explorar os recursos de forma consciente e apropriada, bem como aumentar os esforços no manejo e controle da pesca de maneira localizada.



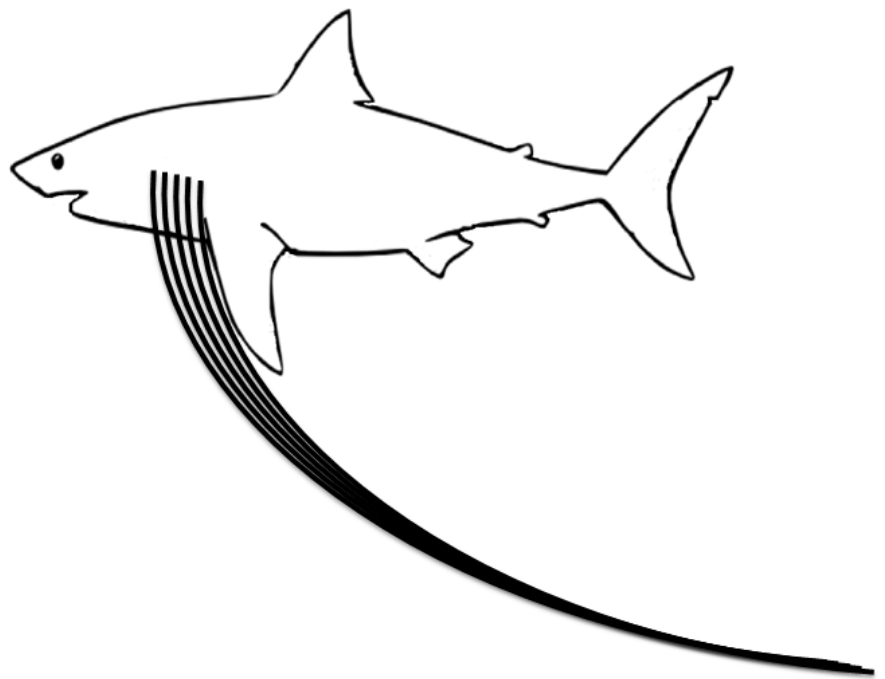
Objetivos

2. Objetivos

Considerando a urgente necessidade de medidas de conservação para um grande número de espécies de tubarões e a atual falta de informações que viabilizem estas medidas, este estudo visou a geração de dados sobre a dinâmica populacional da espécie *Isurus oxyrinchus* no Oceano Atlântico, utilizando como marcador genético molecular as sequências da região controladora do DNA mitocondrial.

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

- caracterizar a diversidade genética do tubarão *Isurus oxyrinchus* 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 que formam os estoques reprodutores dos tubarões *Isurus oxyrinchus* no Oceano Atlântico.
- propor uma hipótese filogeográfica estabelecendo as relações entre as populações desta espécie na área estudada.
- dar origem a informações que possam subsidiar programas adequados de manejo e exploração sustentável dos estoques pesqueiros desta espécie no Oceano Atlântico.



Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Coleta das amostras

Para a caracterização filogeográfica da espécie de tubarão *Isurus oxyrinchus* foram obtidas amostras em regiões do Brasil, Europa e Continente Africano, abrangendo desta forma, os Hemisférios Norte e Sul e as regiões Leste e Oeste do Atlântico. As amostras foram coletadas por observadores de bordo que operam em barcos portugueses em praticamente toda a faixa Leste do Atlântico e por pesquisadores que trabalham junto aos desembarques nos Estados de Santa Catarina, São Paulo e Pará, no Brasil. Nestas coletas foram obtidos e preservados fragmentos de tecidos musculares dos exemplares desta espécie em solução de etanol a 95%, acondicionados em tubos individuais devidamente identificados.

Todas as amostras obtidas foram depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) da UNESP, Botucatu, credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. Um total de 144 indivíduos de ambos os sexos da espécie *I. oxyrinchus*, provenientes destes diversos pontos do Oceano Atlântico, tiveram a região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) 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 e relacionadas com as correntes marítimas atuantes na região de coleta para delimitação dos grupos.

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 nomenclatura de acordo com a proximidade da região continental correspondente. De acordo com os dados de coleta, foram obtidas 28 amostras no grupo Noroeste da África, 33 amostras no grupo Nordeste do Brasil, 46 amostras no grupo Sudeste do Brasil e 37 amostras do grupo Sudoeste da África (Figura 3).

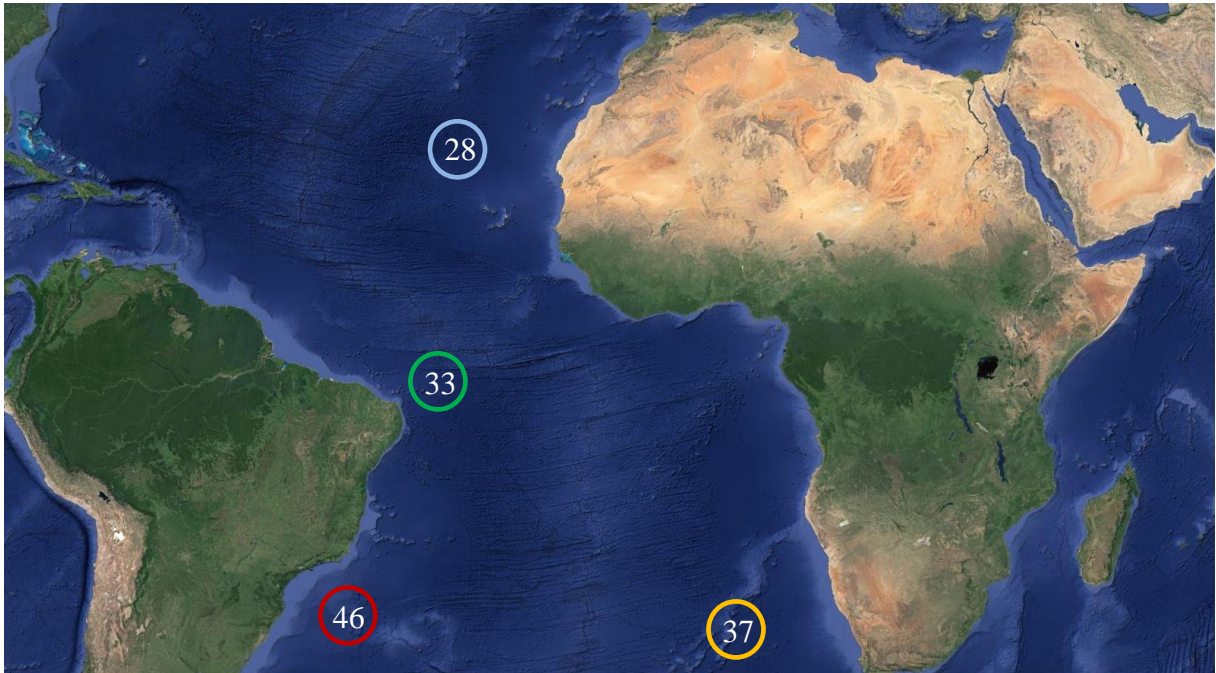


Figura 3. Mapa dos Hemisférios Norte e Sul e das regiões Leste e Oeste do Atlântico, identificando a distribuição dos grupos amostrais de tubarão mako, *Isurus oxyrinchus*. Em azul, grupo Noroeste da África; em verde, grupo Nordeste do Brasil; em vermelho, grupo Sudeste do Brasil; em amarelo, grupo Sudoeste da África. A amostragem em cada localidade é indicada pelo número dentro dos círculos.

3.2 Protocolos para o estudo populacional

3.2.1 Métodos moleculares

O DNA genômico foi extraído a partir de células musculares utilizando a metodologia descrita por Aljanabi & Martinez (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio. A amplificação dos segmentos de DNA da região controladora (D-loop), com cerca de 1300pb, foi efetuada em ciclador térmico de PCR utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 100 ng de primers (F. 5'- CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG - 3' e R. 5'- GGC TTA GCA AGG TGT CTT CTT GG - 3') utilizados por Mendonça *et al.* (2009) e 1 unidade de enzima *Taq* Polymerase (Invitrogen). Cada ciclo de PCR foi constituído basicamente na denaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com 35 repetições. Os segmentos de DNA amplificados serão visualizados em gel de agarose a 1%, corado com Gelgreen, sob luz azul.

Para purificação do DNA amplificado foi utilizado o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (Amersham Biosciences). As reações de sequenciamento foram realizadas a partir do seguinte protocolo: para cada amostra 2µl de pré-mix (fornecido no kit – Big Dye), 2µl de produto de PCR purificado e 2µl de primer (10µM), em termociclador. Após o final da reação de sequenciamento foi feita a purificação dos produtos da PCR pela remoção dos dideoxinucleotídeos não incorporados, em seguida, a composição nucleotídica destes fragmentos foi determinada no sequenciador automático ABI 3130.

3.2.2 Métodos de análise das sequências

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

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).

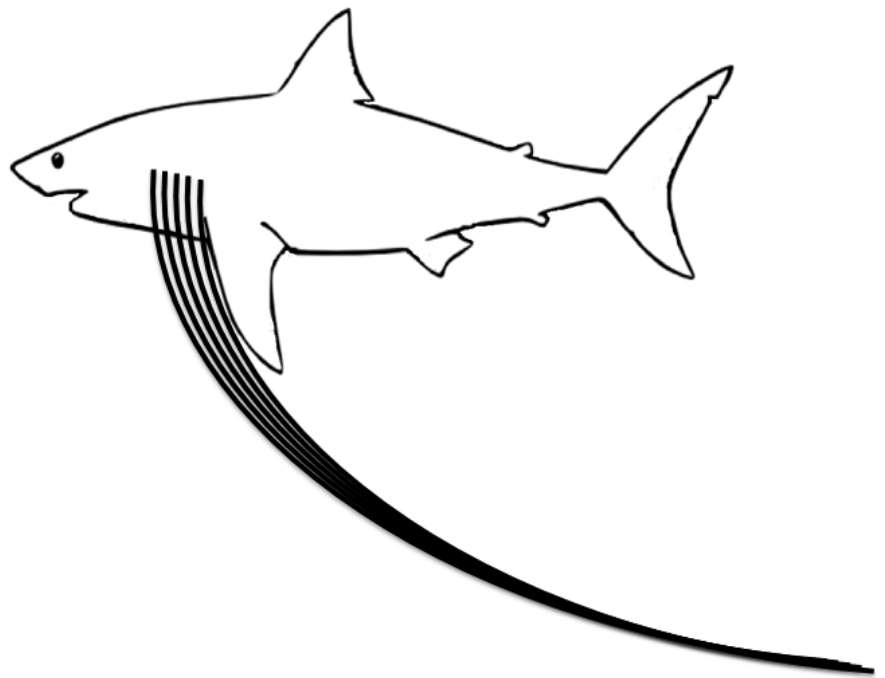
A matriz de distância genética entre filogrupos e a árvore de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Network 4.6 (Bandelt *et 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) testou 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} foi determinada pelas permutações não-paramétricas, considerando-se 1000 permutações (Excoffier *et al.* 2005).

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1989) e FS de Fu (Fu 1996) foram realizados no programa Arlequin 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências 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).



Resultados

4. Resultados

No segmento genômico correspondente à região D-Loop do DNA mitocondrial foi analisado um fragmento de 729 pares de bases (pb) em 144 indivíduos da espécie *Isurus oxyrinchus*, correspondente aos nucleotídeos compreendidos entre os sítios 16.701 a 17.430 do genoma mitocondrial completo de uma espécie de tubarão da ordem Lamniformes, *Mitsukurina owstoni* (GenBank EU528659.1), considerada como uma linhagem basal na filogenia de *I. oxyrinchus*. O conjunto gênico sequenciado é composto, em média, por 31,36% de timina, 28,79% de adenina, 27,12% de citosina e 12,73% de guanina. Os resultados indicaram um nível de variabilidade genética moderado ($\pi=0,004$ e $h=0,791 \pm 0,029$), originando 27 haplótipos ($h=27$) gerados a partir de 20 sítios segregantes ($S=20$), como mostrado na Tabela 1. O haplótipo 1 foi o mais comum, compartilhado por 60 indivíduos, sendo este haplótipo encontrado em indivíduos de todas as regiões estudadas (Tabela 2). Porém, percebe-se a menor incidência deste haplótipo na população Noroeste da África. A distribuição dos 27 haplótipos encontrados nos diferentes grupos de *I. oxyrinchus* pode ser observada na Figura 4, onde se nota um indicativo da diferenciação populacional entre duas áreas geográficas distintas, Noroeste da África e demais grupos.

De acordo com as análises genéticas, os maiores índices de diversidade gênica foram identificados no grupo Noroeste da África (0,865) e os menores para o grupo Sudeste do Brasil (0,575), conforme apresentado na Tabela 3.

Para o cálculo do índice de fixação par a par foram considerados quatro grupos amostrais, identificados como Nordeste do Brasil (NB), Noroeste da África (NA), Sudeste do Brasil (SB) e Sudoeste da África (SA). Os valores resultantes deste cálculo podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 1. Posição dos sítios polimórficos do DNAm e a variação em cada haplótipo em *I. oxyrinchus*.

Haplótipos	Posição dos Sítios Polimórficos																			
	24	47	58	108	109	143	149	165	166	169	211	214	219	220	221	227	241	258	259	392
H1	C	C	T	A	G	C	C	T	T	G	T	C	A	A	T	T	A	T	A	A
H2	T	A	.	.
H3	T	T	.
H4	T	.	C	G	C	.	.	A	.	.
H5	C
H6	T	.	C	G	A	.	.
H7	C
H8	C	G	C
H9	.	G	C
H10	.	.	C	G	.	.	.	C	A	.	.
H11	T	.	C	G	.	.	.	C	A	.	.
H12	G	.	.	.
H13	.	.	.	G
H14	.	.	.	G	A	C	T	.	G
H15
H16	T	.	C	G	.	.	.	C	A	.	C
H17	T	.	C	G	A	A	.	.
H18	.	.	.	G	.	.	.	C	A	.	.
H19	C	G
H20	.	.	.	G	.	.	.	C	G	C
H21	T	G
H22	G
H23	C	C
H24	T	.	C	G	.	.	A	.	C	A	.	.
H25	T	.	C	G	.	.	A	C	.	.	A	.	.
H26	T	.	C	G	.	.	A	C	A	.	.
H27	T

Tabela 2. Distribuição geográfica e número de haplótipos encontrados por grupo amostral em *I. oxyrinchus*., Em negrito estão os haplótipos exclusivos de cada área amostrada.

Haplótipo	Nordeste do Brasil	Noroeste da África	Sudeste do Brasil	Sudoeste da África	Total
H1	15	3	30	12	60
H2	-	-	2	-	2
H3	-	-	1	1	2
H4	4	9	2	-	15
H5	-	-	1	1	2
H6	2	3	1	6	12
H7	-	-	2	-	2
H8	-	-	2	-	2
H9	-	-	1	-	1
H10	-	-	1	-	1
H11	6	2	2	10	20
H12	-	-	1	1	2
H13	1	4	-	1	6
H14	-	-	-	1	1
H15	-	-	-	1	1
H16	-	-	-	1	1
H17	-	2	-	1	3
H18	-	-	-	1	1
H19	1	-	-	-	1
H20	1	-	-	-	1
H21	1	-	-	-	1
H22	1	-	-	-	1
H23	1	-	-	-	1
H24	-	1	-	-	1
H25	-	1	-	-	1
H26	-	2	-	-	2
H27	-	1	-	-	1
Total	33	28	46	37	144

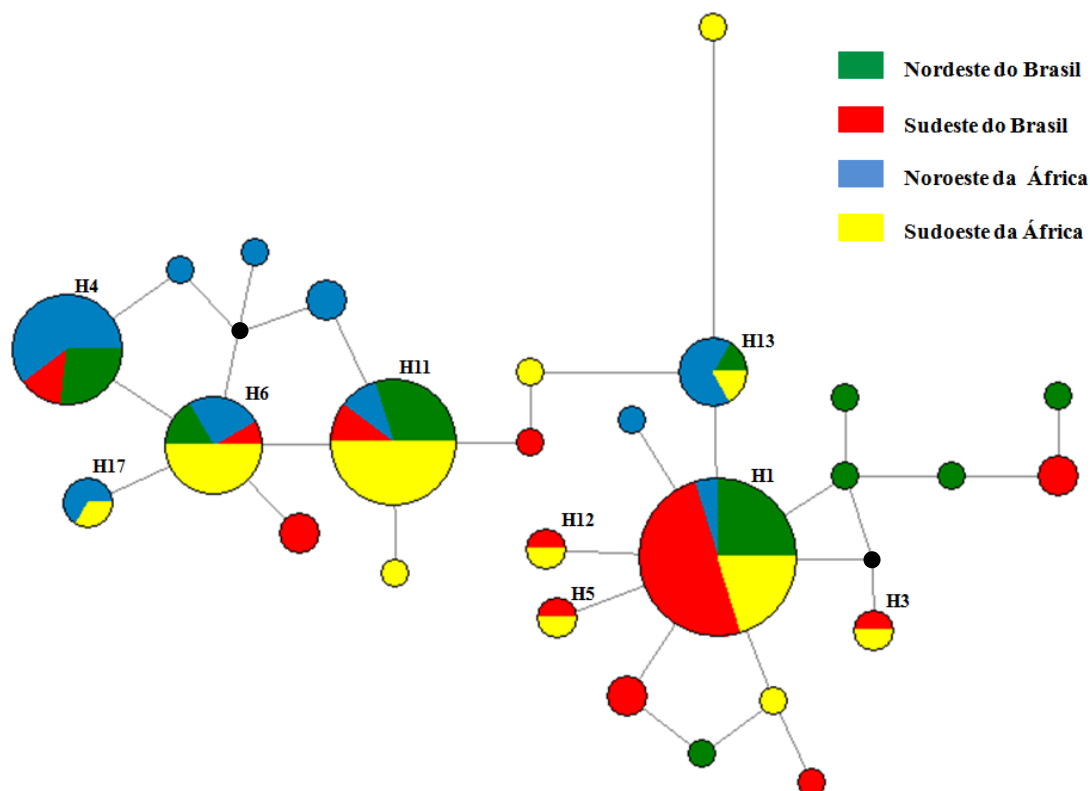


Figura 4. Rede de haplótipos com o agrupamento das localidades de coleta de *I. Oxyrinchus*. Os haplótipos estão separados por uma mutação ou mais mutações que correspondem à distância entre os círculos. Os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequências dos haplótipos.

Tabela 3. Estatísticas populacionais de *I. oxyrinchus*: N, tamanho amostral; diversidade gênica; Nh, número de haplótipos; Nsp, número de sítios polimórficos e diversidade nucleotídica.

Grupos	N	Diversidade Gênica	Nh	Nsp	Diversidade Nucleotídica
Nordeste do Brasil	33	0,759 +/- 0,065	10	9	0,149 +/- 0,089
Noroeste da África	28	0,865 +/- 0,045	10	9	0,134 +/- 0,082
Sudeste do Brasil	46	0,575 +/- 0,087	12	13	0,101 +/- 0,064
Sudoeste da África	37	0,811 +/- 0,041	12	15	0,154 +/- 0,091

Tabela 4. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de populações de *I. oxyrinchus*. Nível de significância de $p < 0,05$ em 1000 permutações. *Indica dados significativos.

Grupos	Nordeste do Brasil	Sudeste do Brasil	Sudoeste da África	Noroeste da África
Nordeste do Brasil	0,000			
Sudeste do Brasil	0,056*	0,000		
Sudoeste da África	0,011	0,161*	0,000	
Noroeste da África	0,171*	0,391*	0,106*	0,000

Tendo em vista a comparação par a par dos índices de fixação interpopulacional, foram elaboradas diferentes hipóteses de estruturação, sendo que os valores de F_{ST} são apresentados na tabela 5. A hipótese 4 mostra o maior valor de F_{ST} (0,245) e a hipótese 7 o menor valor de F_{ST} (0,061).

Tabela 5. Valores da AMOVA para os cenários de estruturação testados ($P < 0,05$). NB, Nordeste do Brasil; NA, Noroeste da África; SB, Sudeste do Brasil; SA, Sudoeste da África.

	Hipótese de estruturação	F_{ST}	P	% de variação
1	NB x NA x SB x AS	0,124	0,000	20,85
2	NB + NA x SB x AS	0,122	0,000	-6,89
3	NB + SB x NA + AS	0,150	0,000	7,33
4	NB + SB + SA x NA	0,245	0,000	19,91
5	SB x NB + NA + AS	0,146	0,000	4,51
6	SA x NB + NA + SB	0,073	0,000	-13,29
7	NB x NA + SA + SB	0,061	0,000	-15,07

Na Tabela 6 é possível verificar um maior índice de diversidade haplotípica no grupo Noroeste da África (0,865) e uma menor diversidade no grupo Sudeste do Brasil (0,627); porém, o grupo formado pela junção Noroeste da África e Sudoeste da África apresentou o maior valor (0,870).

Tabela 6. Diversidade haplotípica encontrada nos grupos amostrais de *I. oxyrinchus* e nas combinações dos grupos conforme as hipóteses elaboradas.

Hipótese	Diversidade haplotípica (hd)										
	NB	NA	SB	AS	NB +	NB +	NA +	NB +	NB +	NB +	NB +
1 NB x NA x SB x SA	0,759	0,865	0,627	0,794							
2 NB + NA x SB x SA			0,627	0,794	0,846						
3 NB + SB x NA + SA						0,687	0,870				
4 NB + SB + SA x NA		0,865						0,729			
5 SB x NB + NA + SA			0,627						0,837		
6 SA x NB + NA + SB											0,782
7 NB x NA + SA + SB	0,759							0,729			

A Tabela 7 mostra as distâncias geográficas médias entre os grupos amostrados e utilizando os testes de Mantel, que correlacionam distâncias genéticas com as distâncias geográficas, observa-se uma tendência de isolamento por distância, sendo 28,9% das variações genéticas encontradas explicadas pela distância geográfica (Figura 5). Excluindo as amostras do Nordeste do Brasil e Sudoeste da África, o isolamento geográfico explica 38.5% das distâncias genéticas (Figura 6).

Tabela 7. Distância em quilômetros entre os grupos amostrais de *I. oxyrinchus*.

Grupos	Distância em quilômetros na comparação par a par			
	Nordeste do Brasil	Sudeste do Brasil	Sudoeste da África	Noroeste da África
Nordeste do Brasil	0.000			
Sudeste do Brasil	3.580	0.000		
Sudoeste da África	3.800	2.800	0.000	
Noroeste da África	1.975	5.550	5.400	0.000

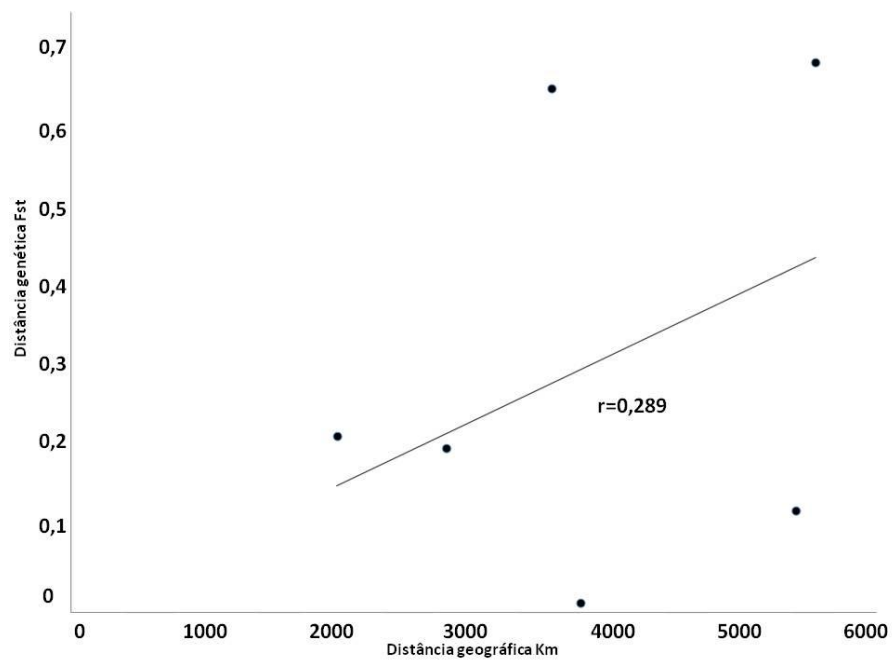


Figura 5. Gráfico da correlação de distâncias genética/geográfica para as populações de *I. oxyrinchus* utilizando todos os resultados por pares. As linhas de tendências mostram a correlação entre o aumento da distância genética com a distância geográfica.

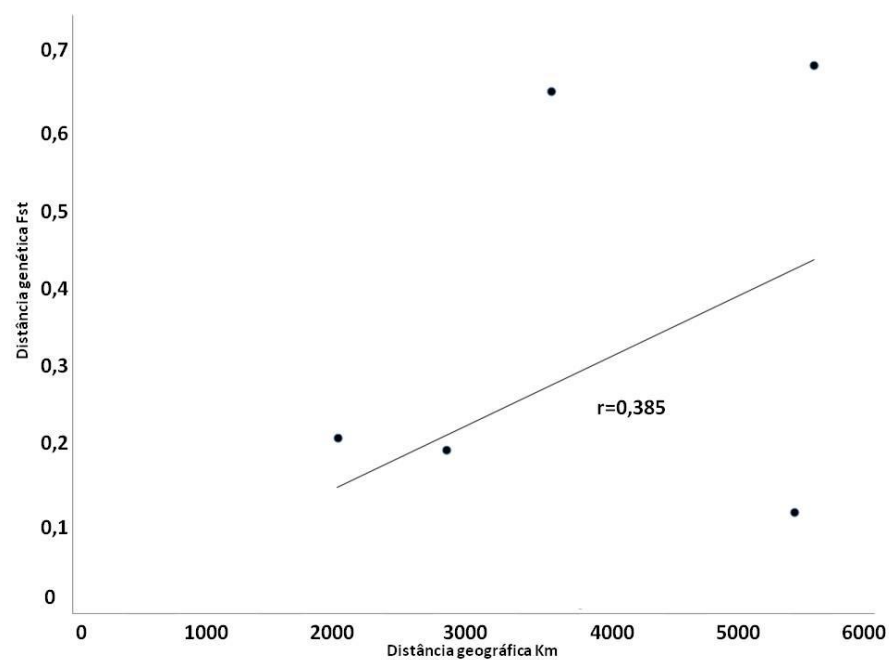
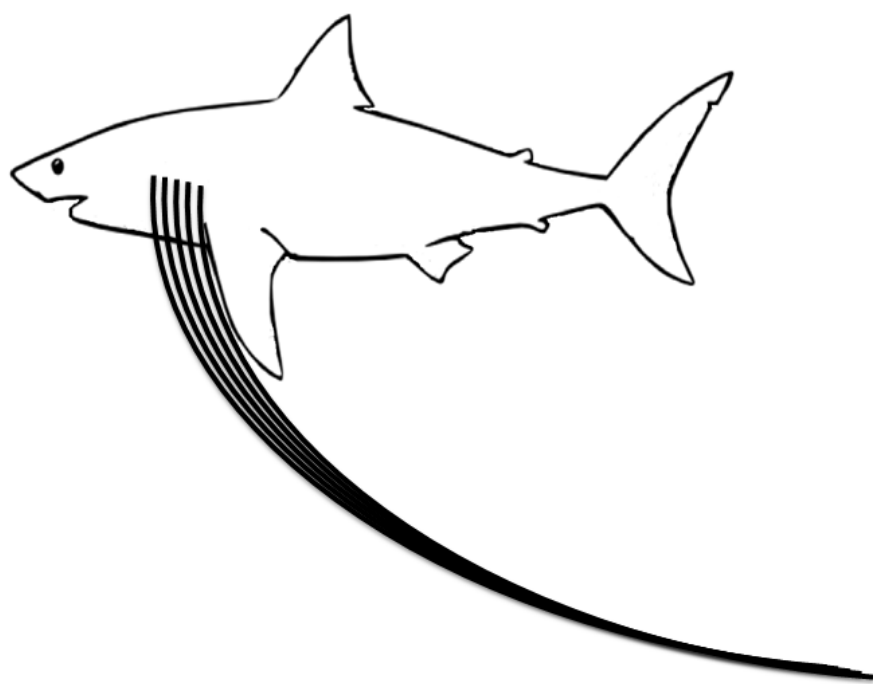


Figura 6. Gráfico da correlação de distâncias genética/geográfica de *I. oxyrinchus* excluindo os resultados obtidos entre Nordeste do Brasil e Sudoeste da África por não apresentar significância estatística no índice F_{ST} . As linhas de tendências mostram a correlação entre o aumento da distância genética com a distância geográfica.

Nos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu), valores localizados na tabela 8, foi observado um índice significativo de desvio para o FS de Fu no grupo Sudeste do Brasil, podendo ser relacionado com um evento de expansão populacional.

Tabela 8. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para cada população de *I. oxyrinchus*. A significância estatística considerada é $p < 0,05$ para D de Tajima e $p < 0,02$ para FS de Fu.

População	D de Tajima	Valor de P	FS de Fu	Valor de P
Noroeste da África	0.505	0.718	-2.087	0.146
Nordeste do Brasil	1.042	0.872	-1.246	0.301
Sudeste do Brasil	-0.969	0.178	-3.910*	0.035
Sudoeste da África	-0.455	0.333	-2.357	0.163



Discussão

5. Discussão

A variabilidade genética, a diferenciação populacional e, conseqüentemente, o isolamento genético, podem ser resultantes da atuação de vários fatores tais como a seleção natural, favorecendo genótipos ou alelos diferentes em cada subpopulação; processos aleatórios na transmissão dos alelos a cada geração (deriva genética); diferenças ao acaso nas frequências alélicas dos fundadores das subpopulações e fluxo gênico entre as subpopulações (Hartl 2010). Porém, a habilidade de uma espécie de se adaptar às constantes modificações do meio ambiente depende, em grande parte, do nível de diversidade genética encontrada na mesma (Solé-Cava 2001). No caso de peixes, a estrutura genética dentro e entre populações é influenciada principalmente pelo fluxo gênico e tamanho populacional efetivo (Gyllensten 1985).

A maioria das populações naturais são, de modo geral, agrupadas em subpopulações menores, entre as quais geralmente ocorrem cruzamentos. Quando há estruturação populacional, é quase inevitável que ocorra alguma diferenciação genética entre as subpopulações, ou seja, as frequências alélicas entre as populações se tornam diferentes. Essa diferenciação genética pode resultar da ocorrência do processo de seleção natural em favor dos diferentes genótipos em populações distintas, mas também pode resultar de processos aleatórios na transmissão dos alelos de uma geração para a próxima, ou ainda de diferenças casuais na frequência alélica entre os fundadores iniciais das subpopulações (Hartl 2010).

Baixos índices de diversidade nucleotídica são comuns em estudos realizados utilizando a região controle do mtDNA como marcador molecular em tubarões, tanto entre as espécies pelágicas quanto costeiras. Para *Carcharias taurus*, Ahonen et al. (2009) encontraram valores de $\pi=0,0041 \pm 0,00003$ e em estudos com *Galeorhinus galeus* e *Carcharhinus limbatus*, os valores de diversidade nucleotídica foram $\pi=0,0071 \pm 0,0037$ e $\pi=0,00214 \pm 0,0130$, respectivamente (Keeney & Heist 2006, Chabot & Allen 2009). Entre os representantes dos tubarões pelágicos, os valores de diversidade nucleotídica encontrados têm se mostrado relativamente baixos, como descrito por Hoelzel et al. (2006) em um estudo realizado com o tubarão peregrino *Cetorhinus maximus*, onde foram encontrados valores de $\pi=0,0013 \pm 0,0009$. Para o tubarão baleia, foram encontrados valores de $\pi=0,0011 \pm 0,006$ e para uma das espécies de tubarão-raposa (*Alopias superciliosus*) foi encontrado um valor de $\pi=0,00140 \pm 0,00047$ (Morales et al., 2012). Estes valores se apresentam similares aos encontrados neste estudo para *I. oxyrinchus*, reforçando a hipótese de que tubarões pelágicos

apresentam uma variabilidade genética que pode ser considerada muito baixa em relação àquela encontrada entre as espécies costeiras.

O valor de diversidade haplotípica encontrado no presente estudo também mostra-se compatível com outros trabalhos com espécies de tubarões pelágicos. Em *C. taurus*, o valor de diversidade haplotípica encontrado foi de $h=0,725 \pm 0,0002$ (Ahonen et al. 2009) e estudos com *G. galeus*, *C. limbatus* e *C. maximus* revelaram valores de $h=0,92 \pm 0,01$, $h=0,805 \pm 0,018$ e $h=0,720 \pm 0,028$, respectivamente, para estas espécies (Hoelzel et al. 2006, Keeney & Heist 2006, Chabot & Allen 2009). Para outros elasmobrânquios como *Rhincodon typus*, *Sphyrna lewini*, *Rhizoprionodon lalandii*, *Stegostoma fasciatum*, os valores de diversidade haplotípica foram de $h=0,80 \pm 0,020$, $h=0,974 \pm 0,008$, $h=0,8239$ e $h=0.484 \pm 0.112$, respectivamente (Duncan et al. 2006, Castro et al. 2007, Mendonça et al. 2009; Dudgen et al. 2009).

Os eventos de migração interferem na formação de diferentes grupos populacionais e alterar significativamente a composição genética de uma população. Os resultados obtidos neste estudo mostram uma alta estruturação populacional entre o grupo Sudeste do Brasil e o grupo Noroeste da África, com base no F_{ST} encontrado entre os grupos que foi de 0,391. Segundo Wright (1978), valores acima de 0,25 sugerem uma forte estruturação. A distância geográfica entre a maioria dos pontos de coleta que envolve cada grupo foi em média de 5.550 km. Estes dados mostram uma correlação entre a distância e o grau de estruturação entre os grupos citados de acordo com as análises realizadas nos testes de Mantel. No entanto, também se deve relacionar a distância geográfica com a temperatura da Corrente do Brasil que, embora seja uma corrente quente, parece demonstrar que a migração de indivíduos do grupo Sudeste do Brasil para o grupo Noroeste da África seja prejudicada pela presença da Corrente das Canárias, que além de ser uma corrente de águas frias, não se encontra com a Corrente do Brasil, devido ao fluxo das Correntes Equatoriais do Norte e do Sul.

É provável que as Correntes Equatoriais e a Corrente das Canárias promovam o aparecimento de barreiras que resultem numa distinção genética entre os grupos pertencentes aos Hemisférios Norte e Sul. Heist (2008) realizou estudos genéticos sobre as populações com base em amostras de DNA mitocondrial de indivíduos do Atlântico Norte e Sul e no Pacífico. Seus resultados não sustentaram a presença de grandes diferenças nos materiais genéticos, embora o material do Atlântico Norte tenha apresentado diferenças em relação ao do Atlântico Sul.

Estudos realizados por Heist *et al.* (1996), Schrey & Heist (2003) sugerem que os makos do oeste do Atlântico Norte formam uma população separada das do leste do Atlântico Norte, embora uma miscigenação limitada seja possível. As análises de DNA mitocondrial do *Isurus oxyrinchus* indicam a separação de fêmeas de mako entre o oeste e nordeste do Atlântico, mas a falta de diferenciação no DNA nuclear sugere mistura dos machos em todo o norte do Atlântico (Heist *et al.* 1996, Schrey & Heist 2003). Embora haja segregação entre os estágios de desenvolvimento (Nakano & Nagasawa 1996) e segregação sexual geográfica (Mucientes *et al.* 2009), pouco se sabe sobre a estrutura das populações ou sobre a diversidade genética de *I. oxyrinchus* no Atlântico (Heist *et al.* 1996). Pode ser que o mesmo tipo de miscigenação aconteça no Hemisfério Sul, mas os dados obtidos neste estudo são insuficientes para confirmar tal hipótese.

O índice de F_{ST} (0,245) encontrado na comparação Hemisfério Norte (grupo Noroeste da África) com o Hemisfério Sul (grupos Nordeste do Brasil, Sudeste do Brasil e Sudoeste da África) apontam para uma alta estruturação genética, sendo que este valor sugere a presença de dois estoques pesqueiros. Aliado aos resultados obtidos, as análises de diversidade haplotípica mostram uma alta diversidade (0,865) no Hemisfério Norte. Mesmo considerando que este grupo possui um número menor de amostras ($n=28$), os resultados da diversidade haplotípica (0,729) são superiores aos do Hemisfério Sul, embora com um maior número de amostras ($n=116$). No comparativo sobre a diversidade gênica, o grupo Noroeste África também apresenta os maiores níveis de diversidade em relação aos outros grupos. A junção de todos esses resultados indica que a população do Hemisfério Norte apresenta maior diversidade genética e que as populações estudadas de *Isurus oxyrinchus* não são geneticamente homogêneas.

Quando se compara o grupo Sudeste do Brasil e o grupo Nordeste do Brasil, observa-se uma estruturação populacional moderada (Wright 1978), pois a análise dos dados indica um F_{ST} de 0,058. Neste caso, a distância encontrada entre a maioria dos pontos de coleta que envolve cada grupo foi em média 3.580 km. Tais números mostram uma correlação ente a distância geográfica e o grau de estruturação entre os grupos citados. Porém, esta estruturação populacional moderada parece estar intimamente ligada à temperatura da água da Corrente do Brasil, pois de certa forma favorece a migração de alguns indivíduos permitindo maior fluxo gênico. Mesmo assim, a diversidade haplotípica no grupo Sudeste do Brasil é a mais baixa (0,627) no comparativo com os demais grupos, e os testes de neutralidade apontam para uma expansão populacional. Considera-se, pois, que tenha ocorrido um *bottleneck effect*, uma vez

que vários autores sugerem que as glaciações do Pleistoceno compreenderam os eventos mais importantes para moldar os padrões filogeográficos expressos no DNA mitocondrial e na estruturação populacional de espécies de peixes marinhos (Brunner *et al.* 2001; Planes *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002; Grunwald *et al.* 2002).

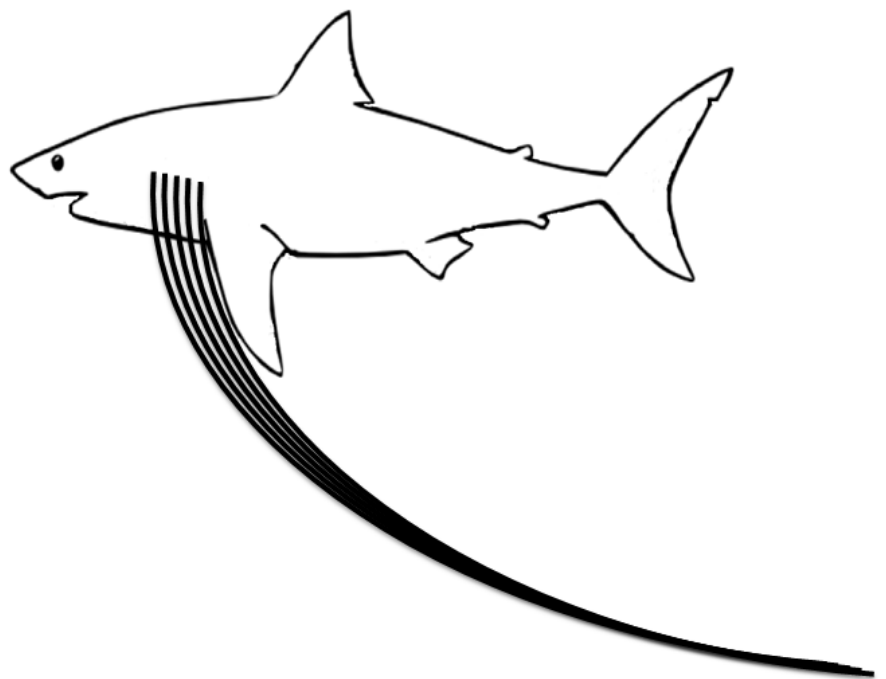
A análise da diversidade haplotípica dos grupos pertencentes ao conjunto localizado no Hemisfério Sul, mostram o menor índice (hd 0,627) para o grupo Sudeste do Brasil. Os menores índices também foram obtidos na comparação da diversidade gênica (0,575) e da diversidade nucleotídica (0,101). Esses resultados podem sugerir uma possível sobreexploração da espécie na região e a necessidade de esforços para que ocorra um manejo diferenciado para a área citada.

A análise dos grupos Sudeste do Brasil e Sudoeste da África mostra uma alta estruturação populacional (conforme Wright 1978), onde o índice de F_{ST} foi de 0,161. Embora a distância entre os pontos de coleta seja em média de 2.800 km e se mostre menor que a distância geográfica entre o grupo Sudeste do Brasil e Nordeste do Brasil, a estruturação populacional verificada é maior entre os grupos Sudeste do Brasil e Sudoeste da África. Isto provavelmente se deve à presença de regiões de águas mais frias entre esses grupos, podendo determinar uma dificuldade maior entre o fluxo gênico dos grupos em comparação com a temperatura das águas da Corrente do Brasil, que interligam os grupos Sudeste do Brasil e Nordeste do Brasil.

Os dados obtidos na comparação entre os grupos Sudoeste da África e Nordeste do Brasil não podem ser levados em consideração na formação de estruturação populacional, embora o F_{ST} encontrado na comparação par a par tenha sido de 0,01133, uma vez que não há significância estatística, como mostra a Tabela 4. Do mesmo modo, os resultados obtidos na comparação Sudoeste da África e Noroeste da África mostram valores moderados de estruturação populacional, com F_{ST} 0.10642, Wright (1978). É provável que haja uma interferência das correntes oceânicas (Equatoriais e Canárias) na estruturação destes grupos, pois estas parecem dificultar os processos migratórios entre esses dois grupos.

A detecção da estrutura da população é importante para a gestão eficaz da espécie, sendo a presença da estruturação genética um indicativo de menores taxas de migração, que podem exigir entre outras ações um manejo diferenciado nas unidades independentes (Moritz 1994). No presente estudo foi observada a existência de alta estruturação genética entre o grupo Noroeste da África, localizado no Hemisfério Norte em relação ao conjunto formado pelos grupos Nordeste do Brasil, Sudeste do Brasil e Sudoeste da África, pertencentes ao

Hemisfério Sul. Então, a implantação de um manejo diferenciado entre os dois estoques pesqueiros citados seria interessante para a manutenção e preservação da diversidade genética desta espécie nos diferentes Hemisférios. Os dados obtidos confirmam também a proposição de que os estudos genéticos populacionais constituem uma importante ferramenta na definição de estratégias para a gestão da pesca (Carvalho & Hauser 1994).



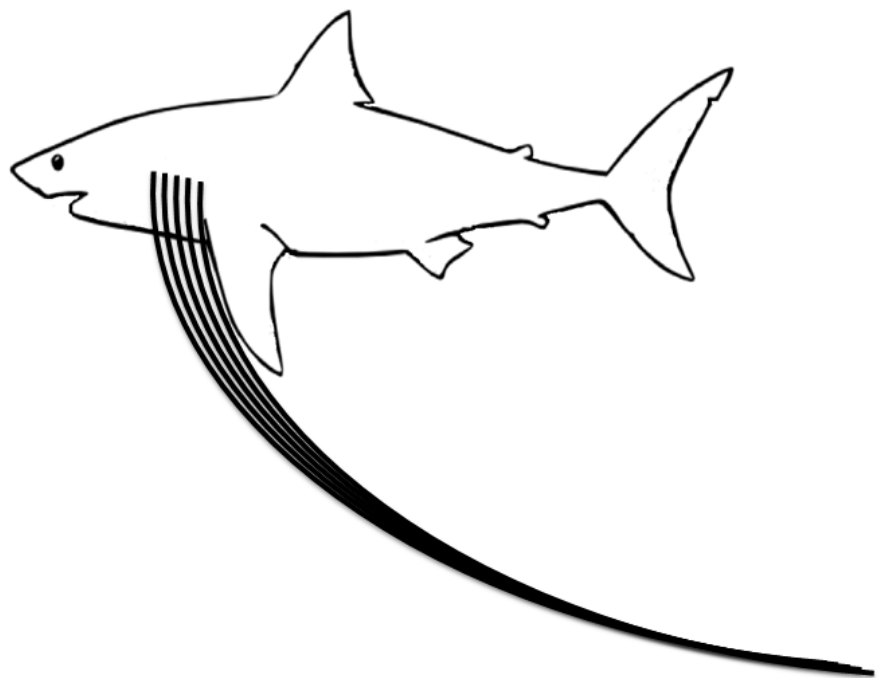
Considerações Finais

6. Considerações Finais

Ultimamente vem crescendo a aplicação de metodologias genéticas nas vastas áreas da Biologia da Conservação, sendo uma das ferramentas principais, o emprego de marcadores genéticos para diversos objetivos. Neste estudo, realizado com a região controle D-loop do DNAm_t, a funcionalidade do marcador molecular possibilitou a resolução de algumas questões relevantes relacionadas com as hipóteses sobre distribuição e características genéticas populacionais de uma espécie de tubarão amplamente explorada pela pesca.

A abordagem filogeográfica do tubarão *Isurus Oxyrinchus* produziu importantes informações a respeito da distribuição e migração desta espécie ao longo do Oceano Atlântico. Este estudo possibilitou a formulação de algumas hipóteses sobre a estruturação populacional desta espécie na sua área de distribuição, promovida principalmente pelos padrões de deslocamentos das correntes marítimas. Os dados foram plausíveis na caracterização da estruturação populacional, principalmente na hipótese que trata sobre as diferenças genéticas entre, a população do Oceano Atlântico Norte e a população do Oceano Atlântico Sul.

Os resultados são de suma importância para a gestão e manejo dos estoques pesqueiros do *I. Oxyrinchus*. A delimitação e a alternância na exploração dos estoques pesqueiros podem facilitar a recuperação da população, tanto em biomassa, quanto em variabilidade genética, promovendo a longa utilização deste recurso natural.



Referências

7. Referências

- Ahonen H, Harcourt RG, Stow AJ (2009) Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Molecular Ecology* 18(21): 4409-4421.
- Aljanabi SM & Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692–4693.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA (2003) Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science* 299: 389-392.
- Beheregaray LB & Sunnucks P (2001) Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Molecular Ecology* 10(12): 2849-2866.
- Bermingham E & Martin AP (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* 7: 499-517.
- Bernal D, Sepulveda C, Mathieu-Costello & Graham JB (2003) Comparative studies of high performance swimming in sharks I. Red muscle morphometrics, vascularization and ultrastructure. *Journal of Experimental Biology* 206: 2831-2843.
- Bigelow HB & Schroeder WC (1948) *Fishes of the western north Atlantic. Part One. Lancelets, Cyclostomes, Sharks*. Sears Foundation for Marine Research, Yale University, New Haven, 576p.

- Bonhomme F, Naciri M, Bahri-Sfar L, Lemaire C (2002) Comparative analysis of genetic structure of 2 species of marine fish *Dicentrarchus labrax* and *Dicentrarchus punctatus*. *Comptes Rendus Biologies* 325(3): 213-220.
- Brunner PC, Douglas MR, Osinov A, Wilson CC & Bernatchez L (2001) Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 55(3): 573-586.
- Cailliet GM, Smith WD, Mollet HF, Goldman KJ (2006) Age and growth studies of Chondrichthyan fishes: the need for consistence in terminology, verification, validation, and growth function fitting. *Environmental Biology of Fishes* 77: 211-228.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Brautigam, Fordham FS (1998) Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 20, 39p.
- Carey FG & Middleton L (1978) Mako shark experiment on Wieczno. National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center, Woods Hole Laboratory, 80(7), 12p.
- Carvalho GR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 326-350.
- Casey JG & Kohler NE (1992) Tagging studies on the shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*) in the western North Atlantic. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43: 45-60.
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG (2007) Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* 16: 5183-5192.
- Castro JI, Woodley CM & Brudek RL (1999) A preliminary evaluation of the status of shark species. FAO Fisheries Technical Paper, 380: 72p.
- Chabot CL & Allen LG (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Molecular Ecology* 18: 545-552.
- Chapman DD, Pinhal D, Shivji MS (2009) Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research* 9: 221-228.
- Conover DO & Munch SB (2002) Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science* 297(5578): 94-96.
- Compagno LJ (2002) Carcharhinidae. In: Carpenter, K.E (Ed.), *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic*, vol. 1, Introduction, Mollusks, Crustaceans, Hagfishes, Sharks, Batoid Fishes, and Chimaeras. FAO Species Identification Guide for

- Fisheries Purposes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication 5, 486p.
- Compagno LJV (2001) *Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes).* FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 1, Vol.2 Roma, FAO, 269p.
- Compagno LJV (1984) *Species Catalogue. Sharks of the World. A, Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes.* FAO Fish. Synop. 4(125): 251-655.
- Compagno LJV, Dando M, Fowler S (2005) *Sharks of the world.* New Jersey: Princeton University Press, 368 p.
- Domeier ML (2012) *Global perspectives on the biology and life history of the White Shark.* New York: Taylor & Francis Group, 540p.
- Dudgeon CL, Broderick D & Ovenden JR (2009) IUCN classification zones concord with, but underestimate, the population genetic structure of the zebra shark *Stegostoma fasciatum* in the Indo-West Pacific. *Molecular Ecology* 18: 248–261.
- Dulvy NK, Sadovy Y, Reynolds JD (2003) Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and Fisheries* 4(1): 25-64.
- Duncan KM, Martin APB, Bowen W, De Couet HG (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology* 15, 2239–2251.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier LG, Laval S & Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FAO (2009) FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 1. *Sharks of the World, Vol. 2.*
- Ferreti F, Worm B, Britten GL, Heithaus MR & Lotze HK (2010) Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology Letters* 13(8): 1055-1071.

- Ferris SD & Berg WJ (1987) The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. In: Population Genetics and Fisheries Management (Ryman N & Utter F, eds.). University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 277-301.
- Fu YX (1996) Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics* 144: 829-838.
- Fu YX & Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Gemballa S, Konstantinidis P, Donley JM, Sepulveda C & Shadwick RE (2006) Evolution of high-performance swimming in sharks: Transformations of the musculotendinous system from subcarangiform to thunniform swimmers. *Journal of Morphology* 267(4): 477-493.
- Gibson AJF & Campana SE (2005) Status and recovery potential of porbeagle shark in the Northwest Atlantic. *Fisheries and Oceans* 1-75.
- Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R & Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology* 11(10): 1885-1898.
- Gyllensten U (1985) The genetic structure of fish: Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *Journal of Fish Biology* 26(6): 691-699.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hartl DL (2010) Princípios de genética de populações. Hartl DL, Clarck AG (tradução: Lura Roberta Pinto Utz, Maria Regina Borges-Osório, Nelson Jurandi Rosa Fagundes); consultoria, supervisão e revisão: Eizirik E. 4ªed. Porto Alegre. 660p.
- Heist EJ (2008) Molecular markers and genetic population structure of pelagic sharks. *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries, and Conservation*, pp. 323-333.
- Heist EJ, Musick JA & Graves JE (1996) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(3): 583-588.
- Hilsdorf AWS, de Resende EK & Marques DKS (2006) Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. *Embrapa Pantanal*, Documento 82.
- Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP (2006) Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters* 2: 639-642.

- Hoey JJ (1983) Analysis of longline fishing effort for apex predators (swordfish, shark, and tuna) in the western North Atlantic and Gulf of Mexico. University of Rhode Island, 576p.
- Holts DB (1988) Review of U.S. west coast commercial shark fisheries. *Marine Fisheries Review* 50(1): 1–8.
- Holts DB & Bedford DW (1993) Horizontal and vertical movements of the shortfin mako shark, *Isurus oxyrinchus*, in the southern California bight. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 44: 901–909.
- IBAMA (2009) Proposta de plano de gestão para o uso sustentável do grupo de elasmobrânquios sobre-explotados ou ameaçados de sobre-explotação no Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Brasília – DF, pp 30-34.
- ICCAT (2004) Report of the 2004 inter-sessional meeting of the ICCAT Subcommittee on bycatches: shark stock assessment. *Collective Volume of Scientific Papers*, ICCAT 57.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010(1).
- Kenney DB & Heist EJ (2006) 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* 1: 365-294.
- Kohler NE, Turner PA, Hoey JJ, Natanson LJ & Briggs R (2002) Tag and recapture data for three pelagic shark species: blue shark (*Prionace glauca*), shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*), and porbeagle (*Lamna nasus*) in the north Atlantic ocean. *Collective Volume of Scientific Papers*, ICCAT 54(4): 1231-1260.
- Kuusipalo L (1999) Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia* 407: 141-148.
- Lack M & Sant G (2006) 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. Australian Department of the Environment and Heritage and TRAFFIC Oceania.
- Lacy RC & Lindenmayer DA (1995) A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum, *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in south-eastern Australia. I. Demographic stability and population persistence. *Biological Conservation* 73: 119-129.

- Levy JA & Cassano VPF (1994) Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107 B (4): 515-517.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig, OBF & Foresti F (2013) Diversity and genetic population structure of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* (in press).
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2011) Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21(4): 799-814.
- Mendonça FF, Oliveira C, Burgess G, Coelho R, Piercy A, Gadig OBF & Foresti F (2011) Species delimitation in sharpnose sharks (genus *Rhizoprionodon*) in the western Atlantic Ocean using mitochondrial DNA. *Conservation Genetics* 12(1): 193-200.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology* 7(2): 213-216.
- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa N° 05, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28 de maio de 2004.
- Morales MJA (2012) Análise genética do tubarão raposa *Alopias superciliosus* no Oceano Atlântico, utilizando a região controle do DNA mitocondrial. Dissertação (mestrado). 46pp. UNESP/Botucatu.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9(10): 373-375.
- Mucientes GR, Queiroz N, Sousa LL, Tarroso P & Sims DW (2009) Sexual segregation of pelagic sharks and the potential threat from fisheries. *Biology Letters* 5(2): 156-159.
- Musick JA (1999) Criteria to define extinction risk in Marine fishes: The American Fisheries Society initiative. *Fisheries* 24(12): 6-14.
- Musick JA, Burgess G, Cailliet G, Camhi M & Fordham S (2000) Marine, estuarine, and diadromous fish stocks at risk of extinction in North America (exclusive of Pacific salmonids). *Fisheries* 25(11) 6-30.
- Myers RA, Baum JK, Shepherd TD, Powers SP & Peterson CH (2007) Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* 315(5820): 1846-1850.

- Nakano H & Nagasawa K (1996) Distribution of pelagic elasmobranchs caught by salmon research gillnets in the North Pacific. *Fisheries Science* 62(6): 860-865.
- Natanson LJ & Cailliet GM (1986) Reproduction and development of the Pacific angel shark, *Squatina californica*, off Santa Barbara, California. *Copeia* 4: 987-994.
- Olsen EM, Heino M, Lilly GR, Morgan MJ, Brattey J, Ernande B & Dieckmann U (2004) Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature* 428(6986): 932-935.
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Reviews of Ecology Systems* 25: 547-572.
- Paternello T, Marcato S, Zane L, Varotto V, Bargelloni L (2003) Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 420-429.
- Pepperell JA (1992) Trends in the distribution, species composition and size of sharks caught by gamefish anglers off south-eastern Australia, 1961–90. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43: 213–226.
- Perdices A, Cunha C, Coelho MM (2004) Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 192-203.
- Planes S, Doherty PJ & Bernardi G (2001) Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Evolution* 55(11): 2263-2273.
- Rand DM & Kann LM (1998) Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetica* 102/103(1-6): 393-407.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003) DnaSP Nucleotide, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schrey AW & Heist EJ (2003) Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60(6): 670-675.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW (2008) Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology* 17(24): 5336-5348.

- Simpfendorfer CA, Hueter RE, Bergman U & Connett SMH (2001) Results of a fishery-independent survey for pelagic sharks in the western North Atlantic, 1977–1994. *Fisheries Research* 55(1): 175-192.
- Smith CL (1997) National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720p.
- Smith PJ, Jamieson A & Birley AJ (1990) Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 47: 231- 328.
- Solé-Cava AM & Matioli SR (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto, pp. 172-192.
- Stevens JD (1992) Blue and mako shark by-catch in the Japanese longline fishery off south-east Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43: 227-236.
- Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA (2000) The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (Chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *Journal of Marine Science* 57: 476-494.
- Tajima F (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457-1465.
- Tajima F (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Teixeira AF (2011) Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Templeton AR (2011) Genética de populações e teoria microevolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, SBG, 1ª edição, 705p.
- Toledo Filho S, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Galhardo E, Donola E (1992) Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: USP, 39 p.

- Wang J, Lin H, Huang S, Pan C, Chen X & Chiang T (2004) Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1143-1156.
- Ward RD, Woodswark M & Skibinski DOF (1995) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44: 48-52.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 91-201.
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol 4. Variability within and among natural populations. Chicago: The University of Chicago Press, 590p.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright S (1949) The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics* 15(1): 323-354.