

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Aline Freire Teixeira

Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial

Mestrado

Botucatu, 2011

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Aline Freire Teixeira

Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Zoologia

Orientador: Fausto Foresti

Co-orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Botucatu, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Teixeira, Aline Freire.

Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial / Aline Freire Teixeira.
- Botucatu, 2011

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Tubarão azul (peixe) - Brasil.

Palavras-chave: Conservação; D-loop; Elasmobranchii; Genética de populações; *Prionace glauca*; Tubarão azul.



Aos meus pais, Lincoln e Maria Cecília, que sempre me incentivaram e lutaram pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Agradecimentos

O meu maior agradecimento a Deus pela Sua presença constante e ativa na minha vida, muito importante para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fausto Foresti, obrigada pela oportunidade de aprendizagem e crescimento, pela credibilidade, acessibilidade e orientação durante todo o mestrado.

Obrigada também ao meu co-orientador, prof. Dr. Otto Gadig pela co-orientação que, embora à distância, me ajudou quando precisei.

Obrigada ao prof. Dr. Claudio Oliveira por ser o grande provedor do laboratório e pela disponibilidade em ajudar e ensinar.

Sou muito grata ao Fernando Mendonça, pela disposição e disponibilidade em me auxiliar na execução de toda essa pesquisa.

Agradeço também a Luiz Henrique Pereira, Luiz Henrique Ussami, Bruno Melo, Fabio Roxo, Luciana Aleixo e Joana Meyer, que me ajudaram nas dúvidas em biologia molecular, programas de software, interpretação dos dados e metodologia.

Obrigada ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e fomento à pesquisa.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Morfologia, assim como à Seção de Pós-Graduação deste instituto pela estrutura oferecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada aos meus pais, Lincoln e Maria Cecília; meu irmão Gustavo; e minhas irmãs Lílian e Elaine por fazerem parte da minha vida como família e amigos e por contribuírem para a formação do meu caráter.

Obrigada Davi, que entrou na minha vida no final do mestrado, mas que foi essencial ao me ajudar e apoiar nessa etapa importante.

Obrigada aos amigos de república, principalmente Joana e Luciana, que dividiram comigo as dificuldades e alegrias de ser independente e de morar longe da família. Vocês foram minhas irmãs em Botucatu. Um brinde!

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, que conviveram comigo grande parte dos meus dias durante o mestrado, conversando, almoçando, festando, me acolhendo em suas casas, e tornando o ambiente de trabalho sempre agradável... muito obrigada!

Resumo

O tubarão azul, *Prionace glauca*, é considerado a espécie de elasmobrânquio encontrada em maior abundância, com ampla distribuição geográfica, alta taxa de natalidade e de rápido crescimento. Entretanto, também é a espécie mais explorada na pesca oceânica em nível mundial, o que tem levado a desequilíbrios estruturais das populações e aumentado as possibilidades de risco para a espécie. Em avaliações sobre o estado de conservação da espécie, realizadas no Brasil e também de maneira global, *P. glauca* foi classificada como “quase ameaçada”. Para o setor pesqueiro, a identificação de estoques diferenciados constitui informação fundamental pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos. A diferença nas frequências de haplótipos de DNA entre amostras geográficas pode ser usada para estimar indiretamente padrões de diferenciação e de fluxo gênico e, portanto, a estrutura genética das amostras. Este trabalho utilizou amostras de tecidos musculares e epiteliais de tubarões azuis capturados pela frota pesqueira brasileira no Rio Grande do Sul (n = 38), São Paulo (n = 28) e Rio Grande do Norte (n = 31). Os níveis de variabilidade e estruturação genética nas regiões amostradas foram determinados a partir do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (D-loop). Para *P. glauca*, este marcador apresentou 16 sítios polimórficos e 32 haplótipos. Os valores encontrados para diversidade haplotípica e nucleotídica foram, respectivamente, $Hd = 0,89 \pm 0,020$ e $\pi = 0,00258 \pm 0,00013$. O teste AMOVA detectou uma moderada estruturação populacional entre as regiões amostradas, com o maior valor de $F_{st} = 0,103$. Assim, considera-se para os

efeitos de manejo pesqueiro, um único estoque da espécie na costa brasileira. Os níveis de estruturação genética demonstrados nesse trabalho, associados aos dados de exploração pesqueira do tubarão azul, dão indicações da necessidade de maior atenção à conservação da espécie no Brasil. Amostras de outras regiões do Oceano Atlântico Sul e Norte devem ser coletadas e analisadas a fim de esclarecer as divergências e lacunas sobre a estruturação genética populacional de *P. glauca* em todo o Atlântico, assim como sua caracterização filogeográfica.

Abstract

The blue shark, *Prionace glauca*, is the most abundant elasmobranch, with widest distribution, high birth rates and faster growth. However, it is also the most exploited species in the ocean fisheries worldwide, which has led to structural imbalances of their population and increased potential risk to the specie. In assessments of the state of conservation of the species, carried out in Brazil and globally, *P. glauca* was classified as "near threatened" according to IUCN categories. In fisheries, the stock identification are considered very important information due the direct relation with the total productivity and sustainable use of resources. The difference in the frequencies of haplotypes of DNA among geographic samples can be used to indirectly estimate patterns of differentiation and gene flow and thus the genetic structure of stocks. In the present study samples of muscle and epithelial tissues of blue sharks caught by the fishing fleet in Rio Grande do Sul (n = 38), São Paulo (n = 28) and Rio Grande do Norte (n = 31) estates were used. The levels of variability and genetic structure of the sampled regions were determined from the sequencing of mitochondrial DNA control region (D-loop). The use of this marker in *P. glauca* resulted in 16 polymorphic sites and 32 haplotypes. The nucleotide and haplotype diversity was, respectively, $Hd = 0.89 \pm 0.020$ and $\pi = 0.00258 \pm 0.00013$. The AMOVA test detected a moderate population subdivision among the sampled regions, with highest value of $F_{st} = 0,103$. Similarly, it is considered for the effects of fisheries management, a single stock in the Brazilian coast. The levels of genetic structure demonstrated in the present study, combined with data from fisheries exploitation of the blue shark, indicate the need for

greater attention to the preservation of the species in Brazil. Samples from other regions of South and North Atlantic Ocean should be collected and analyzed to clarify the discrepancies and gaps on the population genetic structure of *P. glauca* across the Atlantic as well as phylogeographic characterization.

Sumário

1. Introdução.....	2
1.1. <i>Prionace glauca</i>	2
1.2. DNA mitocondrial, estrutura populacional e conservação	5
1.3. Objetivos	10
2. Material e métodos.....	13
2.1. Coleta das amostras	13
2.2. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	14
2.3. Análise da estrutura populacional	15
3. Resultados.....	18
3.1. Caracterização e variabilidade das sequências gênicas.....	18
3.2. Estrutura populacional	21
4. Discussão	25
4.1. Estrutura populacional e distribuição do tubarão azul <i>Prionace glauca</i>	25
4.2. Conservação	32
5. Conclusões.....	35
6. Referências.....	37

Introdução

1. Introdução

1.1. *Prionace glauca*

A Subclasse Elasmobranchii (Classe Chondrichthyes) abrange os peixes conhecidos como tubarões e raias (Compagno, 1984). No Brasil, essa fauna é rica e diversa, com cerca de 170 espécies registradas, das quais 90 são tubarões e pouco mais de 80 são raias (Gadig, 2001; Menezes *et al.*, 2003). O tubarão azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), pertence à família Carcharhinidae (Compagno, 1984) e apresenta, como características morfológicas, corpo esbelto de coloração azul índigo com comprimento total de aproximadamente 300 cm (Nakano & Seki, 2003), focinho longo e afilado, nadadeiras peitorais muito longas, primeira nadadeira dorsal situada posteriormente em relação às nadadeiras peitorais, olhos grandes, dentes superiores curvos e serrilhados e inferiores oblíquos e levemente serrilhados (Compagno, 1984; Gadig, 2001). No Sul do Brasil, os machos alcançam a maturidade com aproximadamente 210 cm de comprimento total e as fêmeas com 195 cm de comprimento total (Legat & Vooren, 2004).

A distribuição de *P. glauca* nos oceanos parece variar de acordo com a latitude e longitude. No Pacífico Norte, os pequenos juvenis migram para o sul, enquanto as fêmeas movem-se para o norte e para o leste (Nakano, 1994; McKinnel & Seki, 1998). Já no Pacífico Sudoeste, entre 15°S e 49°S, os indivíduos capturados são principalmente juvenis, sendo as fêmeas mais abundantes em latitudes maiores (Stevens, 1984; 1992). No Pacífico Sudeste

há a predominância de machos e fêmeas juvenis em iguais proporções (Mejuto & García-Cortés, 2005). No Atlântico Norte, os juvenis machos grandes permanecem no lado oeste do oceano, enquanto as fêmeas se concentram na porção leste (Montealegre-Quijano & Vooren, 2010). Para o Oceano Atlântico Sul, Hazin *et al.* (1994a, b) e Mejuto & García-Cortés (2005) observaram que entre 0 e 23°S, predominou a captura de tubarões adultos ou quase adultos e, entre as latitudes 25°S e 40°S, juvenis e machos adultos foram mais abundantes.

A espécie *P. glauca* apresenta baixo valor econômico devido à musculatura fraca com forte odor de amônia (Walker, 1998). Entretanto, em substituição às capturas de peixes ósseos cujos estoques estão em declínio, o aumento no valor e demanda no mercado mundial de produtos como nadadeiras estimulam cada vez mais sua exploração (Bonfil, 1994).

Entre as espécies de tubarão comumente capturadas, *Prionace glauca* é considerada como o elasmobrânquio mais abundante, apresentando ampla distribuição geográfica, alta taxa de natalidade e crescimento mais rápido (Branstetter, 1990; Megalofonou *et al.*, 2005). Entretanto, Bonfil (1994) estimou que de 6,2 a 6,5 milhões de indivíduos desta espécie sejam capturados anualmente no mundo, o que poderia estar perto ou acima da capacidade máxima sustentável da espécie (Clarke *et al.*, 2006). No Oceano Atlântico, o declínio de *P. glauca* na pesca foi de 60% de 1986 a 2000 no hemisfério norte (Baum *et al.*, 2003) e na região sudeste do Brasil, houve um aumento considerável na captura entre 1972 e 1993, passando de duas toneladas para 1322 toneladas (Amorim *et al.*, 1998). No entanto, estes números crescentes

nos desembarques na região sudeste brasileira provavelmente não se referem a um crescimento populacional ou à capacidade de recuperação dos estoques e sim ao incremento nas artes da pesca e à participação de novas embarcações a partir das décadas de 70 e 80.

Diferentes estudos têm mostrado que, embora o tubarão azul seja a espécie mais explorada na pesca oceânica em nível mundial (Camhi *et al.*, 1998) com a captura dos indivíduos desde o primeiro ano de vida (Henderson *et al.*, 2001; Megalofonou *et al.*, 2009), análises demográficas não indicam efeitos de sobrepesca (Hazin & Lessa, 2005). Dois fatores, como a maturação precoce e a fecundidade poderiam estar contribuindo para isso. *P. glauca* apresenta alta fecundidade, que aumentaria a população em número, fazendo dessa espécie a mais abundante e produtiva entre os elasmobrânquios no Oceano Atlântico (Kohler *et al.*, 2002; Aires-da-Silva & Galucci, 2007). Concomitantemente, tem maturação sexual precoce, coincidindo com o recrutamento pesqueiro (Hazin & Lessa, 2005; Henderson *et al.*, 2001). Porém, por se tratar de uma espécie comumente descartada pela prática do *finning* e pelo fato da maioria dos dados relacionados à estatística pesqueira dependerem de animais desembarcados, os registros atuais poderiam não representar o estoque real de animais existentes e da pesca realizada (Hazin & Lessa, 2005). Com isso, os dados de mortalidade estimados talvez não representem valores corretos e sejam subestimados.

Em 2009, a Comissão Internacional para a Conservação dos Tunídeos do Atlântico - ICCAT - declarou que as taxas de mortalidade por pesca são inferiores às necessárias para alcançar o rendimento máximo sustentável

(ICCAT, 2009). A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) definiu o status da espécie, após a última avaliação global em 2005, como “Quase Ameaçada” (IUCN, 2011). No Brasil, a avaliação mais recente (2011), com base nos critérios da IUCN, corrobora a classificação global de *P. glauca* como “Quase Ameaçada” (ICMBio, 2011). Atualmente tais listagens exercem grande influência nas prioridades de preservação dos órgãos governamentais. Contudo, apenas Canadá, EUA, México e Austrália já possuem legislações específicas para a pesca do tubarão azul, com a delimitação de cotas por barcos, restrições de áreas de exploração da ZEE (Zona de Exploração Exclusiva) e proibição da retirada das nadadeiras para o comércio asiático (Holts *et al.*, 1998).

1.2. DNA mitocondrial, estrutura populacional e conservação

O conhecimento sobre a aplicação de marcadores de DNA evoluiu do seu estado experimental e está sendo atualmente incorporado aos programas de conservação de espécies, de forma prática e eficiente. Já há algum tempo, os padrões de DNA mitocondrial (DNAmt) vêm sendo reconhecidos como marcadores potencialmente importantes em estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris & Berg, 1987; Toledo Filho *et al.*, 1992), sendo capazes de distinguir populações geográficas com grande eficiência, pela identificação de haplótipos (Bermingham & Martin, 1998; Paternello *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

O DNAmt pode ser considerado como um haplótipo simples, sendo encontrado em todas as células animais (Attardi, 1995). Diferenças no número

e tamanho dos haplótipos podem ser usadas para estimar a quantidade de variação genética existente dentro e entre populações (Nei, 1987).

As observações de que os haplótipos de DNAm_t de populações de muitas espécies apresentam-se localizados geograficamente introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre estrutura de populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avise *et al.*, 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de DNAm_t e no grau de divergência de suas sequências, Avise (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.

Dentre os genes e demais segmentos do DNA mitocondrial, a região controle, também conhecida como D-loop, é responsável pelos processos de replicação e transcrição do DNA mitocondrial. Por não ser codificadora de proteínas, apresenta uma maior taxa de substituições de bases nucleotídicas, sendo sua taxa de evolução duas a cinco vezes maior que a dos outros genes codificadores de proteínas (Meyer, 1993). Tais características dão a este segmento genômico um grande destaque como ferramenta em estudos genéticos e evolutivos. No entanto, a variação genética em elasmobrânquios é baixa quando comparada aos peixes ósseos (Smith, 1986) e a taxa de mutação das suas sequências mitocondriais é de seis a oito vezes mais lenta que em mamíferos (Martin *et al.*, 1992; Martin & Palumbi, 1993). Ainda assim, o D-loop

tem sido muito utilizado para acessar a estrutura genética em elasmobrânquios, fornecendo dados expressivos.

Para o setor pesqueiro, a identificação e manutenção de estoques diferenciados apresentam-se como elementos fundamentais no conhecimento das populações, pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho & Hauser, 1994). Quando os componentes de uma população de peixes são segregados em vários estoques reprodutivos, a frequência dos alelos, identificada com auxílio de marcadores genéticos, sofre uma flutuação genética e a variação na frequência desses alelos reflete a magnitude do isolamento reprodutivo entre esses estoques. Assim, a diferença na frequência observada entre amostras geográficas pode ser usada para estimar indiretamente padrões de fluxo gênico e, portanto, a estrutura genética do estoque (Heist, 2005).

A conservação da variabilidade genética é um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo de extinção (Lacy & Lindenmayer, 1995). Essa questão é especificamente relevante no ambiente marinho, onde as barreiras físicas parecem ser menos perceptíveis e efetivas (Awise, 1994; Palumbi, 1994), sugerindo uma tendência aparente à homogeneização genética (Ward *et al.*, 1994; Levy & Cassano, 1994). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes pode estimular a sobre-exploração, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e até promover a eliminação de estoques locais (Smith *et al.*, 1990; Kuusipalo, 1999).

Mesmo considerando 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 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*, tendo observado uma forte descontinuidade populacional entre os oceanos. No entanto, o baixo número amostral obtido não possibilitou a determinação de estruturas populacionais intra-oceânicas. Um ponto importante levantado por estes mesmos autores foi a possibilidade de ocorrência de uma espécie críptica entre aquelas já descritas no gênero *Sphyrna* no Oceano Atlântico.

Em estudos realizados com o tubarão *Carcharhinus limbatus*, foi identificada uma forte estruturação nas populações do Atlântico Oeste (Golfo do México e Caribe) e populações do Atlântico Leste (África), oceanos Índico e Pacífico, com a existência de estoques reprodutivos distintos (Keeney & Heist, 2006). Ainda neste mesmo trabalho, também foi sugerida uma possível incerteza taxonômica entre *C. limbatus* e *C. tilstoni*. Do mesmo modo, utilizando uma amostragem global do tubarão *Galeorhinus galeus*, Chabot & Allen (2009) revelaram a existência de estrutura populacional quando comparados estoques entre oceanos. E em amostras globais do tubarão-baleia *Rhincodon typus*, não foram encontradas fortes restrições ao fluxo gênico entre os oceanos, sendo detectada apenas uma moderada diferenciação entre os estoques dos oceanos Atlântico e 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 porções leste e oeste do Oceano Atlântico e 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. Entre os tubarões de pequeno porte, *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii*, foi caracterizada uma forte estruturação entre populações do Atlântico Oeste, com uma diferenciação entre estoques dos hemisférios Norte e Sul. Esta diferenciação é modulada provavelmente pelas correntes marítimas Norte Equatorial e Corrente do Brasil (Mendonça *et al.*, 2011; Mendonça *et al.*, comunicação pessoal).

Para o tubarão azul não foi encontrada estruturação genética entre amostras da Austrália, Indonésia e porção central do Oceano Pacífico Norte, segundo Ovenden *et al.* (2009), que utilizaram marcadores moleculares dos tipos D-loop e microssatélites. Este seria, provavelmente, o único estudo de estrutura populacional em *P. glauca* utilizando marcadores moleculares até o momento.

A realização de estudos conjuntos em todo o Oceano Atlântico Sul sobre dinâmica populacional, variabilidade genética dos estoques e análise demográfica de *P. glauca* certamente dariam um embasamento mais sólido aos dados apresentados aos órgãos governamentais. As informações geradas,

além de gerar dados para a identificação dos estoques, a criação e estabelecimento de áreas protegidas e de defeso sazonal, também poderiam contribuir para melhor fiscalização do desembarque de nadadeiras desacompanhadas das respectivas carcaças, bem como para o controle das licenças de pesca e a implementação de medidas de proteção como tamanho mínimo nas capturas, completa utilização do animal capturado e minimização dos descartes para as espécies em perigo de extinção.

1.3. Objetivos

No presente trabalho, o principal objetivo foi abordar questões acerca da dinâmica das populações da espécie *Prionace glauca* em exemplares capturados pelas frotas pesqueiras ao longo da costa brasileira, utilizando sequências nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial (D-loop). Tais resultados deverão servir para um melhor entendimento da estrutura populacional da espécie no Atlântico Sul Ocidental, a determinação dos níveis de variabilidade genética, sua relação com a pesca sustentável e possível sugestão de áreas prioritárias a serem estabelecidas em programas de manejo.

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

- identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA que formam os estoques da espécie *P. glauca* no Oceano Atlântico Sul Ocidental, com o uso de marcador molecular mitocondrial (D-loop);
- verificar se os diferentes cardumes de *Prionace glauca* constituem uma única população ou se existe estruturação genética;

- gerar informações que possam subsidiar programas de manejo adequados e exploração sustentável dos estoques pesqueiros de espécies do gênero *Prionace* na costa brasileira.

Material e Métodos

2. Material e métodos

2.1. Coleta das amostras

Foram obtidas 97 amostras de *Prionace glauca* nos locais de desembarque de frotas industriais e a bordo de pesqueiros que capturam tubarões e raias ao longo da costa brasileira. Essas amostras são provenientes do Rio Grande do Sul (n=38, entre 27°15'S e 30°20'S), São Paulo (n=31, entre 24°40'S e 26°57'S) e Rio Grande do Norte (n=28, entre 2°38'S e 4°52'S) (Figura 1).



Figura 1 - Localização dos pontos de coleta no oeste do Oceano Atlântico Sul. As marcações em vermelho representam coletas do Rio Grande do Sul (RS); marcações

em amarelo são de São Paulo (SP) e em verde são referentes ao Rio Grande do Norte (RN).

Ainda em campo, foram feitas a identificação morfológica e registro fotográfico dos exemplares amostrados. Em seguida, foram extraídas amostras de tecidos na forma de fragmentos de nadadeiras e tecido muscular. Esses tecidos foram conservados em etanol a 95% e integrados à coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, campus de Botucatu, credenciado no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositário de Amostras do Patrimônio Genético.

2.2. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi extraído de células de nadadeiras e tecido muscular, usando o método de extração salina descrito por Aljanabi & Martinez (1997). As reações de amplificação da região controle foram realizadas utilizando 25µl de solução contendo 0,5 mM dos primers D-loop F 5'-CTC CCA CCA AGA AAG TTC TG-3 e D-loop R 5'-GGC CGC TTA TGT AGG CTT CTT GG-3' descritos por Mendonça *et al.* (2009); 0,8 mM de dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; tampão da enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e 50 mM KCl); e uma unidade da enzima Taq polimerase (Invitrogen).

Cada ciclo de amplificação por PCR foi realizado pela desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 45 segundos e extensão a extensão a 72°C por 45 segundos, com 35 repetições, seguida com 35 repetições e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os segmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese a 155V por 40 minutos em gel de

agarose a 1% e visualizados em luz ultravioleta. Em seguida os produtos da PCR foram marcados com o BigDye versão Terminator Cycle Sequencing Kit 3,1 (Applied Biosystems, Inc.) e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. A reação de sequenciamento em termociclador foi realizada com desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 15 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos.

2.3. Análise da estrutura populacional

O alinhamento das sequências nucleotídicas foi conduzido no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) com ClustalW Macvector-65 (Thompson *et al.*, 1994). A diversidade haplotípica e nucleotídica, o número de sítios polimórficos e o número de haplótipos foram calculados usando o programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). A análise da estrutura genética das populações foi realizada com o programa AMOVA (Analysis of Molecular Variance), para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do DNAm_t através do programa ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), que utiliza a estatística *F* de Wright's (1965).

A significância da estatística F_{ST} é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.* 1992), com 1000 permutações. Esta estimativa leva em consideração a frequência de distribuição dos haplótipos e o número de diferenças de sítios de restrição entre eles, onde os valores de divergências são incorporados a uma análise de variância para estimar o grau de subdivisão genética intraespecífica (Excoffier *et al.*, 1992). A rede de haplótipos foi

construída a partir do programa Network 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999). O teste de Mantel foi realizado pelo programa Genepop on the web (Raymond & Rousset, 1995).

Resultados

3. Resultados

3.1. Caracterização e variabilidade das sequências gênicas

A região controle do DNA mitocondrial de 97 indivíduos da espécie de tubarão *P. glauca* foi sequenciada e apresentou 1026 pares de bases analisáveis, com 16 sítios polimórficos (Tabela 1). A composição nucleotídica consistiu de 15,58% de guanina; 21,13% de adenina; 27,78% de timina; e 35,51% de citosina, sendo detectados 29 polimorfismos (51,72% de transição, 48,28% de transversão), resultando em 32 haplótipos, conforme mostra a Tabela 1.

A Tabela 2 mostra que os dois haplótipos mais comuns, H1 e H16, que juntos representam 44,33% das amostras analisadas, ocorreram em todas as regiões amostradas, mas ambos são observados somente em três amostras do Rio Grande do Sul. O haplótipo H1 foi encontrado em cinco amostras de São Paulo e em 13 amostras do Rio Grande do Norte, enquanto o haplótipo H16 predominou entre as amostras de São Paulo, representando 13 indivíduos e esteve presente em apenas seis amostras do Rio Grande do Norte. O haplótipo quatro foi o terceiro em abundância com nove representantes no Rio Grande do Sul e dois representantes em São Paulo. No Rio Grande do Norte, esse haplótipo foi ausente.

Tabela 1 - Posição dos nucleotídeos polimórficos para os 32 haplótipos identificados nas amostras do tubarão azul, *Prionace glauca*. Os haplótipos (H) estão listados na coluna da esquerda e os números em negrito correspondem aos sítios polimórficos.

H	111	159	195	204	211	241	269	281	542	608	697	765	782	808	928	992
1	C	G	T	G	C	T	T	T	T	A	A	C	C	C	C	A
2	G	A	C	T	.	T
3	G	A	A	C
4	T	.	.	.
5	G	C
6	G	A
7	G	C	T	T	.	.
8	G	A	C	T	.	.	T
9	A	C	T
10	G	A	C	T	.	.
11	T	.	.	T
12	.	.	C	T	.	.	T
13	G	C	T
14	G	.	.	.	T	.	A	C
15	G	C	T	.	.
16	G	A	C
17	G	A	C	T	.	.	.
18	.	.	C	A	T	.	A	T
19	.	.	C	T	T	.	.
20	G	C	T	.	.	.
21	G	A	C	T	T	.	.
22	.	.	.	A	T	.	.	.
23	T	.	.
24	A	C	.	T	.	.	.	T	.	T
25	G	A	C	.	.	T
26	G	T	.	.	.
27	G
28	G	C	.	C
29	A	C
30	G	A	C	A
31	T	T	.	.	.
32	G	C	T	.	.	T

Tabela 2 - Distribuição geográfica dos haplótipos (H) do D-loop para cada região amostrada nas amostras do tubarão azul, *Prionace glauca*.

	Haplótipos																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
RS	3	1	1	9	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP	5	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13	1	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	
RN	13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	1	1	1	
Total	21	1	2	11	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	3	22	3	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	4	1	1	1	

A rede de haplótipos apresentada na Figura 2 ilustra a distribuição geográfica dos haplótipos, denotando o fluxo gênico entre as regiões amostradas. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras correspondentes a cada haplótipo.

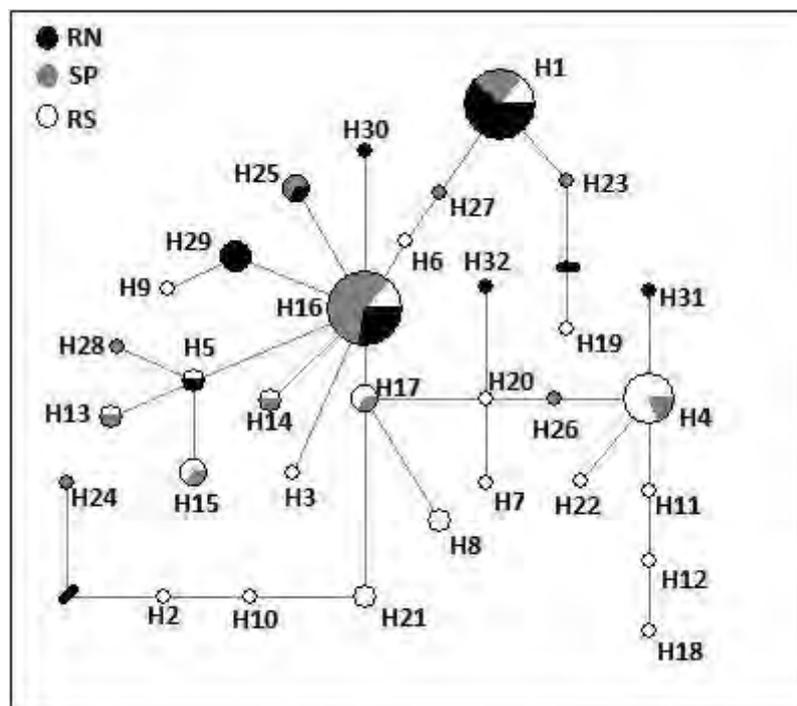


Figura 2. Rede de haplótipos do tubarão azul, *Prionace glauca* formada com as amostras do Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio Grande do Norte. Os traços presentes entre os haplótipos H2 e H24 e entre H19 e H23 identificam a presença de duas mutações nessas posições. Entre os demais haplótipos ocorreu apenas uma mutação.

3.2. Estrutura populacional

Os valores de diversidade haplotípica e de diversidade nucleotídica entre todos os indivíduos analisados foram de $Hd = 0,89 \pm 0,020$ e $\pi = 0,00258 \pm 0,00013$, respectivamente. O tamanho da amostra, o número total de haplótipos para cada região e os valores da diversidade haplotípica e nucleotídica entre os grupos amostrais estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Número total de indivíduos analisados, (n), número de haplótipos obtidos, diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) nas amostras de tubarão azul, *Prionace glauca*.

Região	n	Nº de haplótipos	h	π
RS	38	22	$0,935 \pm 0,029$	$0,00303 \pm 0,00021$
SP	28	13	$0,806 \pm 0,065$	$0,00218 \pm 0,00026$
RN	31	8	$0,738 \pm 0,068$	$0,00188 \pm 0,00022$
Total	97	32	$0,889 \pm 0,020$	$0,00258 \pm 0,00013$

Os maiores valores obtidos para diversidade haplotípica e nucleotídica foram encontrados na amostra do Rio Grande do Sul e as menores para o Rio Grande do Norte. Quando as amostras foram analisadas aos pares entre regiões, foram observadas algumas divergências. Ao comparar as 69 amostras do Rio Grande do Sul e de São Paulo, foram encontrados 14 sítios polimórficos, sete mutações compartilhadas, divergência nucleotídica (K) de 0,00287 e diversidade haplotípica e nucleotídica de 0,935 e 0,00278,

respectivamente. Quando foram comparadas 66 amostras conjuntas do Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte, foram identificados 14 sítios polimórficos, cinco mutações compartilhadas, valor de $K = 0,00275$ e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica de 0,935 e 0,00269, respectivamente. Enfim, nas comparações de 59 sequências obtidas das amostras de São Paulo e Rio Grande do Norte, foram encontrados 12 sítios polimórficos, seis mutações combinadas, valores de $K = 0,00215$ e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica de 0,738 e 0,00210, respectivamente.

Na aplicação do teste AMOVA foi encontrado um valor de $F_{ST} = 0,080$ ($\alpha = 0,05$; $P = 0,00098$) quando as amostras do Rio Grande do Sul e São Paulo foram consideradas como um único grupo e as amostras do Rio Grande do Norte como um grupo distinto. Agrupando-se as amostras de São Paulo com Rio Grande do Norte e isolando as amostras do Rio Grande do Sul, o valor de F_{ST} encontrado foi de 0,103 ($\alpha = 0,05$; $P = 0,000$). Nas comparações aos pares, os valores de F_{ST} foram de 0,089 entre Rio Grande do Sul e São Paulo; $F_{ST} = 0,102$ entre Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte; e $F_{ST} = 0,058$ entre São Paulo e Rio Grande do Norte. Os resultados denotam uma moderada estruturação genética em todas as comparações entre pares de regiões e entre as três regiões quando analisadas concomitantemente.

Na avaliação da hipótese de isolamento por distância, calculado pelo teste de Mantel, foi observado um valor não significativo de $R^2 = 0,0263$, com $P = 0,49$, demonstrando não haver correlação entre o distanciamento geográfico e os valores de divergência genética encontrados na área de estudo (Figura 3).

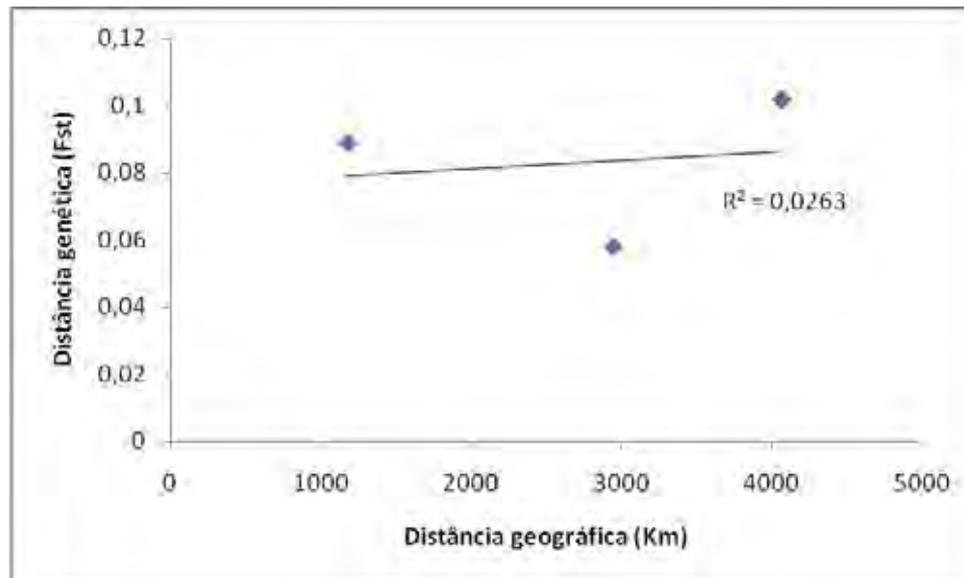


Figura 3 - Gráfico da correlação entre as distâncias genética e geográfica para as três regiões amostradas do tubarão azul, *Prionace glauca*, calculada pelo teste de Mantel.

Discussão

4. Discussão

4.1. Estrutura populacional e distribuição do tubarão azul *Prionace glauca*

A variação genética do D-loop em elasmobrânquios é menor do que em peixes ósseos (Smith, 1986). No entanto, a taxa de evolução desse gene é duas a cinco vezes maior do que a dos outros genes codificadores de proteínas (Meyer, 1993). Portanto, o uso de um marcador molecular que geralmente apresenta taxa expressiva de mutação, embora um pouco mais baixa em elasmobrânquios, pode contribuir para obtenção de dados expressivos neste grupo de organismos.

Meyer (1993) afirma que as extremidades do D-loop são regiões variáveis e ricas em AT, enquanto que regiões mais conservadas são encontradas na porção central da fita. Estas características foram observadas nas sequências analisadas neste estudo, como mostra a Tabela 1 onde, na região D-loop das amostras do tubarão azul, que apresentou 1026 pares de bases analisáveis, não foram encontradas mutações nucleotídicas entre os sítios 282 e 541.

De acordo com Hoelzel *et al.* (2006), os valores da diversidade haplotípica e nucleotídica em elasmobrânquios, de modo geral, apresentam-se baixos quando comparados aos dos peixes ósseos, nos quais chegam a atingir uma ordem de magnitude aproximadamente dez vezes maior. Os dados de diversidade encontrados no presente trabalho condizem com aqueles relatados para *Prionace glauca* por Ovenden *et al.* (2009), para *Galeorhinus galeus* por Chabot & Allen (2009), para *Cetorhinus maximus* por Hoelzel *et al.* (2006), para

Carcharhinus limbatus por Keeney *et al.* (2005) e para *Rhizoprionodon porosus* por Mendonça *et al.* (2011).

De acordo com Wright (1965), os valores de F_{ST} entre zero e 0,05 configuram baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15, moderada estruturação; entre 0,15 e 0,25, alta estruturação; e acima de 0,25, uma forte estruturação. No presente estudo, o teste AMOVA revelou valores de F_{ST} compatíveis com uma estruturação populacional moderada para o tubarão-azul nas as três regiões amostradas e entre os pares de regiões. Embora haja estruturação, ela não se apresentou suficientemente grande para definir populações diferentes e nem suficientemente pequena para que pudesse ser assumido um manejo pesqueiro único para todas as regiões. Ou seja, os grupos amostrados apresentam haplótipos compartilhados entre si e haplótipos únicos para cada região, conferindo-lhes particularidades que devem ser preservadas. Os valores encontrados de F_{ST} também indicam que há mais similaridade e, conseqüentemente, a possibilidade mais fluxo gênico entre os indivíduos de São Paulo e do Rio Grande do Norte ($F_{ST} = 0,058$) do que entre os indivíduos de São Paulo e do Rio Grande do Sul ($F_{ST} = 0,089$) e do que Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte ($F_{ST} = 0,102$). Como essa espécie é altamente migratória (Aires-da-Silva *et al.*, 2005) e apresenta grande capacidade de dispersão (Kohler *et al.*, 2002; Ovenden *et al.*, 2009), as barreiras marinhas presentes no Oceano Atlântico Ocidental parecem não ser eficientes para impedir totalmente o fluxo gênico desta espécie na região.

Os resultados de estruturação genética podem se tornar mais robustos e informativos quando se usa mais de um tipo de marcador molecular (Hoarau *et al.*, 2004). Ussami (2011) apresentaram uma análise populacional de *P. glauca*

utilizando amostras das mesmas regiões do presente trabalho com marcadores microsatélites. Neste estudo também foram encontrados índices compatíveis com uma moderada estruturação populacional entre Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio Grande do Norte ($F_{ST} = 0,055$). Com base nos dados de microsatélites, nas comparações feitas entre pares não foram observadas diferenças significativas para valores de estruturação entre as amostras de *P. glauca* de São Paulo/Rio Grande do Sul ($F_{ST} = 0,044$) e São Paulo/Rio Grande do Norte ($F_{ST} = 0,05175$).

De acordo com Karl *et al.* (2010), pode-se considerar 5 principais causas para as diferenças nas taxas de diversidade haplotípica e nucleotídica entre locos microsatélites e sequências de DNAm: (1) modos diferentes de herança; (2) recentes pressões seletivas no genoma mitocondrial ou seleção de equilíbrio no DNA nuclear; (3) mudanças de tamanho da população; (4) problemas de amostragem e (5) comportamento sexual com possível fidelidade das fêmeas às áreas de berçário. Teoricamente, pode-se assumir que a variação genética em locos nucleares deva ser maior do que as encontradas no DNAm por este apresentar herança uniparental (exclusivamente materna em vertebrados). No entanto, *a priori*, não se deve assumir que os níveis de variação genética apresentem discrepâncias marcantes entre os locos nucleares e os mitocondriais em populações naturais e, para a maioria dos tubarões já estudados, observa-se um nível intermediário de variação (Karl *et al.*, 2010). No presente estudo os níveis de diversidade genética encontrados corroboram os resultados de Ussami (2011) e, embora haja pequenas discrepâncias nos valores de F_{ST} entre os pares de grupos amostrais, tais

diferenças não interferem na categorização de populações moderadamente estruturadas.

Segundo Mendonça *et al.* (2011), que analisaram a estrutura populacional de *Rhizoprionodon porosus* na costa brasileira e sul do Caribe utilizando como marcador molecular a sequência D-loop, foi constatado que a divergência genética aumenta de forma diretamente proporcional ao aumento da distância geográfica. No entanto, a espécie estudada por Mendonça *et al.* possui hábitos exclusivamente costeiros, diferentemente de *P. glauca*, que é oceânico e mostrou mais semelhanças genéticas entre regiões distantes (SP e RN) do que entre regiões próximas (SP e RS). Assim, para o tubarão azul, não foi evidenciada diferenciação genética modulada pelo distanciamento geográfico na costa brasileira conforme corroborado também pelo teste de Mantel.

A rede de haplótipos organizada permite inferir que há fluxo gênico entre as três regiões amostradas (Figura 1), uma vez que a maioria dos haplótipos aparece em todas elas. O grupo amostral do Rio Grande do Sul aparece com o maior número de haplótipos particulares (Figura 1 e Tabela 3), conferindo-lhe maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, quando comparado com aqueles de São Paulo e Rio Grande do Norte. No entanto, os dois haplótipos mais comuns estiveram presentes em maior número em São Paulo e no Rio Grande do Norte, o que pode ter contribuído para a proximidade genética entre as amostras destas duas regiões, embora São Paulo e Rio Grande do Sul sejam mais próximas geograficamente. Tal constatação parece encontrar similaridade com os resultados relatados por Ovenden *et al.* (2009), que constataram não haver diferenciação genética entre amostras de *P. glauca*

da Austrália, Indonésia e Pacífico Norte. No entanto, se alguma ressalva pode ser feita deve-se ao fato de que estes autores analisaram um segmento de apenas 373 pares de bases e 60 espécimes, resultando em 15 haplótipos e 12 sítios polimórficos.

Estudo feito por Pardini *et al.* (2001) em tubarão branco, *Carcharodon carcharias*, com exemplares capturados na África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, utilizando o marcador genético D-loop, mostrou que entre as amostras da Nova Zelândia e da Austrália não houve diferenciação genética, enquanto que entre Nova Zelândia e África do Sul e entre Austrália e África do Sul, os valores de F_{ST} foram de 0,89 e 0,81, respectivamente. Como neste mesmo estudo, a análise de marcadores microssatélites não indicou diferenciação genética entre essas três regiões, foi levantada a hipótese de que os machos poderiam fazer deslocamentos migratórios maiores que os das fêmeas, homogeneizando, assim, a frequência dos alelos nucleares. Este trabalho mostra que marcadores diferentes podem oferecer resultados distintos para as mesmas amostras, dependendo do tipo de herança do DNA analisado e também de fatores como o padrão de migração de machos e fêmeas da espécie. No presente estudo não foram abordados aspectos de segregação diferencial entre machos e fêmeas devido à falta da identificação sexual dos espécimes amostrados.

Em relação às espécies que fazem migrações transoceânicas como o tubarão azul, Hoelzel *et al.* (2006) e Schmidt *et al.* (2009) estudaram a estrutura populacional do tubarão gigante, *Cetorhinus maximus* e do tubarão baleia, *Rhincodon typus* utilizando como marcadores genéticos a região controle do DNA mitocondrial e microssatélites. Os resultados obtidos não revelaram a

existência estruturação genética entre as populações dos diferentes oceanos para ambas as espécies.

O padrão de deslocamento do tubarão azul *P. glauca* no Oceano Atlântico Sul Ocidental ainda não se apresenta completamente delimitado, mas conjectura-se que ocorra em concordância com o sistema de correntes marítimas identificadas como Giro Subtropical do Atlântico Sul (Hazin *et al.*, 2000). Associada a esse sistema está a Corrente do Brasil, que flui ao longo da costa brasileira em sentido anti-horário entre 10°S e 35°S de latitude (Cirano *et al.*, 2006). Estes mesmos autores citam que essa corrente é composta por duas massas de água conhecidas como Água Tropical (AT) e Água Central do Atlântico Sul (ACAS). Essa última é mais profunda (entre 116 e 657 m) que a primeira devido à sua menor temperatura (entre 6°C e 20°C). Na latitude de 25°S no Oceano Atlântico Ocidental, ela se divide em duas partes, uma delas fluindo para o sul, bordejando a plataforma continental e a outra indo em direção ao Equador (Cirano *et al.*, 2006).

O tubarão azul é comumente encontrado em águas mais frias, até 600m de profundidade (Compagno, 1984; Carey & Scharold, 1990). Como as amostras analisadas no presente trabalho foram coletadas em latitudes abrangidas pela Corrente do Brasil, supõe-se que essa espécie ocorra principalmente na ACAS, concordando com a afirmação de Legat & Vooren (2008). Além disso, a latitude onde a ACAS se divide em dois fluxos está próxima ao ponto de coleta das amostras de SP. Considerando tais informações, conjectura-se que o grupo ao qual pertencem os espécimes de *P. glauca* capturados no Rio Grande do Sul esteja na ACAS que segue em direção ao Sul e que o grupo dos espécimes capturados em São Paulo siga, na

sua maioria, mas não completamente, para o Nordeste, ocasionando maior fluxo gênico entre São Paulo e Rio Grande do Norte.

Ao analisarem fêmeas de *P. glauca* com embriões em vários estágios de reprodução entre as latitudes 27°S e 34°S, Legat & Vooren (2004) sugerem a existência de duas populações no lado oeste do Oceano Atlântico, uma localizada entre 5°N e 7°S e outra entre 20°S e 35°S. Ou seja, estes autores consideram a população do Rio Grande do Norte disjunta da população de São Paulo, o que não é confirmado pelos resultados obtidos com a análise genética das amostras realizada no presente trabalho. Por outro lado, a hipótese de que haja apenas uma população para o Oceano Atlântico Sul, é apoiada por Hazin & Lessa (2005), com dados obtidos a partir de captura de pesca. Segundo estes autores, a cópula ocorreria no Atlântico Sudoeste durante o período de dezembro a fevereiro, seguida da ovulação e fertilização no Atlântico Noroeste de abril a junho, sendo que o início da gestação se daria na região do Golfo da Guiné, na África, nos meses de junho a agosto.

Embora concordem com os locais de cópula, ovulação e fertilização, Montealegre-Quijano & Vooren (2010) sugerem que o nascimento dos filhotes ocorreria na primavera, na Convergência Subtropical do Atlântico Sudoeste, entre as latitudes 30°S e 46°S. Quanto à caracterização de populações distintas de *P. glauca* na costa brasileira, pode-se dizer que os resultados do presente estudo confirmam a existência de um único estoque genético para fins de pesca, concordando com a proposição formulada por Hazin & Lessa (2005).

Com relação à distribuição no hemisfério Norte do Oceano Atlântico, Kohler *et al.* (2002) afirmam haver apenas uma população de tubarão azul com ciclo anual de reprodução, a partir de dados de marcação e recaptura. Os

jovens realizariam processo de segregação de acordo com a longitude, sendo que os machos ficariam no Atlântico Noroeste e as fêmeas se concentrariam no Atlântico Nordeste (Queiroz *et al.*, 2005). Dados indicam que no Pacífico Norte, machos e fêmeas segregam-se pela latitude e longitude, com os machos presentes mais ao sul e as fêmeas mais ao norte e a leste (Nakano, 1994; McKinnel & Seki, 1998).

O presente trabalho obteve os primeiros dados de estruturação genética de tubarão azul com marcadores D-loop na parte oeste do Oceano Atlântico Sul. No entanto, embora este estudo tenha revelado uma moderada estruturação populacional, novas amostragens com maior abrangência geográfica são necessárias, identificando a distribuição da espécie em outras regiões. Assim, o levantamento amostral e análise de exemplares de outras localidades no Brasil, Uruguai, Argentina, Caribe, EUA e no Atlântico Leste devem ser realizados, a fim de possibilitar o esclarecimento de divergências e lacunas sobre a estruturação genética populacional de *P. glauca* no Oceano Atlântico, assim como sua caracterização filogeográfica.

4.2. Conservação

Dentre os elasmobrânquios, o tubarão azul é a espécie oceânica mais abundante no Oceano Atlântico (Kohler *et al.*, 2002) e sua captura se inicia a partir de indivíduos jovens, logo no primeiro ano de vida (Henderson *et al.*, 2001). Considerado o predador de topo de cadeia alimentar mais abundante e mais amplamente distribuído em regiões pelágicas (Mejuto & García-Cortés,

2005), *P. glauca* se apresenta como uma espécie chave para a manutenção do equilíbrio trófico em águas tropicais e temperadas.

Os níveis de estruturação genética identificados nesse trabalho, associados aos dados referentes à exploração pela pesca do tubarão azul, apontam para a necessidade de programas de conservação da espécie no Brasil e no Oceano Atlântico. Embora não se tenha encontrado valores determinantes para identificar a existência de estruturação populacional que caracterize estoques pesqueiros distintos para a espécie na costa brasileira, os grupos amostrais estudados apresentaram características populacionais que são compartilhadas restritamente, via fluxo gênico. Assim, a extinção de haplótipos raros poderia levar à redução da variabilidade genética e do potencial evolutivo da espécie, já que o fluxo gênico, neste caso limitado, é possivelmente insuficiente para repor perdas locais. Como o interesse por essa espécie vem aumentando no comércio mundial, limitar e controlar sua exploração pesqueira parecem desafios a serem superados.

Conclusões

5. Conclusões

A diversidade genética encontrada nas populações do tubarão-azul, *Prionace glauca*, que se encontram distribuídas nas proximidades da plataforma continental brasileira, apresenta índices relativamente altos e compatíveis com outras espécies de tubarões pelágicos com distribuição global.

P. glauca apresenta frequências haplotípicas distintas entre as localidades amostradas, denotando algumas diferenças entre suas populações. No entanto, a estruturação genética populacional identificada mostrou-se apenas moderada e, possivelmente, com poucas restrições ao fluxo gênico.

A diferenciação genética encontrada entre os grupos amostrais mostrou não estar relacionada à distância geográfica. As correntes marítimas do Oceano Atlântico que atuam fortemente nesta região do Brasil seriam, provavelmente, os componentes ambientais mais importantes na modulação do fluxo gênico nestas populações.

A partir dos resultados obtidos sobre a estruturação populacional do tubarão azul nas localidades amostradas, Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio Grande do Norte, com o uso de marcador molecular do DNA mitocondrial, pode-se assumir que os cardumes desta espécie compõem um estoque único ao longo da Zona de Exploração Econômica brasileira. Contudo, a existência de haplótipos locais ressalta a necessidade da formulação de programas de manejo que viabilizem a manutenção da variabilidade genética da espécie.

Referências

6. Referências

Aires-da-Silva A, Taylor I, Punt AE, Gallucci VF, Kohler NE, Turner PA, Briggs R, Hoey JJ (2005) A framework for estimating movement and fishing mortality rates of the blue shark, *Prionace glauca*, in the North Atlantic from tag recapture data. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 58: 1073 – 1086.

Aires-da-Silva AR, Gallucci V F (2007) Demographic and risk analyses applied to management and conservation of the blue shark (*Prionace glauca*) in the North Atlantic Ocean. *Mar. Freshw. Res.*, 58: 570 – 580.

Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Ac. Res.*, 25: 4692-4693.

Amorim AF, Arfelli CA, Fagundes L (1998) Pelagic elasmobranch caught by longliners off southern Brazil during 1974-1997: an overview. *Mar. Freshw. Res.*, 49: 621-632.

Attardi G (1995) Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Intern. Rev. Citol.*, 93: 93-143.

Avise JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.

Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press.

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. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16:37-48. Disponível em: www.fluxus-engineering.com

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.

Bermingham E, Martin AP (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.*, 7: 499–517.

Bonfil R (1994) Overview of world elasmobranch fisheries. *FAO Fish. Tech. Pap.* Rome. 341.

Branstetter S (1990) Early life-history implications of selected carcharhinoid and lamnoid sharks of the northwest Atlantic. *In*: Pratt Jr. HL, Gruber SH, Taniuchi T

(editores). Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics and the Status of the Fisheries. *NOAA Tech. Rep.*, 17–28 NMFS 90.

Camhi M, Fowler S, Musick J, Brautigam A, Fordham S (1998) Sharks and their relatives - Ecology and conservation. IUCN/SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 4.

Carey FG, Scharold JV (1990) Movements of blue shark (*Prionace glauca*) in depth and course. *Mar. Biol.*, 106: 329 – 342.

Carvalho GR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 326-350.

Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG (2007) Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Mol. Ecol.*, 16, 5183–5192.

Chabot CL, Allen LG (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Mol. Ecol.*, 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*. *Endang. Spec. Res.* doi: 10.3354/esr00241.

Cirano M, Mata MM, Campos EJD, Deiró, NFR (2006) A circulação oceânica de larga escala na região oeste do Atlântico Sul com base no modelo de circulação Global OCCAM. *Rev. Bras. Geofís.*, 24: 209 – 230.

Clarke SC, McAllister MK, Milner-Gulland EJ, Kirkwood GP, Michielsens CGJ, Agnew DJ, Pikitch EK, Nakano H, Shivji MS (2006) Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. *Ecol. Lett.*, 9: 1115–1126.

Compagno LJV (1984) Sharks of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes. *FAO Fish. Synop.*, 4: 251-655.

Duncan KM, Martin APB, Bowen W, De Couet HG (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Mol. Ecol.*, 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. *Genet.*, 131, 479-491

Excoffier LG, Laval A, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Onl.*, 1:47-50.

Ferris SD, Berg WJ (1987) The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. *In*: Ryman N & Utter F (editores.) Population Genetics and Fisheries Management. Seattle: University of Washington Press, 277-301.

Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. [Tese]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista.

Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Ac. Symp. Ser.*, 41:95-98.

Hazin FHV, Boeckman CE, Leal EC, Lessa R, Kihara K, Otsuka, K (1994a) Distribution and relative abundance of the blue shark, *Prionace glauca*, in the southwestern equatorial Atlantic Ocean. *Fish. Bull.*, 92: 474 – 480.

Hazin FHV, Kihara K, Otsuka K, BOeckman CE, Leal EC (1994b) Reproduction of the blue shark, *Prionace glauca*, in the southwest equatorial Atlantic Ocean. *Fish. Sci.*, 60: 487 – 491.

Hazin FHV, Lessa R (2005) Synopsis of biological information available on blue shark, *Prionace glauca*, from the southwestern Atlantic Ocean. *Col.Vol.Sci.Pap. ICCAT*, 58: 1178 – 1187.

Hazin FHV, Pinheiro PB, Broadhurst MK (2000) Further notes on the reproduction of the blue shark and a postulated migratory pattern in the South Atlantic Ocean. *Cienc. Cult.*, 52: 114 – 120.

Heist EJ (2005) Population and Reproductive Genetics in Chondrichthyes. *In*: Hamlet WC (ed.) Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Skates, Stingrays, and Chimaeras. Science publishers Inc. Plymouth, UK, 27-44.

Henderson AC, Flannery K, Dunne J (2001) Observations on the biology and ecology of the blue shark in the North-east Atlantic. *J. Fish Biol.*, 58: 1347 – 1358.

Hoarau G, Piquet AMT, van der Veer HW, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2004) Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: a comparison resolving power between microsatellites and mitochondrial DNA data. *J. Sea Res.*, 51: 183 – 190.

Hoelzel AR, Shivji, MS, Magnussen J, Francis MP (2006) Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biol. Lett.* doi:10.1098/rsbl.2006.0513.

Holts DB, Julian A, Sosa-Nishizaki O, Bartoo NW (1998) Pelagic shark fisheries along the west coast of the United States and Baja California, Mexico. *Fish. Res.*, 39: 115 - 125.

ICCAT (2009) Report of the 2008 shark stock assessment meeting. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 64: 1343-1491.

ICMBio (2011) Primeira Oficina para Avaliação do Estado da Conservação de Chondrichthyes do Brasil. Brasília. In press.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. [internet]. [acesso em 10 jun 2011]. Disponível em www.iucnredlist.org.

Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH (2010) Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conserv. Genet.* doi 10.1007/s10592-010-0145-1.

Keeney 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. *Mol. Ecol.*, 1: 265-294.

Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries Northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Mol. Ecol.*, 14: 1911 – 1923.

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. *Col.Vol.Sci.Pap. ICCAT*, 54: 1231 – 1260.

Kuusipalo L (1999) Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiology*, 407: 141-148.

Lacy RC, Lindenmayer DB (1995) A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum *Trichosurus caninus ogilby* (Phalangeridae: Marsupialia) in south eastern Australia. Demographic stability and population persistence. *Biol. Conserv.*, 73: 119-129.

Legat JFA, Vooren CM (2004) Reproductive cycle and migration of the blue shark (*Prionace glauca*) in the South Atlantic Ocean. *In: Proceedings of the Symposium on Fish Communities and Fisheries*, p. 25–36. Disponível em <http://www.fishbiologycongress.org>.

Legat JFA, Vooren CM (2008) Distribuição e abundância relativa do tubarão azul, *Prionace glauca*, no sul do Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 34: 425 – 432. São Paulo.

Levy JA, Cassano VPF (1994) Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comp. Biochem. Phys.*, 107 B: 515-517.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software of comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451 – 1452.

Martin AP, Naylor GJP, Palumbi SR (1992) Rate of mitochondrial evolution is slow in sharks compared to mammals. *Nature*, 357: 153 – 155.

Martin AP, Palumbi SR (1993) Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 873-891.

McKinnell S, Seki MP (1998) Shark bycatch in the Japanese high seas squid driftnet fishery in the North Pacific Ocean. *Fish. Res.*, 39: 127-138.

Megalofonou P, Damalas D, De Metrio G (2009) Biological characteristics of blue shark, *Prionace glauca*, in the Mediterranean Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 89: 1233 – 1242.

Mejuto J, García-Cortés B (2005) Reproductive and distribution parameters of the blue shark, *Prionace glauca*, on the basis of on-board observations at sea in the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 58: 951-973.

Mendonça FF, Hashimoto DT, De-Franco B, Porto-Foresti F, Gadig OBF, Oliveira C, Foresti F (2009) Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. *Conserv. Genet. Resour.*, 2: 31 – 35.

Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2011) Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Ver. Fish. Biol. Fisher.* DOI 10.1007/s11160-011-9210-1.

Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL, Moura RL (2003) Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 197 p.

Meyer A (1993) Evolution of Mitochondrial DNA in fishes. *In: Hochachka & Mommsen (editores.) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2: 1-38.

Montealegre-Quijano S, Vooren CM (2010) Distribution and abundance of the life stages of the blue shark, *Prionace glauca*, in the Southwest Atlantic. *Fish. Res.*, 101: 168-179.

Nakano H (1994) Age, reproduction and migration of the blue shark in the North Pacific Ocean. *Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish.*, 31: 141 – 255.

Nakano H, Seki MP (2003) Synopsis of biological data on the blue shark, *Prionace glauca*. *Bull. Fish. Res. Ag.*, 6, 18–55.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia.

Ovenden JR, Kashiwagi T, Broderick D, Giles J, Salini J (2009) The extend of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *BMC Evolut. Biol.*, 9: 40. DOI:10.1186/1471-2148-9-40.

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. System.*, 25: 547-572.

Pardini AT, Jones CS, Noble LR, Kreiser B, Malcolm H, Buce BD, Stevens JD, Cliff G, Scholl MC, Francis M, Duffy CAJ, Martin AP (2001) Sex biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412: 139 – 140.

Paternello T, Marcato S, Zane L, Varotto V, Bargelloni L (2003) Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. *Mol. Phylog. Evol.* 28: 420-429.

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. *Mol. Phylog. Evol.*, 31: 192-203.

Queiroz N, Lima FP, Maia A, Ribeiro PA, Correia JP, Santos AM (2005) Movement of blue shark, *Prionace glauca*, in the North-east Atlantic based on mark-recapture data. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 85: 1107 – 1112.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Her.*, 86:248-249

Schmidt JV, Schmidt CL, Ozer F, Ernst RE, Feldheim KA, Ashley MV, Levine M (2009) Low genetic differentiation across the three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus*. *Plos One*, 4: 1 – 9.

Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW (2008) Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Mol. Ecol.* 17: 5336-5348.

Smith PJ (1986) Low genetic variation in sharks. *Copeia*, 1: 202-207.

Smith PJ, Jamieson A, Birley AJ (1990) Electrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Perm. Intern. L'Explor. Mer.* 47: 231- 328.

Stevens JD (1984) Biological observations on sharks caught by sport fishermen of New South Wales. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 35: 573 – 590.

Stevens JD (1992) Blue and mako shark by-catch in the Japanese longline fishery off south-eastern Australia. *J. Mar. Freshw. Res.*, 43: 227 – 236.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Ac. Res.*, 22: 4673–4680.

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, Cadernos de Ictiogenética: 39 p.

Ussami LHF (2011) Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) na costa brasileira, utilizando marcadores microssatélites. [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista.

Walker TI (1998) Can shark resources be harvested sustainably? A question revisited with a review of shark fisheries. CSIRO. *Mar. Freshw. Res.*, 49: 553-572.

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. *Mol. Phylog. Evol.* 31: 1143-1156.

Ward RD, Woodswark M, Skibinski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.*, 44: 213-232.

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