

Análise da estrutura populacional e diversidade genética do tubarão mako (*Isurus paucus*) no Oceano Atlântico.

Carolina de Oliveira Magalhães

**Botucatu
2018**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970. Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise da estrutura populacional e diversidade genética do
tubarão-mako (*Isurus paucus*) no Oceano Atlântico.

Carolina de Oliveira Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes 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
2018**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970. Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

de Oliveira Magalhães, Carolina.

Análise da estrutura populacional e diversidade genética
do tubarão-mako (*Isurus paucus*) no Oceano Atlântico /
Carolina de Oliveira Magalhães. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Fernando Fernandes Mendonça

Capes: 20204000

1. Conservação. 2. Peixe - Genética. 3. Tubarão.

Palavras-chave: Conservação; D-loop; Genética; Tubarão.



Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação
Instituto do Mar – Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP



“É isso aí você não pode parar
Esperar o tempo ruim vir te abraçar
Acreditar que sonhar sempre é preciso
É o que mantém os irmãos vivos (...)”

Racionais Mc's

Agradecimentos

Por mais que tentasse não conseguiria dizer o quanto sou grata a todos que colaboraram diretamente ou indiretamente para que esse trabalho se concretizasse.

Gostaria de agradecer ao CNPq pelo financiamento recebido, sem o qual não seria possível o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu orientador Dr. Fernando Fernandes Mendonça pelo apoio, paciência e confiança no meu trabalho, desde a iniciação científica. Com você aprendi e aprendo valores acadêmicos e de vida imensuráveis.

Ao Dr. Rui Coelho, valioso pesquisador que nos cedeu as amostras, sempre compartilhando seu conhecimento sobre os tubarões. Ao professor Fausto Foresti, que mesmo de longe nos incentivou e nos cedeu o laboratório nas idas à Botucatu.

Aos meus colegas de laboratório: Ingrid, Esther, Mari e principalmente à Jú, pelo ombro amigo e pelo apoio de sempre. Ao Rodrigo que me atentou aos detalhes importantes das análises, escrita e argumentação da dissertação, além das risadas e cafés. Em especial ao meu amigo Bruno por todo ensinamento sobre genética, estatística e biologia, além da paciência e muitas risadas durante os dois anos de mestrado (e mais quatro de iniciação científica). GenPesC, muito obrigada!!

À minhas amigas/irmãs de sempre Laura, Camila e Aline, que mesmo de longe me incentivaram e acreditaram no meu potencial. Às minhas amigas de república (e de muitos cafés) Ana Cláudia e Júlia, que foram essenciais para minha estadia em Santos. Meninas, não sei o que eu faria sem vocês comigo! Obrigada, girls!!

Para finalizar gostaria de agradecer à minha família por todo apoio que recebo, ao meu avô, meus tios e primos. Em especial minha tia Anete, que é minha maior inspiração acadêmica. Agradeço principalmente à minha mãe Alair e meu irmão Guilherme, meus maiores incentivadores. Com o apoio de vocês eu sei que nada é impossível. Estaremos sempre juntos!

Resumo

O tubarão mako, ou anequim-preto *Isurus paucus*, é uma espécie oceânica-pelágica que habita regiões tropicais e temperadas em todo mundo. Suas características biológicas, como fecundidade tardia e baixa taxa de natalidade, aliadas à forte pressão pesqueira, têm contribuído para o aumento de desequilíbrios em sua dinâmica populacional. *Isurus paucus* é comumente capturado por embarcações atuneiras e, no entanto, os registros disponíveis são esporádicos e mesmo sua distribuição geográfica completa ainda não está clara. Atualmente, *I. paucus* está classificada como “Vulnerável” na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), porém, há poucos estudos relacionados à sua biologia, dinâmica pesqueira, além da falta de dados relacionados ao status populacional da espécie. Assim, utilizando a região controladora do DNA mitocondrial, o presente estudo buscou caracterizar a variabilidade genética, sua distribuição e estrutura populacional na região equatorial do Oceano Atlântico. No presente estudo foram caracterizaram apenas 11 haplótipos com baixos índices de diversidade nucleotídica ($\pi=0.00224 \pm 0.00017$) e moderada diversidade haplotípica ($h=0.790 \pm 0.020$), além da ausência de estruturação populacional ($\Phi_{ST} = -0.02123$), com alto fluxo gênico nas porções leste e oeste do Atlântico. Tais resultados contribuem para o conhecimento sobre esta espécie e contribuir no aperfeiçoamento de estratégias de manejo das pescas e conservação no Atlântico.

Sumário

1. Introdução	2
1.1 <i>Isurus paucus</i> (Guitard-Manday, 1966)	5
1.2 Distribuição	7
1.3 Estrutura populacional e variabilidade genética	9
1.4 Região controle do DNA mitocondrial – Dloop	10
1.5 História demográfica	11
2. Objetivos	13
2.1 Objetivos específicos:	13
3. Material e Métodos	13
3.1 Coleta das amostras	13
3.2 Extração, Amplificação e Sequenciamento	15
3.3 Análises da Estruturação Populacional e Diversidade Genética	16
4. Resultados	17
4.1 Características moleculares da região controladora do DNA mitocondrial	17
4.2 Diversidade genética e história demográfica	19
5. Discussão	24
Diversidade genética e estrutura populacional	24
Considerações finais	26
Referências Bibliográficas	28

1. Introdução

Os elasmobrânquios compreendem animais popularmente conhecidos como tubarões e raias, são peixes que possuem esqueleto cartilaginoso, grandes maxilares superiores e inferiores, fendas branquiais laterais (no caso dos tubarões) ou ventrais (no caso das raias).

A medida que peixes teleósteos vêm se tornando menos abundantes, a pressão de pesca tem aumentado substancialmente sobre outros grupos, como os elasmobrânquios (peixes com esqueleto cartilaginoso, que compreendem os tubarões e raias), os quais também vêm experimentando o crescente valor de sua carne, nadadeiras, fígado e arcos branquiais, entre outros. (Fowler *et al.*, 2002, Clarke *et al.*, 2006, Lack & Sant, 2009).

Apesar de estarem entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo (Castro, 1987) e desempenharem importantes papéis na estrutura e função do ecossistema costeiro e oceânico (Stevens *et al.*, 2000, Ferreti *et al.*, 2010), tubarões e raias estão ainda dentre os vertebrados mais negligenciados, em relação aos efeitos da sobrepesca (Stevens *et al.*, 2005; Dulvy *et al.*, 2014). Dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) registraram a captura total de elasmobrânquios em 2010 de aproximadamente 742 mil toneladas. Em 2015 as mesmas estatísticas revelaram uma captura global de aproximadamente 756 mil toneladas.

Um ponto importante sobre este aspecto é que, embora o Brasil seja um dos maiores consumidores de carne de tubarões em todo o mundo, a obtenção de dados de captura e análises estatísticas de pesca marinha estão paralisadas desde 2007, em toda a faixa de uso econômico exclusivo brasileiro (Barreto *et al.*, 2017). Assim, diversas espécies de tubarões, mesmo os ameaçados, são livremente comercializadas, embora sejam proibidos por legislações locais e/ou recomendações internacionais. Atualmente, a

frequência de elasmobrânquios (incluindo os tubarões) ameaçados no Brasil (33% de 145 espécies) excede a taxa global (25%) para o mesmo grupo (Barreto *et al.*, 2017).

Pescarias que visam espécies altamente migratórias e de grande distribuição global são geridas por comissões internacionais (Fishery Management Organizations - RFMOs), das quais fazem parte diversos países. Atualmente, cinco comissões dividem jurisdições sobre as regiões dos oceanos: a Comissão Internacional para a Conservação do Atum no Atlântico (ICCAT), a Comissão do Atum do Oceano Índico (IOTC), a Comissão de Pescas do Pacífico Ocidental e Central (WCPFC), a Comissão Interamericana do Atum Tropical (IATTC), supervisionando a atividade pesqueira no Leste Oceano Pacífico e a Comissão para a Conservação do Atum Azul (*Thunnus macoyii*) (CCSBT), supervisionando todas as pescarias desta espécie no hemisfério sul. Essas comissões são responsáveis, também, pelo manejo de qualquer outra espécie capturada em associação com a espécie-alvo. A ICCAT, por exemplo, reportou em 2010 que os tubarões são um dos principais grupos capturados no Oceano Atlântico, representando mais de 15% de todas as espécies pescadas (ICCAT, 2010).

Ainda nesse sentido, a CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção), que tem como objetivo garantir o comércio internacional sustentável de espécimes de animais selvagens e plantas classificou recentemente dez elasmobrânquios em seu Apêndice II (espécies que ainda podem ser negociadas internacionalmente, mas exigem um certificado de que os espécimes exportados foram capturados em condições sustentáveis) e sete no Apêndice I (espécies que não podem ser comercializadas internacionalmente, exceto sob permissão especial para espécimes cultivados e para fins científicos).

Em 1999 foi criada pela FAO a Comissão das Pescas (COFI), que tem por objetivo estabelecer diretrizes para estudos e monitorar a exploração sustentável dos recursos

marinhos vivos, incluindo os elasmobrânquios. Para este fim são realizados eventos que estabelecem acordos e normativas internacionais, como é o exemplo da CMS (Convenção sobre Espécies Migratórias), que enumerou várias espécies de tubarões e raias migratórias nos Apêndices I e II da Convenção e também estabeleceu um Memorando de Entendimento (MoU) sobre a Conservação de Tubarões Migratórios (2017).

Em 1999, a Comissão das Pescas da FAO, criou um Plano de Ação Internacional para a Conservação e Gestão dos Tubarões (IPOA-Sharks), dando origem a diversos planos nacionais com metas em comum para os países participantes, entre os quais encontram-se Brasil, EUA, Inglaterra, Austrália, Canadá, Malásia, países do Mediterrâneo, Equador, Senegal, entre outros.

No Brasil, este plano foi elaborado em 2005 pela Sociedade Brasileira para o Estudo dos Elasmobrânquios (SBEEL). Contudo, somente em 2009 o Ministério do Meio Ambiente aprovou a proposta de plano de gestão para o uso sustentável do grupo de elasmobrânquios sobreexplotados ou ameaçados de sobreexploração no país. Foi estabelecido o prazo máximo de cinco anos para o desenvolvimento e implantação de planos de recuperação de espécies ameaçadas e planos de gestão para os estoques em risco de agravamento. No entanto, até hoje pouco já foi realizado.

Entre as prioridades estabelecidas no plano nacional constam pesquisas que visam à caracterização genética populacional dos estoques, monitoramento das áreas protegidas ou de berçário, monitoramento dos desembarques nos principais portos comerciais para a obtenção de dados pesqueiros, pesquisas para a identificação de áreas prioritárias e ainda, o estímulo a trabalhos de pesquisa em conjunto e para participação em fóruns internacionais para espécies que constituem recursos compartilhados (Ibama, 2014).

1.1 *Isurus paucus* (Guitard-Manday, 1966)

A família Lamnidae é caracterizada por possuir predadores de natação rápida, distribuídos de forma circunglobal. São tubarões grandes com focinhos pontiagudos e corpos fusiformes e grandes aberturas branquiais (Compagno, 2001).

O tubarão mako, *Isurus paucus* (Figura 1) é uma espécie pelágica pouco conhecida, que permanece a maior parte do tempo em profundidade (120 a 240 metros, ou mais) (Ebert, 2013) embora possa ser avistado na superfície eventualmente. Distingue-se de seu congênere *Isurus oxyrinchus* pelo focinho menos pontudo, nadadeiras peitorais com comprimento igual ou superior à cabeça e ponta larga em jovens e adultos. Sua coloração dorsolateral é azul escura ou cinza-preto e, branca ventralmente (Ebert, 2013).

Como em outros representantes da ordem Lamniformes, *I. paucus*, possui um sistema de manutenção da temperatura corporal acima da água circundante, provavelmente como meio para ampliar seu habitat (Block & Carey, 1985; Goldman, 1997; Goldman *et al.*, 2004; Hueter *et al.*, 2017), o que é uma característica rara entre os peixes, aparecendo apenas em tubarões (Lamnidae), atuns (Scombridae) e peixes-de-bico (Xiphiidae, Istiophoridae) (Weng & Block, 2004). As duas espécies de tubarões mako são capazes de usar o habitat frio e de águas profundas por longos períodos de tempo, particularmente durante o dia (Abascal *et al.*, 2011; Hueter *et al.*, 2017).

A espécie produz ninhadas de 2 a 8 filhotes e tem como estratégia de desenvolvimento embrionário a viviparidade ovofágica, em que o embrião se nutre de óvulos e ovos liberados pela mãe durante a gestação, como ocorre também com outros Lamniformes (*Alopias vulpinus*, *Lamna nasus* e *Pseudocarcharias kamoharai*) (Ebert, 2013).



Figura 1: Exemplar de anequim-preto (*Isurus paucus*). Fonte: NOAA Observer Program/ Wikimedia Commons License: Public Domain.

Isurus paucus possui distribuição global, habitando desde águas tropicais e subtropicais (Compagno, 2001) até mares temperados (Queiroz et al. 2008, Mucientes et al., 2013). Apesar do seu tamanho máximo registrado de 430cm (Ebert, 2013) é uma espécie ainda pouco estudada, por sua relativa raridade e, ao menos em parte pela dificuldade de distinção da espécie com *I. oxyrinchus*. (Castro, 2011), o que pode contribuir para subestimação de dados de captura (Reardon et al., 2006).

Dados de 2011 da Lista Vermelha da IUCN mostram que o status para *I. paucus* é preocupante, sendo classificada como “Vulnerável” em todo o mundo. Por ser uma espécie de grande porte, pode ser alvo de pescarias direcionadas ou capturado acidentalmente como fauna acompanhante, abastecendo um mercado de nadadeiras amplamente não monitorado e não regularizado (IUCN 2011). De acordo com a FAO (2016), dados de pesca indicaram um aumento considerável na captura global de *I. paucus*: 2 toneladas registradas em 2010, para aproximadamente 42 toneladas, em 2015.

Além dos problemas de identificação pelas similaridades com seu congênere, por se tratar de um tubarão também descartado pela prática do *finning* (remoção das nadadeiras e descarte do resto do animal) (Clarke et al., 2006b) e devido a maioria dos

dados relacionados à estatística pesqueira subestimar as pescarias de pequena escala, a pesca recreativa, a captura acessória descartada e as capturas ilegais, os registros atuais certamente não representam o status populacional real e nem mesmo a pressão de pesca ao qual a espécie está submetida (Pauly & Zeller, 2016).

1.2 Distribuição

Considerando que grandes peixes migradores, como os tubarões, tendem a se agregar em locais caracterizados por fortes gradientes de temperatura e alta produtividade (“hotspots”) (Queiroz *et al.*, 2015), pode-se destacar a região equatorial, que apresenta alta biodiversidade (Botero *et al.*, 2013).

A alta biodiversidade presente na região equatorial se deve também a fatores ambientais como a ressurgência, que podem influenciar na variação e dinâmica espacial dessas espécies (Botero *et al.*, 2013). A ressurgência é caracterizada como uma zona de divergência de massas de água superficiais, que são substituídas por águas provenientes de camadas mais profundas (Longhurst & Pauly, 2007). A água trazida das camadas mais baixas é normalmente rica em nutrientes, que é o principal fator limitante da produção primária nas regiões tropicais. Apesar de a ressurgência equatorial ter maior magnitude no Pacífico, ela é observada nas três principais bacias oceânicas (Longhurst & Pauly, 2007).

De acordo com Allen e colaboradores (2002 e 2006), é possível prever a influência da temperatura ambiental nas taxas de divergência genética entre populações de organismos aquáticos. Através desses estudos foi possível concluir que as taxas metabólicas individuais, influenciadas pela temperatura ambiental, alteram a divergência genética entre populações. Estudos mais recentes (Audrey *et al.*, 2014; Cartamil *et al.*, 2010; Vaudo *et al.*, 2016; Andrzejczek *et al.*, 2018) também indicam que a temperatura

da água pode influenciar na movimentação dos tubarões e raias, inclusive do tubarão *Isurus oxyrinchus*, que possui uma biologia muito semelhante à espécie estudada no presente trabalho. Apesar de estudos com *Isurus paucus* serem escassos, fatores como temperatura da água elevada e maior disponibilidade de alimentos, podem ter sido importantes para a concentração da espécie na região equatorial atlântica tropical, apesar das aparições registradas no Atlântico Norte (Queiroz *et al.*, 2008), Venezuela (Cervigon, 2005) e Sul do Brasil (Amorim *et al.*, 1998).

Para fins estatísticos de pesca a FAO divide os oceanos em áreas regionais, das quais se destacam as 27 principais (Figura 2). Essas áreas fornecem informações acerca da distribuição de recursos aquáticos, situação ambiental, unidades de gerenciamento de pescas e sistemas de produção. Assim, os espécimes desse estudo, oriundos de capturas que abrangem a região equatorial do Oceano atlântico, foram agrupados seguindo as delimitações geográficas da FAO com amostras na área 31 e amostras na área 34.

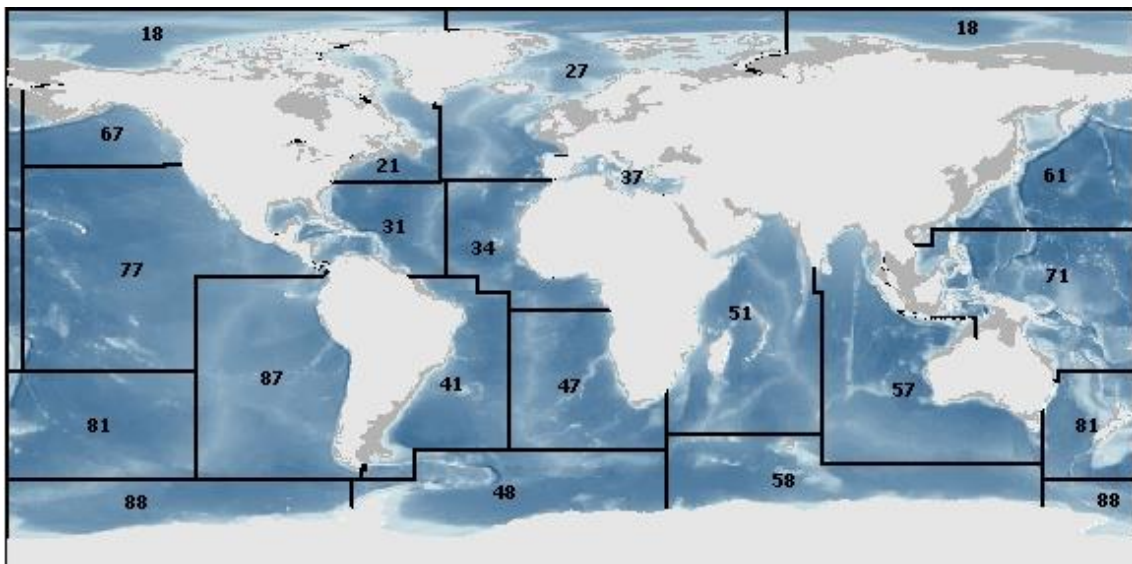


Figura 2: 27 principais Áreas Majoritárias de Pesca. FAO 2015.

1.3 Estrutura populacional e variabilidade genética

Peixes pelágicos com distribuição global possuem elevada capacidade de dispersão, migrando muitas vezes em grandes populações, o que pode resultar em um baixo nível de estruturação populacional (Waples, 1998). Porém devido a muitos processos históricos como alteração do fluxo gênico, dispersão ou expansões demográficas, a população pode conter sinais de divergência, especialmente em populações tropicais e subtropicais, nas quais a área de distribuição depende muito da temperatura da superfície do mar e a influência de correntes marítimas (Holbrook *et al.*, 1997). Nesse contexto, a generalização sobre a homogeneidade genética em ambientes marinhos pode muitas vezes estimular a sobreexploração das espécies, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade e eliminar estoques locais (Smith *et al.*, 1990, Kuusipalo, 1999).

Para entender os sinais de divergência de uma população, foram feitas observações sobre as distribuições dos haplótipos de DNA, as quais introduziram uma dimensão filogenética nas discussões sobre estrutura de populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avise *et al.*, 1987). Desse modo, Avise (2000) propõe e discute categorias filogeográficas com base no grau de divergência entre as sequências de DNA e na distribuição geográfica dos haplótipos. Tais categorias podem definir taxas de migração, existência ou não de barreiras ao fluxo gênico, extinção de haplótipos intermediários e realizar inferências cladísticas sobre as espécies.

Para avaliar o grau de diferenciação e estruturação das populações, foi calculada a estimativa de diferenciação genética pelo método de Análise de Variância Molecular (AMOVA), com uma classe de medidas análoga à estatística- F , designada estatística Φ_{ST} . Apesar de serem índices análogos, a estatística Φ_{ST} inclui correção para tamanhos desiguais de amostras entre populações dentro dos grupos e entre grupos, portanto é uma estatística mais adequada para se utilizar no presente estudo.

1.4 Região controle do DNA mitocondrial – Dloop

Uma das abordagens que podem ser aplicadas com a utilização do DNA mitocondrial (DNAMt) como marcador molecular, relaciona-se às suas propriedades, como a falta de recombinação e taxas de substituição aproximadamente 10 vezes maiores que as encontradas para genes nucleares (Hartl & Clarck, 2010). Com base nestas características, o DNAMt tornou-se também uma ferramenta comum e eficiente em elucidar as relações entre os indivíduos em diferentes escalas evolutivas (Brown *et al.*, 1979). Por conter os maiores trechos de DNA não codificante, exibir a maior taxa de substituição do DNA mitocondrial e sua taxa de evolução ser duas a cinco vezes maior que a dos outros genes codificadores de proteínas (Meyer, 1993), a região controladora deste genoma, também denominada D-loop, tem sido amplamente utilizada para entender aspectos da estruturação populacional também em elasmobrânquios (Heist, 2005).

Estudos utilizando a região D-loop já foram realizados para a avaliação dos estoques genéticos de diversas espécies de tubarões pelágicos, como O'Leary *et al.* (2015) que avaliaram a diversidade genética do tubarão branco, *Carcharodon carcharias*, no Noroeste Atlântico e na África do Sul. Neste estudo foi caracterizada a existência de duas populações geneticamente distintas. Camargo *et. al* (2016) avaliaram a diversidade genética do tubarão galha-branca, *Carcharhinus longimanus*, no Oceano Atlântico e em regiões do Oceano Índico. Os resultados mostraram uma variabilidade genética ligeiramente abaixo da média observada entre outras espécies de tubarões pelágicos e também níveis moderados de estrutura populacional entre o Oceano Atlântico Ocidental e Oriental com uma forte relação deste último com o Oceano Índico.

Cardeñosa *et al.* (2014) encontraram evidências de forte diferenciação genética entre as populações de tubarão-raposa, *Alopias pelagicus*, do Oceano Pacífico Ocidental e Oriental, além de sugerir a existência de duas Unidades Significativas Evolutivamente

(ESUs) no Oceano Pacífico. Estes resultados podem indicar a existência de espécies crípticas nessa região. Veríssimo *et al.* (2017) a estruturação populacional do tubarão-azul, *Prionace glauca*, no Oceano Atlântico utilizando o marcador molecular mitocondrial D-loop e também os marcadores nucleares microssatélites (SSRs). Para os dois casos, eles encontraram evidências de homogeneidade genética e, portanto, falta de estruturação populacional nas regiões amostradas.

Em geral, estes estudos demonstraram níveis relativamente baixos de estruturação populacional, consistentes com a elevada capacidade de dispersão destas espécies pelágicas de peixes (Waples, 1998). No entanto, para o tubarão *I. paucus* ainda não há nenhum registro deste tipo de avaliação em nenhuma das áreas de ocorrência.

1.5 História demográfica

As sequências de nucleotídeos do DNA retêm informações sobre os processos históricos evolutivos, portanto fazer uma análise das diferenças dessas sequências, entre indivíduos e populações, permite explorar os eventos demográficos do passado de uma espécie (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013), evidenciando assim, a importância da história evolutiva de uma população para a criação de medidas efetivas de conservação.

Para isso, foram efetuados os testes de neutralidade (F_s de F_u - baseado na distribuição dos haplótipos e R_2 - baseado na frequência de mutações) total e para cada grupo amostral, para verificar se há expansão populacional diferencial. Os testes de neutralidade F_s de F_u e R_2 analisam a influência das mutações sobre a história de vida das populações e são os mais adequados para uma variedade de condições (Onsins & Rozas, 2002). O desvio do equilíbrio neutro só ocorre quando esses valores são significativamente maiores ou menores que zero. Valores positivos de F_s sugerem uma

subdivisão populacional, ou efeito gargalo e valores negativos de F_s sugerem seleção direcional recente, seleção de alelos ligeiramente deletérios, expansão populacional ou “efeito carona” (Fu, 1997). Já o teste R_2 baseia-se na diferença entre o número de mutações únicas “singletons” (que em uma população em crescimento estão em excesso) e o número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências (Onsins & Rozas, 2002).

Além dos testes de neutralidade, também foi realizada a análise de distribuição demográfica *Mismatch*, que é uma avaliação da distribuição do número médio de diferenças por pares entre as sequências de DNA de grupos diferentes e pode gerar padrões distintos em função da história demográfica de uma população. A medida que entendemos a história evolutiva de uma população, mais efetivas podem ser as medidas de gestão e conservação, ainda mais se tratando de uma espécie altamente migratória.

A manutenção desses indivíduos está relacionada com perda da diversidade genética e do potencial evolutivo, que podem contribuir para a extinção da espécie (Frankham *et al.*, 2011), pois pode levar à diminuição do poder adaptativo e à perda da aptidão reprodutiva em acasalamentos aleatórios, afetando a espécie diante da seleção natural (Ellegren & Galtier, 2016). Portanto, reduções severas no tamanho da população podem alterar a diversidade genética e consequentemente a estrutura da população em um determinado local (Conover & Munch, 2002).

Desse modo, a caracterização da estruturação populacional, da diversidade genética e da história demográfica do tubarão-mako, *Isurus paucus* na região equatorial do Oceano Atlântico, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial, poderá contribuir para aumentar a compreensão sobre a dinâmica populacional e estruturação demográfica ainda pouco conhecidas, dessa espécie. Estes resultados

forneirão informações úteis para o conhecimento biológico e ecológico da espécie além de subsidiar a elaboração de planos de conservação, manejo e gestão dos estoques pesqueiros de um modo mais eficiente.

1. Objetivos

Considerando o importante papel ecológico de espécies com distribuição global e a fundamental importância de sua diversidade genética, o presente estudo tem como objetivo gerar dados a respeito da estrutura populacional do tubarão *Isurus paucus*, no oceano Atlântico, utilizando sequências do DNA mitocondrial e, assim, contribuir com o desenvolvimento dos bancos de dados a respeito da espécie.

2.1 Objetivos específicos:

- Caracterizar a diversidade genética de *I. paucus* no Oceano Atlântico;
- Identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos da região controle do DNA mitocondrial (D-loop), que formam os estoques de *I. paucus* na região equatorial do Oceano Atlântico;
- Avaliar a hipótese de estruturação populacional entre os grupos amostrais;
- Caracterizar aspectos da história demográfica do tubarão *Isurus paucus*, na região equatorial do Oceano Atlântico.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta das amostras

O estudo desenvolvido tem colaboração científica entre pesquisadores do Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação (GenPesC) do Instituto do Mar na

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP), do Centro de Ciências do Mar - CCMar, da Universidade do Algarve e do Instituto Português do Mar e Atmosfera – IPMA, Portugal.

As amostras de tecido de *Isurus paucus*, foram coletadas em regiões oceânicas da região equatorial atlântica, por observadores de bordo em barcos das frotas pesqueiras industriais portuguesas, que operam com espinheis de superfície e meia água e que tem como objetivo principal a pesca de atuns e espécies relacionadas. A área de abrangência amostral, realizada pelas embarcações portuguesas, variou desde a região central até região sul do Oceano Atlântico. No entanto a captura dos indivíduos se deu apenas na região equatorial (Figura 3).

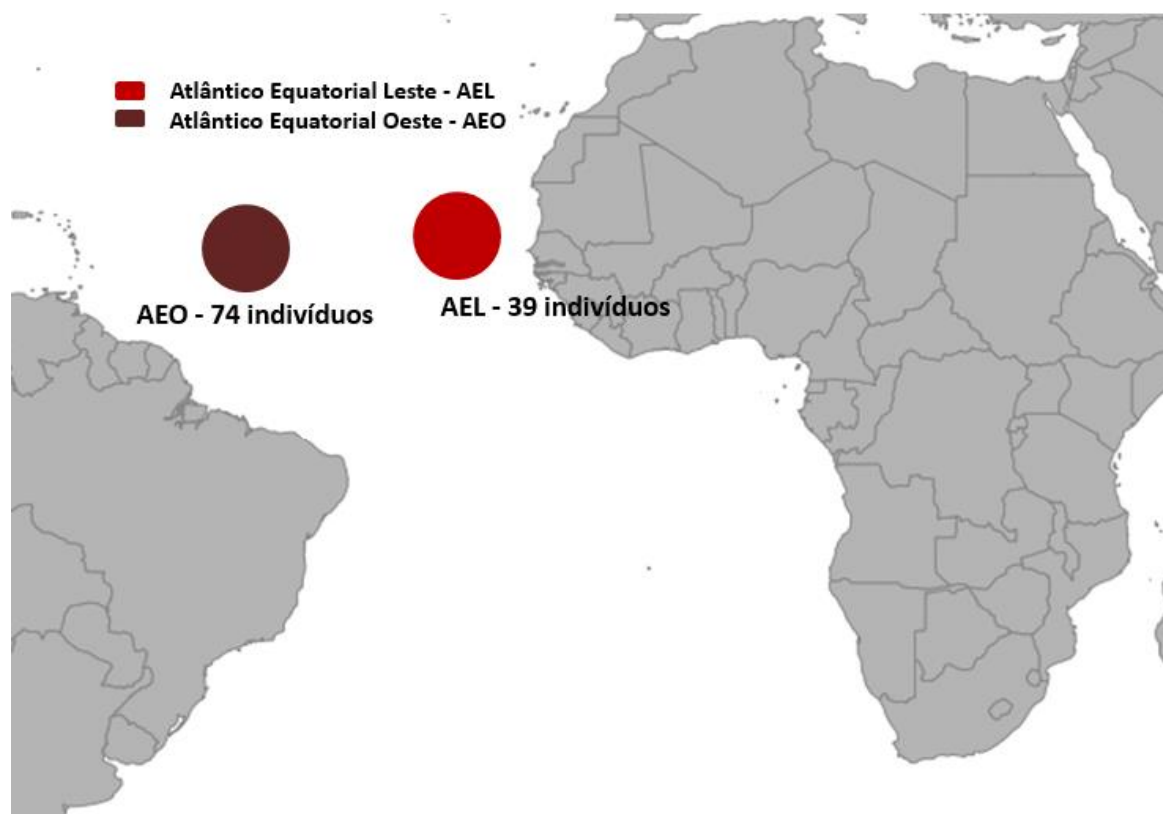


Figura 3: Localização de captura dos indivíduos de *Isurus paucus*, na região equatorial do Oceano Atlântico. Área 31 (Atlântico Equatorial Oeste – AEO - 74 indivíduos) e área 34 (Atlântico Equatorial Leste – AEL - 39 indivíduos).

Todas as amostras de tecido foram preservadas em álcool etílico a 95% em temperatura de -20°C e armazenadas no Laboratório de Genética Pesqueira e conservação (GenPesC) no Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista.

3.2 Extração, Amplificação e Sequenciamento

O material genético total dos espécimes coletados, foi extraído utilizando protocolo padrão do kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). As amplificações das sequências nucleotídicas de interesse no DNA mitocondrial foram realizadas utilizando Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo os protocolos do kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific™) com: 2,0µL 10X PCR Buffer, 0,5µL MgCl₂ (50mM), 0,5µL dNTP mix (10mM), 0,4µL Primer Prolina e 0,4µL Primer 12-S (10µM), 0,1µL Platinum® Taq DNA Polymerase, 1µL DNA e completar o volume até 20 µL ddH₂O autoclavada. As reações de PCR seguiram o seguinte protocolo no termociclador: 1º: 94°C por 2 minutos para a desnaturação da dupla fita de DNA, 2º: 25-35 ciclos de 94°C por 1 minuto segundos de desnaturação, 57°C por 40 segundos de anelamento dos *primers* (com variações mínimas para cada conjunto de *primers*), 72°C por 1 minuto e 30 segundos de extensão e 72°C por 10 minutos para extensão final. Após o término da reação de PCR as reações foram armazenadas a uma temperatura de -20°C. A constatação da amplificação foi realizada em gel de agarose a 1%, com o uso do corante

para ácidos nucleicos *Blue Green Loading Dye I* (LCG Biotecnologia) e visualizados em luz ultravioleta. Não foram contabilizadas amostras de difícil visualização no gel, ou que continham bandas alternativas.

Para o sequenciamento nucleotídico, os produtos da PCR foram primeiramente purificados em uma reação que utiliza duas enzimas em conjunto, uma exonuclease e uma fosfatase alcalina, seguindo o protocolo de ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup (Thermo Fischer Scientific[™]). Em seguida, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma PCR de sequenciamento, em termociclador, seguindo os protocolos do BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific[™]). As sequências de DNA foram geradas na plataforma de sequenciamento automático ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer.

A região controladora do DNA mitocondrial foi isolada pelos *primers* Pro-L 5'-AGGGRAAGGAGGGTCAAACCT-3' e 12S - 5'-AAFGCTAFFACCAAACCT-3' (Keeney *et al.* 2003) e sequenciada pelo *primer* descrito por Mendonça *et al.* (2009), D-loop Forward 5'-CTC CCA CCA AGA AAG TTC TG-3. As sequências de DNA geradas, foram alinhadas através do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), pelo software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) e editadas no software Geneious 11.0.5 (Kearse *et al.* 2012).

Todas as sequências de nucleotídeos foram colocadas no programa BLAST 1.4.0 (McGinnis & Madden, 2004), para comparação com o banco de dados e resultaram em mais de 98% de similaridade estatística com *Isurus paucus*.

3.3 Análises da Estruturação Populacional e Diversidade Genética

Para as análises genético-populacionais foram calculadas a composição e a diversidade nucleotídica, o número de sítios polimórficos e de haplótipos e, também, a diversidade haplotípica, utilizando o software DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). A

Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi calculada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) com estatística Φ_{ST} e os valores F_{ST} por pares de agrupamentos amostrais. Os valores de significância de testes múltiplos foram ajustados considerando a correção de Bonferroni ($P = 0,05/\text{número de combinações}$).

Para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle, foram realizados os testes de neutralidade FS de Fu (Fu, 1996) e R_2 (Onsins & Rozas, 2002), utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.2.2 e o software DnaSP v5. Foi utilizado o teste de distribuição Mismatch (Rogers e Harpending 1992), usando o modelo de expansão demográfica (Rogers & Harpending, 1992) e o de expansão espacial (Ray & Excoffier., 2003), através do programa ARLEQUIN 3.5.2.2.

As redes de haplótipos são usadas na análise de dados genéticos populacionais, para visualizar as relações genealógicas no nível intra-específico, bem como para inferir sobre a biogeografia e a história evolutiva das populações (Bandelt, *et al.*, 1999). No presente estudo, ela foi elaborada pelo software PopART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizando o método Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999).

4. Resultados

4.1 Características moleculares da região controladora do DNA mitocondrial

O sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de 113 indivíduos da espécie *I. paucus* resultou em 823 nucleotídeos analisáveis, com seis sítios polimórficos (Tabela 1) evidenciando 11 haplótipos (Tabela 2). As frequências nucleotídicas

observadas foram: Citosina= 42,93%, Guanina=2,02%, Adenina=14,65% e Timina=40,40%.

Tabela 1: Sítios polimórficos da região controladora do DNA mitocondrial dos haplótipos da espécie *Isurus paucus*. Os haplótipos estão listados na coluna da esquerda e as posições dos sítios polimórficos apresentam-se na primeira linha.

Sítios Polimórficos						
Haplótipos	79	153	174	193	233	742
1	T	A	T	T	T	C
2	.	.	C	.	.	.
3	C	.	.	C	C	.
4	.	G	.	.	.	T
5	C	.	.	.	.	.
6	.	G	.	.	C	C
7	.	.	.	.	.	C
8	.	.	.	.	C	.
9	.	.	.	.	.	.
10	C	.	.	.	.	.
11	C	G	.	.	.	.

A tabela 2 mostra que os haplótipos mais comuns (H1 e H3) representam juntos aproximadamente 62% do total dos indivíduos estudados, sendo H1 o mais compartilhado (43 indivíduos).

Tabela 2: Distribuição geográfica dos haplótipos de *Isurus paucus* com os números de indivíduos de cada região. AEO (Atlântico Equatorial Oeste) e AEL (Atlântico Equatorial Leste).

Haplótipos	AEO	AEL	Total
1	24	19	43
2	3	1	4
3	21	6	27
4	9	4	13
5	13	6	19
6	1	-	1
7	1	-	1
8	1	-	1
9	1	1	2
10	-	1	1
11	-	1	1

4.2 Diversidade genética e história demográfica

As diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) totais foram $h=0.761 \pm 0.023$ e $\pi=0.00247 \pm 0.00016$, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3. Dados estatísticos de *Isurus paucus* – n: número de indivíduos; N: número de haplótipos; h: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica. AEO (Atlântico Equatorial Oeste) e AEL (Atlântico Equatorial Leste).

Localidade	n	N	h	π
AEO	74	9	0.777 ± 0.024	0.00259 ± 0.00174
AEL	39	8	0.795 ± 0.048	0.00268 ± 0.00164
Total	113	17	0.761 ± 0.023	0.00247 ± 0.00016

Através do teste AMOVA, observou-se que não há base estatística para confirmar a estruturação entre as localidades estudadas ($\Phi_{ST} = -0.00823$), com desvios significativos da hipótese nula de neutralidade e sugerindo a ocorrência de expansão populacional (Tabela 4). O valor negativo da porcentagem de variação entre grupos, nos mostra ela não é significativa, logo a porcentagem de variação dentro da população toda é alta, indicando que há um alto fluxo gênico entre todos os indivíduos analisados.

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dados de sequências da região de controle de mtDNA.

Variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre grupos	1	0.596	-0.00834	-0.82
Dentro da população	112	113.422	1.02182	100.00
Total	113	114.018	1.01348	---

Os valores de R_2 não foram significativos em nenhum local, enquanto o teste F_s de F_u mostrou valores negativos em todos os locais (tabela 5). Portanto, os testes de neutralidade não são significativos e corroboram com a hipótese de expansão populacional.

Tabela 5: Valores dos testes de neutralidade, utilizando sequências do DNA mitocondrial. R_2 : valor teste R_2 ; P_D : p-value de R_2 ; F_s : valor teste de F_u e P_{F_s} : p-value de teste de F_u . AEO (Atlântico Equatorial Oeste) e AEL (Atlântico Equatorial Leste).

Testes de Neutralidade				
Localidade	R₂	Pr₂	Fs	PFs
AEO	0.10296	0.73836	-0.31797	0.56870
AEL	0.13086	0.75604	-103.293	0.34870
Total	0.88573	0.76536	-0.67545	0.45820

Na distribuição *Mismatch*, o índice de irregularidade (*Raggedness Index*) e a soma dos desvios quadrados (*SSD*), entre a distribuição observada e a esperada, servem para validar ou não o modelo de história demográfica estimado pelos testes de neutralidade. Assim, os valores obtidos através desses testes (Tabela 6) corroboram com os resultados evidenciados pelos testes de neutralidade, os quais não rejeitam a hipótese de expansão populacional. Os gráficos resultantes da análise *Mismatch* ilustram os cenários de expansão espacial (figura 4) e de expansão demográfica (Figura 5), por grupos e o total.

Tabela 6: *Mismatch distribution* das populações, utilizando sequências do DNA mitocondrial. θ_0 : valor θ inicial; θ_1 : valor de θ final; Tau: valores do teste estatístico Tau; M: valores do teste estatístico M; *SSD*: soma dos desvios quadrados; *PSSD*: p-value de *SSD*; *Raggedness index*: valor do teste de irregularidade; *Raggedness p-value*: p-value do teste de irregularidade. AEO (Atlântico Equatorial Oeste) e AEL (Atlântico Equatorial Leste).

Expansão Espacial							
Localidade	0	TAU	M	SSD	PSSD	Raggedness index	Raggedness p-value
AEO	1.77881	0.42977	6124.52185	0.01942	0.23800	0.06091	0.39000
AEL	1.69970	0.23601	9778.93344	0.02287	0.32400	0.07285	0.54500
Total	1.94011	0.22942	5724.53511	0.02212	0.24100	0.06989	0.45500

Expansão Demográfica							
Localidade	00	01	TAU	SSD	PSSD	Raggedness index	Raggedness p-value
AEO	0.000	2.866	6.00391	0.023	0.539	0.6091	0.64400
AEL	0.000	2.288	597071	0.025	0.6320	0.07285	0.68500
Total	0.000	2.65405	6.00391	0.02618	0.48400	0.06989	0.56400

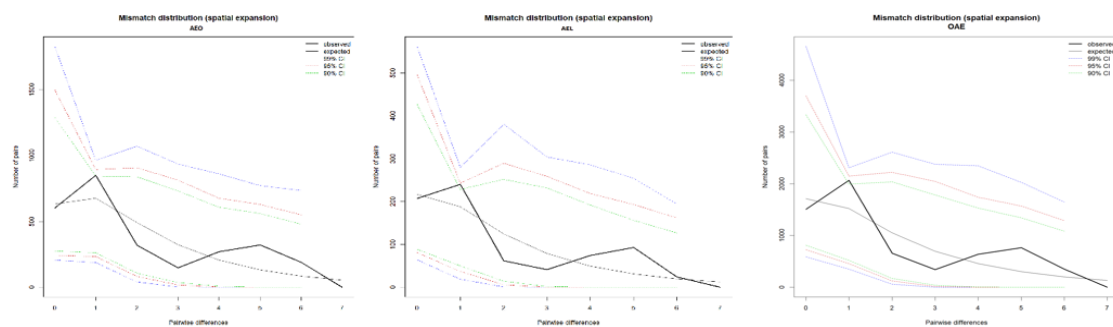


Figura 4: Gráficos de distribuição *Mismatch*: expansão espacial. AEO (Atlântico Equatorial Oeste); AEL (Atlântico Equatorial Leste) e OAE (Oceano Atlântico Equatorial Total).

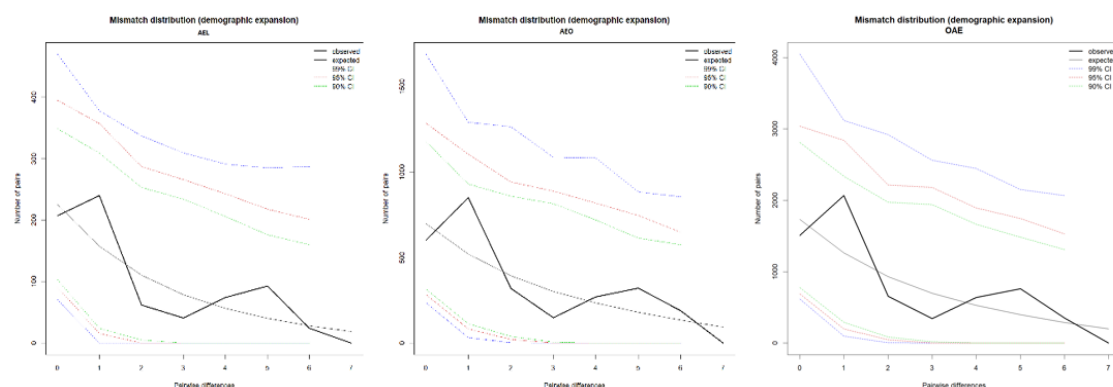


Figura 5: Gráficos de distribuição *Mismatch*: expansão demográfica. AEO (Atlântico Equatorial Oeste); AEL (Atlântico Equatorial Leste) e OAE (Oceano Atlântico Equatorial Total).

O padrão observado pela distribuição dos haplótipos em ambos os lados, leste oeste do Atlântico, também evidenciam a ausência de estruturação populacional com haplótipos sendo compartilhados pelas duas regiões.

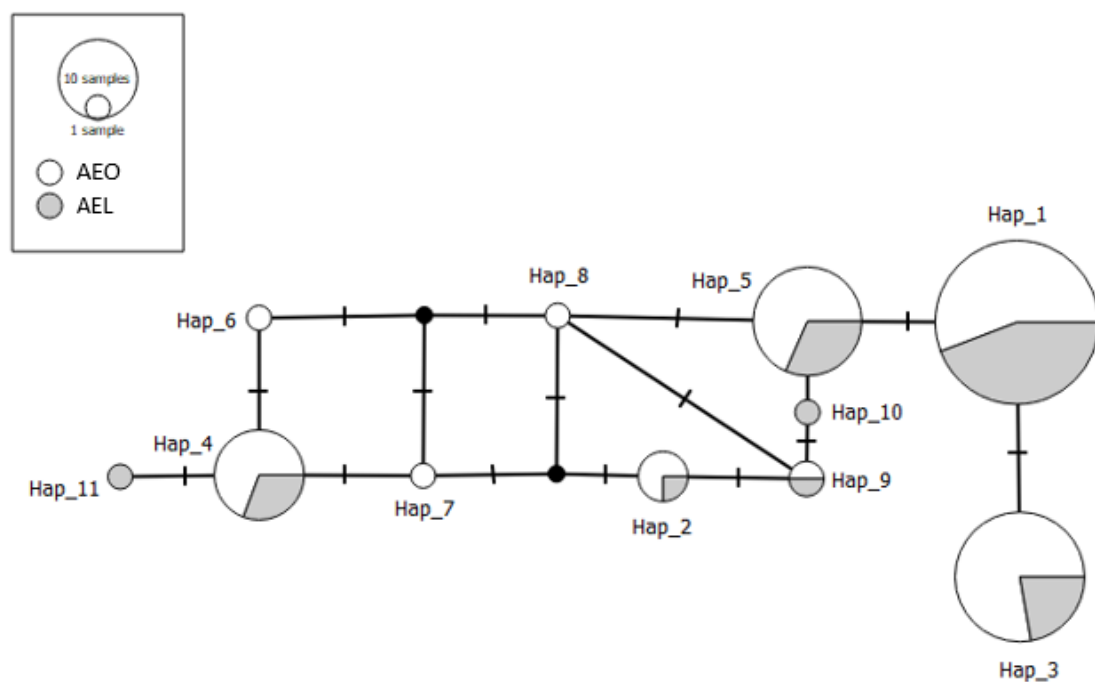


Figura 6. A rede de haplótipos ilustra a distribuição geográfica dos haplótipos, nas três áreas estudadas, para *Isurus paucus*. O tamanho dos círculos está em proporção ao número de indivíduos e as barras indicam passos mutacionais. Em branco são representados os indivíduos no grupo amostral do Atlântico Equatorial Oeste (AEO); em cinza os indivíduos do Atlântico Equatorial Leste (AEL) e em preto os haplótipos dos indivíduos hipotéticos e/ou não amostrados.

5. Discussão

Diversidade genética e estrutura populacional

Nesse estudo apresentam-se os primeiros resultados sobre a estrutura genética populacional do tubarão *Isurus paucus*, em grupos amostrais representativos da região equatorial do Oceano Atlântico. Em nossos resultados destacamos a baixa diversidade

genética e ausência de estruturação populacional, caracterizando um único estoque genético, com alto fluxo gênico entre as porções leste e oeste no Atlântico.

Os resultados dos índices de diversidade genética obtidos no presente estudo apresentaram-se similares aos observados para outras espécies de tubarões pelágicos (*Pseudocarcharias kamoharai*, Ferrette *et al.*, 2015) e costeiros (*Carcharhinus limbatus*, Sodré *et al.*, 2012; *Carcharhinus leucas*, Karl *et al.*, 2011), resultando em valores de diversidade nucleotídica e haplotípica baixos. Apesar da amostragem ser pequena, o que dificulta uma discussão robusta acerca da diversidade genética desta espécie na região,   possível observar que, os índices de diversidade encontrados no presente estudo mostram um padrão para indivíduos de distribui o e migra o semelhantes. Para efeitos de gestão e conserva o, esta é uma importante referência para a elabora o de estratégias em conjunto para diferentes espécies.

Apesar de estudos mostrarem que pode haver estrutura o populacional, mesmo que moderada, em espécies de tubarões pelágicos (*Carcharhinus longimanus*, Camargo *et al.*, 2016; *Carcharodon carcharias* O'Leary *et al.*, 2015) e altamente migratórios (*Rhincodon typus*, Vignaud, 2014), até em estudos que consideraram as mesmas áreas de amostragem e espécies similares comportamental e biologicamente, os resultados obtidos no presente trabalho mostram uma configura o diferente para *I. paucus*. Os valores da AMOVA encontrados no nosso estudo, indicaram que não há isolamento de estoques genéticos para a espécie. A rede de haplótipos resultante, também denota diferenças genéticas entre indivíduos sem mostrar correlações entre os diferentes ramos e suas distribuições geográficas, com um padrão característico de uma população não estruturada. Tal evidência é igualmente encontrada por Heist *et al.* (1996) e Schrey & Heist (2003) para o cong nere *Isurus oxyrinchus*, em populações do oceano Atlântico, mesmo utilizando outros marcadores moleculares. Nossos resultados também são

consistentes com outras espécies de tubarões pelágicos e altamente migratórios, como *Alopias superciliosus* (Morales *et. al.*, 2018) e *Cetorhinus maximus* (Hoelzel *et al.*, 2006).

Os padrões unimodais observados nos gráficos resultantes da análise *Mismatch*, também sugerem hipótese de expansão populacional recente (Slatkin & Hudson 1991, Rogers & Harpending 1992). Esse cenário pode ser confirmado comparando-se a estatística SSD simulada e a observada, (Schneider & Excoffier, 1999), bem como os valores de θ_0 (inicial) e θ_1 (final) (Tabela 4). Os valores de θ_0 iguais a 0 indicam uma pequena população antes dos eventos de expansão demográfica e espacial (Rogers, 1995). Portanto, a combinação dos resultados dos testes de neutralidade e da análise demográfica *Mismatch* sustentam uma hipótese de expansão populacional recente.

Isurus paucus é uma espécie altamente migratória e pode-se inferir que os indivíduos analisados caracterizam uma única população panmítica no Atlântico, abrangendo ao menos a faixa tropical de sua distribuição. Sua expansão populacional é recente e possivelmente decorrente de eventos de deriva genética. Sabendo-se que a espécie possui ocorrência rara em áreas subtropicais, espera-se que indivíduos avistados nestas áreas devam pertencer a esta única população conhecida, até o momento.

Considerações finais

Considerando que o entendimento da variabilidade genética de *Isurus paucus* e as variáveis ambientais são fatores fundamentais para diminuir o impacto da sobrepesca, pode-se notar que o fenômeno da ressurgência equatorial possivelmente influenciou a permanência dos indivíduos na região amostrada, modulando do fluxo gênico. Porém a

falta de estudos sobre a biologia e dinâmica da espécie ainda não nos permite confirmar essa hipótese.

Dentre os estudos já realizados utilizando a região controle do DNAm em elasmobrânquios, a identificação de baixos índices de diversidade genética tem sido bastante comum (Schultz *et al.* 2008, Pereyra *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2011; Karl *et al.*, 2011; Portnoy *et al.*, 2014, Andreotti *et al.*, 2016, Camargo *et al.*, 2016). Nas populações estudadas de *Isurus paucus* os indivíduos apresentaram valores dentro do esperado para elasmobrânquios, caracterizando uma população com alto grau de intercruzamento.

Sendo a mudança ambiental um processo contínuo, a perda da diversidade genética diminui o valor adaptativo da espécie, deixando-a menos apta a tais mudanças. Apesar das populações de *Isurus paucus* descritas no presente estudo possuem alto grau de conectividade e índices de diversidade genética de uma população panmítica, a manutenção da variabilidade genética não deve ser ignorada, pois sua perda pode levar à endogamia e perda do sucesso reprodutivo.

Assim, considerando a vulnerabilidade ao qual a espécie está sujeita (Queiroz *et al.*, 2015), nossos dados ressaltam a importância de mais estratégias efetivas para o manejo e conservação, que exijam colaboração internacional, afim de viabilizar a manutenção da variabilidade genética, bem como a pesca por vias sustentáveis.

Referências Bibliográficas

- Abascal FJ, Quintans M, Ramos-Cartelle A, Mejuto J. 2011. Movements and environmental preferences of the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, in the southeastern Pacific Ocean Marine Biology 158 (5): 1175–1184.
- Allen AP, Brown JH, Gillooly JF. 2002. Global biodiversity, biochemical kinetics, and the energetic-equivalence rule. Science 297:1545–1548.
- Allen AP, Gillooly JF, Savage VM, Brown JH. Kinetic effects of temperature on rates of genetic divergence and speciation. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(24), 9130-9135.
- Amorim A, Arfelli C, Fagundes L. 1998. Pelagic elasmobranchs caught by longliners off southern Brazil during 1974–97: an overview. Marine Freshwater 49, 621–632.
- Andreotti S, Heyden S, Henriques R, Rutzen M, Meÿer M, Oosthuizen H, Matthee CA. 2016. New insights into the evolutionary history of white sharks, *Carcharodon carcharias*. Journal of Biogeography 43(2), 328-339.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Sauders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489-522.
- Avice JC. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press 447 páginas.
- Bandelt H, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16(1), 37–48.
- Benavides M, Feldheim KA, Duffy C, Winter S, Braccini M, Boomer J, Huveneers C, Rogers P, Mangel J, Alfaro Shigueto J, Cartamil DP, Chapman D. 2011. Phylogeography of the copper shark (*Carcharhinus brachyurus*) in the southern hemisphere: implications for the conservation of a coastal apex predator. Marine and Freshwater Research 62: 861-869.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society 57(1), 289-300.
- Block BA, Carey FG. 1985. Warm brain and eye temperatures in sharks. J. Comp. Physiol. 156, 229–236.
- Bonfil R. 1994. Overview of world elasmobranch fisheries. FAO Technical Paper 341:119.

Botero CA, Dor R, McCain CM, Safran RJ. 2013. Environmental harshness is positively correlated with intraspecific divergence in mammals and birds. *Molecular Ecology* 23(2): 259-268.

Brander KM. 2007. Global fish production and climate change. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 104 (50) 19709-19714.

Brown JH. 2014. Why are there so many species in the tropics? *Journal of Biogeography* 41(1), 8-22.

Brown WM, George M, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1967-1971.

Camargo SM, Coelho R, Chapman D, Howey-Jordan L, Brooks EJ, Fernando D, Mendes NJ, Hazin FH, Oliveira C, Santos MN, Foresti F, Mendonça FF. 2016. Structure and Genetic Variability of the Oceanic Whitetip Shark, *Carcharhinus longimanus*, Determined Using Mitochondrial DNA. *PlosOne* 11(5): e0155623.

Campana SE, Joyce W, Fowler M, Showell M. 2016. Discards, hooking, and post-release mortality of porbeagle (*Lamna nasus*), shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*), and blue shark (*Prionace glauca*) in the Canadian pelagic longline fishery. *Journal of Marine Science* 73(2):520.

Cardenosa D, Hyde J, Caballero S. 2014. Genetic Diversity and Population Structure of the Pelagic Thresher Shark (*Alopias pelagicus*) in the Pacific Ocean: Evidence for Two Evolutionarily Significant Units. *PlosOne* 9(10): e110193.

Casey JC. 1986. Distribution of the longfin mako (*Isurus paucus*) in the Northwest Atlantic. Program and Abstracts ASIH and AES Annual Meeting 15–21pp.

Castro A, Stewart B, Wilson S, Hueter R, Meekan M, Motta P, Bowen B, Karl S. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* 16: 5183-5192.

Castro JI. 1987. The position of sharks in marine biological communities: an overview. *Sharks, an inquiry into biology, behavior, fisheries, and use*. Oregon State University Extension Service. pp: 11-17.

Castro JI. 2011. The sharks of North America, ISBN: 0195392949 613p.

Cavanagh C, Morell M, Mackay I, Powell W. 2008. From mutations to Magic: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(2):215-21.

Cervigon F. 2005. La ictiofauna marina de Venezuela: una aproximacion ecologica. *Instituto Oceanografico* 44 (1): 3–28.

Chapman DD, Feldheim KA, Papastamatiou YP, Hueter RE. 2015. There and Back Again: A Review of Residency and return Migrations in sharks, with implications for population structure and management. *Annual Review of marine Science* 7, 547-570.

CITES. 2017. Memorandum of understanding on the conservation of migratory sharks. Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals.

Compagno LJV. 2001. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. FAO Species Catalogue for Fisheries Purposes (1):1-269.

Compagno, LJV. 1998. Lamnidae. Mackerel sharks, makos, white sharks, porbeagles. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific FAO Species Catalogue for Fisheries. Purposes 1274-1278.

Conover DO, Munch SB. 2002. Sustaining Fisheries Yields Over Evolutionary Time Scales. *Science* 297:94-96.

Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA. 2009. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science* 1:1, 169-192.

Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polovina J, Rabalais NN, Sydeman WJ, Talley LD. 2012. Climate change Impacts on marine Ecosystem. *Annual Review of Marine Science* 4:1, 11-37pp.

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

Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavanagh RD, Kyne PM, Harrison LR, Carlson JK, Davidson LNK, Fordham SV, Francis MP, Pollock CM, Simpfendorfer CA, Burgess GH, Carpenter KE, Compagno LJV, Ebert DA, Gibson C, Heupel MR, Livingstone SR, Sanciangco JC, Stevens JD, Valenti S, White WT. 2014. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife* 3: e00590.

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

Ellegren H, Galtier N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 17:422-433.

Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567.

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

FAO. 2009. The state of food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Food and agriculture organization of the United Nations.

FAO. 2016. Capture fisheries. Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ferrette BL, Mendonça FF, Coelho R, Oliveira PGV, Hazin FHV, Romanov EV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F. 2015. High Connectivity of the Crocodile Shark between the Atlantic and Southwest Indian Oceans: Highlights for Conservation. PLoS One 10: e0117549.

Ferretti F, Worm B, Britten GL, Heithaus MR, Lotze HK. 2010. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. Ecology Letters, 13: 1055–1071.

Fowler S. 2014. The conservation status of migratory sharks. Unep/Cms Secretaria 13 978-3-937429-79-3.

Frankham R, Ballou JD, Eldridge MD, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB. 2011. Predicting the Probability of Outbreeding Depression. Conservation Biology 25: 465-475.

Fu YX. 1996. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. Genetics, 143(1) 557-570.

Gallagher AJ, Hammerschlag N, Shiffman DS, Giery ST. 2014. Evolved for Extinction: The Cost and Conservation Implications of Specialization in Hammerhead Sharks. BioScience 64 (7): 619-624.

Gallagher AJ, Orbesen ES, Hammerschlag N, Serafy JE. 2014. Vulnerability of oceanic sharks as pelagic longline bycatch. Global Ecology and Conservation 1: 50-59.

Goldman KJ, Latour RJ, Musick JÁ. 2004. Homeothermy in adult salmon sharks, *Lamna ditropis*. Environmental Biology of Fishes 71 (4) 403-411.

Goldman KJ. 1997. Regulation of body temperature in the white shark, *Carcharodon carcharias*. Journal of Comparative Physiology 167, 423–429.

Grant W, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity 89: 415–426.

Graves JE, McDowell JR. 2003. Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. Marine and Freshwater Research 54: 287-298.

Guitard Manday D. 1966. Nuevo nombre para uma especie de tiburón del género *Isurus* (Elasmobranchii: Isuridae) de aguas cubanas Poeyana – Instituto de Biología Cuba. Serie A (no 15) 1-9pp.

Harcourt AH, Coppeto SA, Parks SA. 2002. Rarity, specialization and extinction in primates. Journal of Biogeography, 29: 445–456.

Hartl D, Clark AG. 2010. *Principles of population genetics*. 4ª edição. ISBN 978-0-87893-308-2

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: 583–588.

Heist EJ. 2005. Genetics: stock identification. Management techniques for elasmobranch fisheries. Singapore APEC Fisheries Working group (474) 62.

Hellberg ME. 2009. Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:1, 291-310.

Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. 2006. Low worldwide genetic diversity in Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *PlosOne* 8(9): e75169.

Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP. 2006. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology Letters* 2(4): 639-642.

Holbrook SJ, Schmitt RJ, Stephens JS. 2011. The IUCN Red List of Threatened Species Ecological Applications: IPOA-Sharks.

Holbrook SJ, Schmitt RJ, Stephens JS Jr. 1997. Changes in an assemblage of temperate reef fishes associated with a climate shift. *Ecological Application* 7:1299–1310.

Holsinger KE, Weir BS. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10,639-650.

Howey-Jordan LA, Brooks EJ, Abercrombie DL, Jordan LK, Brooks A, Williams S, Gospodarczyk E, Chapman DD. 2013. Complex movements, philopatry and expanded depth range of a severely threatened pelagic shark, the oceanic whitetip (*Carcharhinus longimanus*) in the western North Atlantic. *PLoS One* 8(2): e56588.

Hueter RE, Tyminski JP, Morris JJ, Abierno AR, Valdes JA. 2017. Horizontal and vertical movements of longfin makos (*Isurus paucus*) tracked with satellite-linked tags in the northwestern Atlantic Ocean. *Fish Bull.* 115(1):101–116.

ICCAT. 2010. Task 1 data on nominal annual catches. Total nominal shark catches for 2010. 98 428 T.

ICMBio. 2014. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de extinção – PAN Tubarões.

IUCN. 2006. The Red List of Threatened Species. *Isurus paucus*: e.T60225A12328101. Version 2017-3.

Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS,

Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR. 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 5530.

Karl SA, Castro ALF, Lopez JA, Charvet P, Burgess GH. 2011. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics* 12: 371-382.

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

Keeney DB, Heupel M, Hueter RE, Heist EJ. 2003. Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology* 143, 1039–1046.

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

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33(7):1870-4.

Kuusipalo L. 1999. Genetic differentiation of endemic Nile perch (*Lates niloticus*) populations in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia* 407: 141-148.

Lack M, Cambridge SG. 2009. Trends in global shark catch and recent developments in management. *Traffic International* 1076722.

Leigh JW, Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110–1116.

Lennox RJ, Chapman JM, Souliere CM, Tudorache C, Wikelski M, Julian Metcalfe D, Cooke SJ. 2016. Fisiologia da conservação da migração animal, *Fisiologia da Conservação* 4(1): cov072.

Lesack K, Naugler C. 2011. An open-source software program for performing Bonferroni and related corrections for multiple comparisons. *Journal of Pathology Informatics* 2(1) 52.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11) 1451-1452.

Longhurst P & Alan D. 2007. *Ecologia dos Oceanos Tropicais*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

Martin AP, Naylor GJP, Palumbi, SR. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357(6374) 153-5.

- McCauley DJ, Pinsky ML, Palumbi SR, Estes JA, Joyce FH, Warner RR. 2015. Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. *Science* 347(6219):1255641.
- McGinnis S & Madden, TL. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB. 1990. *Conserving the World's Biological Diversity*. ISBN: 0-915825-42-2.
- Meyer A. 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 2: 1-38.
- Michael EB, Cortés E, Vaudo JJ, Harvey GCM, Sampson M, Wetherbee BM, Mahmood S. 2017. Satellite telemetry reveals higher fishing mortality rates than previously estimated, suggesting overfishing of an apex marine predator. *Proceedings Royal Society* 284: 20170658.
- Mohan DM, Rab MA, Paraguas FJ, Piumsombun S, Bhatta R, Ferdous Alam M, Ahmed M. 2005. Fish consumption and food security: a disaggregated analysis by types of fish and classes of consumers in selected Asian countries. *Aquaculture Economics and Management* 9: 89–111.
- Morales MJA, Mendonça FF, Magalhães CO, Oliveira C, Coelho R, Santos MN, Cruz VP, Piercy A, Burgess G, Hazin FV, Foresti F. 2018. Population genetics of the bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* in the Atlantic and Indian Oceans: implications for conservation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 0960-3166.
- Mucientes G, Bañón R, Queiroz N. 2013. Updated distribution range of longfin mako *Isurus paucus* (Lamniformes: Lamnidae) in the North Atlantic. *Journal of Applied Ichthyology* 29: 1163-1165.
- Mucientes GR, Queiroz N, Sousa LL, Tarroso P, Sims DW. 2009. Sexual segregation of pelagic sharks and the potential threat from fisheries. *Biology Letters* 5 156-159.
- Naylor RL, Goldburg, RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405(6790) 1017-1024.
- O'Leary SJ, Feldheim KA, Fields AT, Natanson LJ, Wintner S, Hussey N, Shivji MS, Chapman DD. 2015. Genetic Diversity of White Sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northwest Atlantic and Southern Africa. *Journal of Heredity* esv001.
- Pauly D, Zelly D. 2016. Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature Communication* 7: 10244.
- Pereyra S, García G, Miller P, Oviedo S, Domingo A. 2010. Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). *Fisheries Research* 106(3): 468-473.

- Phillips NM, Chaplin JA, Morgan DL, Peverell SC. 2011. Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered *Pristis* sawfishes in Australian waters. *Marine Biology* 158(4): 903-915.
- Portnoy DS, Hollenbeck CM, Belcher CN, Driggers WB, Frazier BS, Gelsleichter J, Grubbs RD, Gold JR. 2014. Contemporary population structure and post-glacial genetic demography in a migratory marine species, the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. *Molecular Ecology* 23(22): 5480-5495.
- Queiroz N, Araujo S, Ribeiro P, Tarroso P, Xavier R, Santos A. 2008. A first record of longfin mako, *Isurus paucus*, in the mid-North Atlantic. *Marine Biodiversity Rec.* 1, e34.
- Queiroz N, Humphries NE, Mucientes G, Hammerschlag N, Lima FP, Scales KL, Miller PL, Sousa LL, Seabra R, Sims DW. 2015. Ocean-wide hotspots of shark and longliner overlap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113 (6) 1582-1587.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution* 20:2092–2100.
- Ray N, Currat M, Excoffier L. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20:76–86.
- Reardon MB, Gerber L, Cavanagh RD. 2006. *Isurus paucus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006: An Illustrated Compendium of Sharks, Skates, Rays and Chimaeras. e.T60225A12328101.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43(1), 223-225.
- Rodewald AD, Shustack DP, Jones TM. 2011. Dynamic selective environments and evolutionary traps in human-dominated landscapes. *Ecology* 92: 1781–1788.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552–569.
- Rogers AR. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49:608–615.
- Sala E, Knowlton N. 2006. Global marine biodiversity trends. *Annual Review of Environment and Resources* 31: 93–122.
- Schmidt JV, Schmidt CL, Ozer F, Ernst RE, Feldheim KA, Ashley MV, Levine M. 2009. Low genetic differentiation across three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus*. *PLoS ONE* 4(4): e4988.
- Schrey AW, Heist EJ. 2003. Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60:670-675.

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.

Selig ER, Turner WR, Troëng S, Wallace BP, Halpern BS, Kaschner K, Lascelles BG, Carpenter KE, Mittermeier RA. 2014. Global Priorities for Marine Biodiversity Conservation. *PLoS ONE* 9(1): e82898.

Slatkin M, Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555-562.

Smith APJ, Jamieson AJB. 1990. Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. *Journal of Marine Science* 47: 231–245.

Sodre D, Rodrigues-Filho LFS, Souza RFC, Rêgo PS, Schneider H, Sampaio I, Vallinoto M. 2012. Inclusion of South American samples reveals new population structuring of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) in the western Atlantic. *Genetics and Molecular Biology* 35: 752-760.

Stevens JD, Walker TI, Cook SF, Fordham S. 2005. Threats faced by chondrichthyan fishes. IUCN/ SSC Shark Specialist Group. IUCN. ISBN: 2-8317-0700-5.

Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker P. 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. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10: 512-526.

Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular biology and evolution* 9(4), 678-687.

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. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Turchetto-Zolet, AC, Segatto, ALA, Turchetto, C, Palma-Silva, C, Freitas, LB. 2013. Guia Prático para estudos Filogeográficos. Sociedade Brasileira de Genética, 105pp.

Tyrrell T. 2011. Anthropogenic modification of the oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 369: 887–908.

Veríssimo A, Sampaio Í, McDowell JR, Alexandrino P, Mucientes G, Queiroz N, Silva C, Jones CS, Noble LR. 2017. World without borders — genetic population structure of

a highly migratory marine predator, the blue shark (*Prionace glauca*). Ecology and Evolution 7(13):4768-4781.

Vignaud TM, Maynard JA, Leblois R, Meekan MG, Vázquez-Juárez R, Ramírez-Macías D, Pierce SJ, Rowat D, Berumen ML, Beeravolu C, Baksay S, Planes S. 2014. Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. Molecular ecology 23(10): 2590-2601.

Waples RS. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. Journal of Heredity 438–450.

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

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

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

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