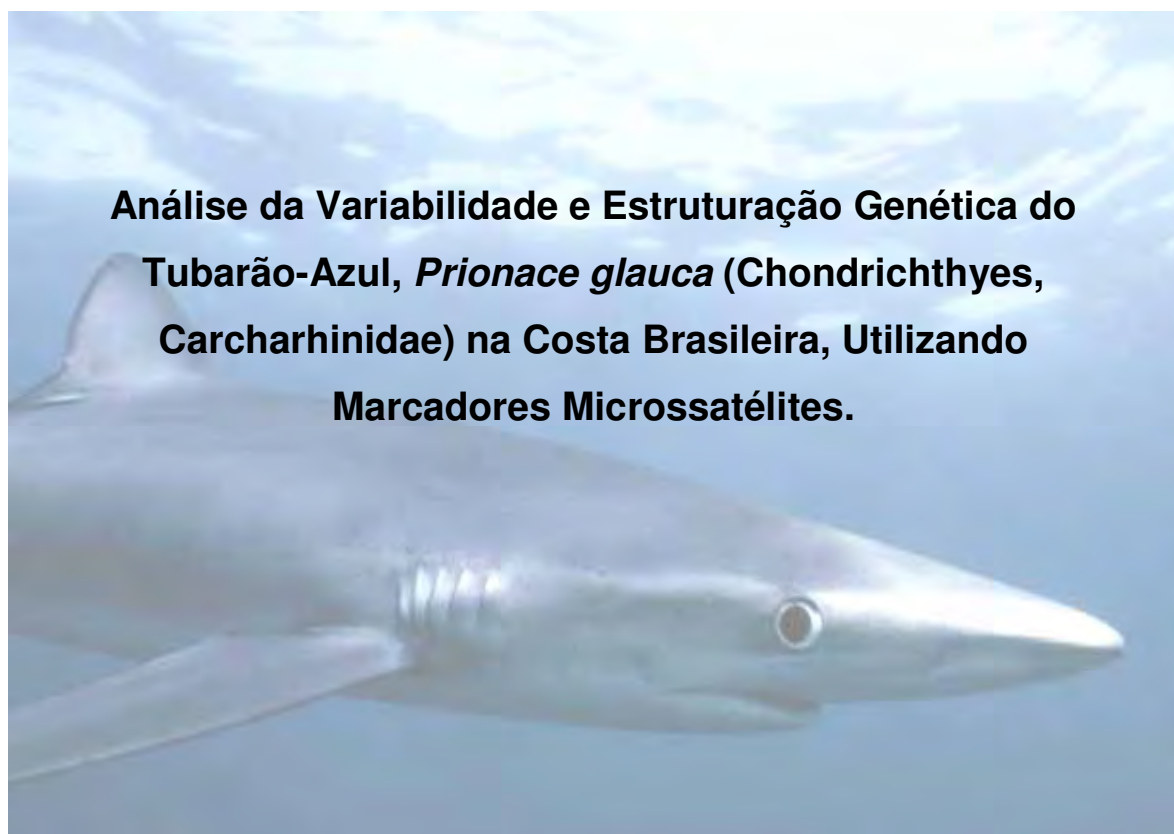


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Luis Henrique Fregadolli Ussami



**Análise da Variabilidade e Estruturação Genética do
Tubarão-Azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes,
Carcharhinidae) na Costa Brasileira, Utilizando
Marcadores Microsatélites.**

**Botucatu - SP
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Análise da Variabilidade e Estruturação Genética do
Tubarão-Azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes,
Carcharhinidae) na Costa Brasileira, Utilizando
Marcadores Microssatélites.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Zoologia) do
Instituto de Biociências de
Botucatu, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre.

Aluno: Luis Henrique Fregadolli Ussami
Orientador: Fausto Foresti
Co-orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Botucatu - SP

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu -
UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB
8/4716

Ussami, Luis Henrique Fregadolli.

Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão-azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) na costa brasileira, utilizando marcadores microssatélites / Luis Henrique F. Ussami - Botucatu, 2011.

Tese (mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Fausto Foresti

Co-orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Assunto CAPES: 20204000

1. Genética animal. 2. Tubarão - Genética.

Palavras-chave: Conservação; Elasmobrânquios; Estruturação genética; Microssatelite; *Prionace glauca*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pela orientação, dedicação à pesquisa em Genética de Peixes, enorme contribuição para a minha formação, apoio e grande incentivo. Um exemplo de pesquisador. Mais uma vez, obrigado por acreditar em mim.

Ao Professor Dr. Otto Bismarck Fazzano Gadig da UNESP de São Vicente, meu co-orientador, agradeço a amizade, cumplicidade e os muitos ensinamentos, apesar da distância. Muito obrigado pela confiança.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, por toda a ajuda durante a realização deste.

Ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP, pela possibilidade de realizar este trabalho.

A todos os meus colegas do Departamento de Morfologia: Amanda, Fabio (Fio), Gláucia, Gleisy, Guilherme (Varvito), Kelly, Mahmoud, Ricardo Paiva, Tatiane, Vanessa, Zeca, Duilio, Viviane, Priscila, Victor (Morfético), Ricardo, Marlon, Raquel e Luz.

Aos amigos Bruno Melo e Luiz Henrique, um agradecimento especial por terem me ajudado na análise e interpretação dos meus resultados.

Ao grupo de Elasmobrânquios, Fernando, Aline, Bruno (Guiodai), Bruno (Pitera), Sâmia, Camila, Natalia e Millke pela disponibilidade de ajudar sempre, em qualquer situação necessária.

À minha família: papai Yoshio, mamãe Maria Edneia e meu irmão Junior, pelo apoio e fé que tiveram em mim. Sem vocês este trabalho não seria possível.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Estudos que permitiu a minha dedicação exclusiva ao trabalho, enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Resumo

A identificação e o manejo adequado de estoques diferenciados constituem empreendimentos de fundamental importância para o setor pesqueiro, pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos. Do mesmo modo, o conhecimento acerca da variabilidade e estrutura genética das espécies é essencial para o estabelecimento de programas de preservação. Com distribuição global, o tubarão-azul *Prionace glauca* (Carcharhinidae) ocorre na área oceânico-epipelágica de toda a costa brasileira, sendo um importante recurso econômico pesqueiro, já que representa cerca de 60% dos tubarões capturados pelas frotas industriais que operam com espinhéis. Os marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite têm sido amplamente empregados no estudo de populações de peixes, com inferências sobre conservação e manejo de espécies, padrões de migração, diferenciação de estoques naturais e cultivados, prospecção de evidências de introgressão genética, sistemas reprodutivos e efeitos da fragmentação de ambientes sobre taxons relacionados, gerando informações fundamentais para o manejo adequado e conservação das espécies. Com o objetivo de analisar a estruturação genética das populações de tubarão-azul encontradas no litoral brasileiro foram analisadas amostras de indivíduos provenientes de populações naturais capturados na região próxima ao Rio Grande do Sul ($n=33$), São Paulo ($n=33$) e na região próxima ao Rio Grande do Norte ($n=30$) utilizando 8 primers polimórficos de microssatélites. Os testes foram conduzidos via PCR e resolvidos em gel de poliacrilamida 6%, sendo a genotipagem realizada através do programa Kodak Digital Science 1D. O número de alelos/lócus, heterozigosidade esperada e observada, equilíbrio de

Hardy-Weinberg (HWE) e o coeficiente de endocruzamento (F_{is}) foram obtidos por aplicação do programa Popgene v.1.32. Para a análise da estruturação gênica foi utilizado o programa Arlequin3.11. A heterozigosidade observada apresentou média de 0,4341 e a heterozigosidade esperada de 0,5659, sendo de 29,50 o número médio de alelos observado e de 15.74 para alelos efetivos. O coeficiente de endocruzamento (F_{is}) apresentou uma variação de 0.1855 á 0.6450, sendo que nenhum loco apresentou-se em HWE, o que poderia ser decorrente do elevado número de homozigotos observados. O índice F_{ST} encontrado foi de 0.0506 ($P < 0,00001$), denotando uma estrutura populacional moderada nas comparações entre as regiões analisadas. O baixo índice de estruturação genética encontrado nas amostras estudadas nestas três regiões, mesmo considerando a relativa distância geográfica, sugere a adoção da existência de uma só população da espécie na área estudada, que poderia ser justificada pelo comportamento altamente migratório da espécie e determinante de possível mixagem dos componentes das populações existentes.

Sumário

1. Introdução.....	6
1.1 Exploração pesqueira de tubarões.....	6
1.2 Tubarão-azul, <i>Prionace glauca</i>	10
1.3 A plataforma continental brasileira.....	16
1.4 Estrutura e variabilidade populacional.....	18
2. Objetivos.....	25
3. Metodologia.....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Coleta das amostras.....	26
3.2 Metodos.....	27
3.2.1 Isolamento dos Microsatélites.....	27
3.2.2 Análise populacional.....	29
3.2.3. Análises Inter e Intrapopulacional.....	30
4. Resultados.....	33
4.1 Caracterização dos primers de microsatélite.....	33
4.2 Análise populacional.....	38
4.2.1 Análise intrapopulacional e variação dos microsatélites.....	38
4.2.2 Análise interpopulacional.....	41
5. Discussão.....	47
5.1 Caracterização dos primers microsatélites.....	47
5.2 Análise populacional.....	49
6. Referências.....	55

1 Introdução

1.1 Exploração pesqueira de tubarões

Tubarões e raias formam a Sub-Classe Elasmobranchii e estão entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo, com uma história de vida que se iniciou há cerca de 400 milhões de anos, ainda no período Devoniano (Castro, 1987). Atualmente estão representados por aproximadamente 480 espécies de tubarões e 550 espécies de raias, com distribuição que abrange desde ambientes de águas tropicais até temperadas ou frias, em áreas costeiras e oceânicas associadas a ambientes pelágicos, demersais, recifais, estuários e, eventualmente, em água doce (Compagno, 1990; Gruber, 1990).

A fauna brasileira de elasmobrânquios é rica e diversa, com cerca de 170 espécies registradas, sendo 90 espécies de tubarões e pouco mais de 80 de raias (Gadig, 2001) e destas, pelo menos 60 são espécies marinhas (Menezes *et al.*, 2003). Estes poucos representantes são diretamente impactados em seu ambiente natural pela intensa atividade pesqueira e destruição de habitats (SBEEL, 2005), o que se reflete na contínua diminuição de captura de diversas espécies.

Até há pouco tempo, a captura de elasmobrânquios em todo o mundo podia ser considerada quase totalmente incidental, embora sempre tenha havido comercialização da carne e subprodutos. Historicamente consideradas de baixo valor econômico, várias espécies de elasmobrânquios tornaram-se atualmente alvo de intensiva pesca comercial, em substituição às capturas de peixes ósseos cujos estoques estão em declínio. O tradicional baixo valor econômico destes peixes tem resultado na falta de incentivos e recursos

financeiros destinados à sua pesquisa, o que sempre dificultou o conhecimento das espécies e das populações. No entanto, o aumento no valor do produto e a crescente demanda por partes do corpo como as nadadeiras de tubarões no mercado mundial passaram a estimular sua exploração, sendo este um dos produtos pesqueiros mais caros do mundo, atingindo valores próximos a US\$ 500,00 por quilo (Bonfil, 1994). Nas últimas décadas, esse quadro tem se alterado de modo expressivo e com a crescente valorização do produto no mercado asiático, as pescarias de tubarões passaram a ser dirigidas a diversas espécies.

Os dados estatísticos sobre a exploração pesqueira da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) registram no ano de 2007 a captura mundial de 781.000 toneladas de elasmobrânquios, sendo cerca de 496.000 toneladas de tubarões e 285.000 de raias. Ainda segundo a FAO, o Brasil é responsável pela captura de cerca de 12.000 toneladas anuais de tubarões e 5.000 toneladas de raias (FAO 2009) e a partir do ano 2000 passou a ser considerado pela IUCN como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “Major Shark Fishing State”. Deste grupo também fazem parte os EUA, África do Sul, Costa Rica, Austrália e Oman (Lack & Sant, 2006).

Associadas ao alto crescimento da pesca, características biológicas como a grande longevidade, crescimento lento, maturação tardia e baixa fecundidade conduzem os elasmobrânquios a um baixo nível de recrutamento e, conseqüentemente, aumentam a susceptibilidade das suas populações (Natanson & Cailliet, 1986). Em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido incluídas nas listas de risco iminente de extinção pela

International Union for Conservation of Nature e Natural Resources – IUCN (Camhi *et al.*, 1998).

Entre os tubarões e raias mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento das populações devido à sua distribuição em vastas áreas geográficas, muitas vezes circunglobais (Baum *et al.*, 2003). Deste modo, o efetivo efeito das capturas ainda tem permanecido desconhecido para um grande número de espécies cosmopolitas, sendo que a maioria das avaliações para detectar o colapso destes recursos e viabilizar procedimentos de manejo e conservação das espécies e estoques têm sido realizadas apenas numa abrangência regional (Castro *et al.*, 1999).

Dentre as espécies de grande porte comumente capturadas nas pescarias oceânicas no Oceano Atlântico, algumas já apresentam declínios populacionais acima de 50%, de acordo com os registros dos últimos 10 anos (Baum *et al.*, 2003). Estimativas realizadas com dados obtidos a partir de desembarques de frotas pesqueiras dos EUA apresentaram um declínio recente de até 70% nas populações de *Prionace glauca* (tubarão-azul) e declínios populacionais de cerca 80% nas espécies *Alopias superciliosus* e *A. vulpinus* (tubarões-raposa) no Atlântico Norte. Nesta mesma área foi estimado o declínio de aproximadamente 90% para as espécies do gênero *Sphyrna* (tubarões-martelo) e declínio de cerca de 70% para as populações do tubarão galha-branca *Carcharhinus longimanus* (Compagno, 2001). Deve ser ressaltado que os dados referentes às capturas destas mesmas espécies no Atlântico Sul ainda são inconsistentes.

O manejo de elasmobrânquios no Brasil tem apresentado certa dificuldade principalmente devido à falta de informações básicas sobre a dinâmica das populações das espécies (SBEEL, 2005). Aliado a este fato, quando comparados com outros tipos de pescados, tubarões e raias têm baixo valor econômico, o que lhes confere baixa prioridade no desenvolvimento de políticas de manejo e conservação (Bonfil, 1994) e, infelizmente as pesquisas não têm acompanhado o aumento de intensidade das pescarias. Assim, devido às estratégias de vida dos elasmobrânquios e a inexistência de políticas de conservação para o grupo, as capturas têm alcançado o ponto de colapso, sem que medidas eficientes de manejo tenham sido tomadas até o momento (Vooren, 1997; Kotas *et al.*, 1995; SBEEL, 2005).

O processo de recuperação dos efeitos causadores de declínio da biomassa para as espécies sobreexplotadas pode perdurar por vários anos. Este manejo torna-se mais difícil ainda devido à mobilidade das espécies (movimentos migratórios), à falta de dados de captura, esforço de captura, distribuição e diversificação dos pontos de desembarque e comercialização dos produtos e também pela carência de conhecimento sobre os parâmetros biológicos da maioria das populações impactadas pela pesca (SBEEL, 2005).

Medidas de gestão da pesca são essenciais especialmente no caso dos elasmobrânquios, para assegurar a sustentabilidade da atividade pesqueira; contudo, fatores externos como a degradação de áreas de berçários também devem ser considerados para que estas medidas possam ser eficazes. A ação dos fatores externos agrava a situação dos estoques sobreexplotados e pode colocar algumas espécies em risco de extinção. Um grupo com estratégias de vida e características únicas certamente requer medidas bastante específicas

ou até mesmo mais rigorosas do que as que podem ser adotadas para outros grupos de organismos aquáticos.

De modo geral as atividades pesqueiras, a pesquisa voltada aos recursos pesqueiros e a fiscalização destas atividades no país estão estritamente vinculadas ao IBAMA, estando sob sua responsabilidade as medidas necessárias para o manejo da exploração de recursos pesqueiros costeiros. No entanto, embora no planejamento desta instituição haja referências a ações relacionadas aos tubarões e raias, estas não têm sido implementadas na sua plenitude até o presente, não havendo consequências políticas para a falta de sustentabilidade na exploração das populações de elasmobrânquios (Lessa *et al.*, 2005).

Embora o conhecimento sobre a situação populacional para a maioria das espécies de tubarões seja incipiente, verifica-se que algumas destas já estão sofrendo de maneira drástica os efeitos negativos da sobrepesca e exploração irracional do ambiente (Rosa & Menezes, 1996; Rosa, 1997; Camhi *et al.*, 1998) (Figura 1). Muitas populações já foram enormemente reduzidas pela exploração pesqueira e algumas espécies já se encontram drasticamente ameaçadas de extinção (Lessa *et al.*, 1999).

1.2 Tubarão-azul *Prionace glauca*.

Entre os tubarões, os membros da família Carcharhinidae são os de maior importância para o homem em função da existência de numerosas espécies apresentando médio e grande porte; apresentam notória abundância relativa e têm distribuição costeira e oceânica nas faixas tropicais, subtropicais e temperadas, fatores estes que resultam em importância econômica (pesca

comercial para consumo da carne e extração das nadadeiras, pesca esportiva, exploração turística em mergulhos contemplativos, etc) e, principalmente, altíssima importância trófica no ecossistema marinhos, com ocorrências de eventos de interação negativa com humanos (ataques de tubarões) (Compagno, 1990; Last & Stevens, 2009; Camhi *et al.*, 1998).



Figura 1 - Exemplares de *Prionace glauca* capturados no Brasil e processados para comercializados no CEAGESP, São Paulo (foto Otto Gadig)

A esta família pertence o tubarão-azul *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) (Figura 2) espécie de grande porte que pode atingir 3,5 m de comprimento total, caracterizada pelo corpo esbelto, 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 os inferiores oblíquos e levemente serrilhados e, finalmente, pela

característica coloração azul índigo muito marcante em animais vivos e recém mortos (Compagno, 1984).

Amplamente estudada do ponto de vista biológico, aspectos da sua reprodução mostram enorme variação entre diferentes áreas geográficas, embora a estratégia reprodutiva seja pela viviparidade placentária (Pratt, 1977; Compagno, 1984). De uma maneira geral, seu tamanho máximo atingido é de cerca de 3,80 m e a maioria dos espécimes capturados mediram menos do que 3,35 m. Machos amadurecem entre 1,80 e 2,10 m e fêmeas entre 1,70 e 2,20 m, produzindo entre 4 e 135 filhotes a cada gestação, que nascem medindo entre 34 e 48 cm de comprimento (Compagno, 2002).



Figura 2 - Tubarão-azul *Prionace glauca*, capturado no Sudeste do Brasil (foto Teodoro Vaske Júnior)

Apesar de ser considerado um tubarão oceânico, *P. glauca* pode ser eventualmente observado em zonas costeiras, principalmente em regiões com plataforma continental estreita, ou ao redor de ilhas oceânicas. Esta espécie

apresenta hábitos migratórios relacionados à reprodução e é frequentemente encontrado em grandes agregações (Nakano, 1994; Stevens, 2000; Compagno, 2002), apresentando distribuição circumglobal em águas temperadas e tropicais, sendo esta provavelmente a espécie de mais ampla distribuição entre os elasmobrânquios (Compagno, 2002). Ocorrem em toda a extensão da costa brasileira (Sadowsky *et al.*, 1989; Hazin *et al.*, 1990; Amorim, 1992; Gadig, 1994; Rosa, 1997; Charvet-Almeida *et al.*, 2008).

Prionace glauca é uma espécie normalmente capturada por espinhéis pelágicos, redes de emalhe e arrastos de fundo. Embora o principal interesse esteja nas nadadeiras, sua carne e couro, no entanto, também são produtos bastante procurados (Compagno, 1984). O impacto anual de mortalidade por pesca causado nesta espécie está estimado em cerca de 20 milhões de indivíduos, colocando-a na posição de espécie de tubarão oceânico mais capturada em todo o mundo. No entanto, informações básicas para o manejo da pesca tais como a caracterização da estrutura genética populacional com a identificação dos níveis de variabilidade, identificação de possíveis restrições geográficas ao fluxo gênico e a existência de populações locais, entre outras, permanecem globalmente desconhecidas. Contudo, apesar dos registros relacionados ao drástico declínio populacional desta espécie no Oceano Atlântico, a falta de informações que complementem o status atual de *P. glauca* sustentam sua classificação apenas como “Quase Ameaçada” nas listas vermelhas de espécies em risco de extinção da IUCN (Stevens, 2005).

Tais listagens exercem atualmente grande influência nas prioridades de preservação dos órgãos governamentais sendo, contudo, que apenas Canadá, EUA, México e Austrália já possuem legislações específicas para a pesca do tubarão-azul, com a delimitação de cotas por barcos, restrição a áreas de

exploração da ZEE (Zona de Exploração Exclusiva) e proibição da retirada das nadadeiras para o comércio (Holts *et al.*, 1998).

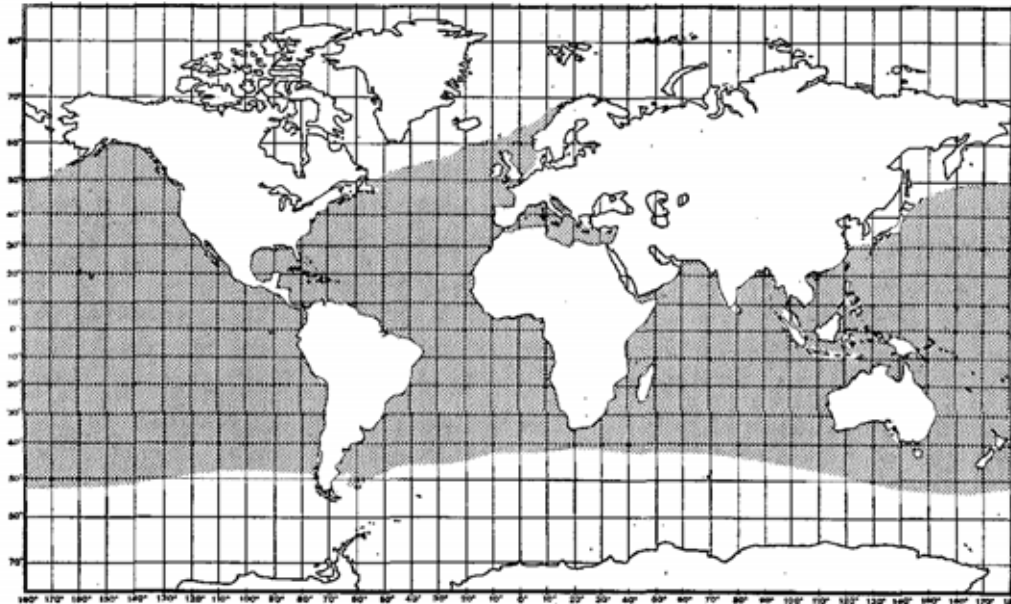


Figura 3 - Mapa da distribuição da espécie *Prionace glauca*, que ocorre desde regiões tropicais até temperadas frias (principalmente em temperaturas variando entre 13 e 18°C), principalmente em áreas oceânicas epipelágicas entre 80 e 220 m de profundidade.

Segundo Hiltoni-Taylor (2000), a espécie é considerada um predador apical no seu ecossistema e anualmente ocorre captura estimada entre 10 a 20 milhões de indivíduos da espécie, tornando-se necessário um monitoramento adequado que vise à avaliação do declínio das populações. Acredita-se também que alguns estoques poderão ser ameaçados num futuro próximo devido à elevada captura da espécie como fauna acompanhante associada às pescarias oceânicas (Camhi *et al.*, 1998).

A tendência global da captura de tubarão-azul mostra um avanço gradual a partir de 1985, então com 67 toneladas desembarcadas, até um

máximo atingido em 2004, com 36.647 toneladas desembarcadas (FAO, 2007). No entanto, vale destacar que a compilação estatística da pesca de tubarão-azul foi pouco realista, pois grande parte de sua captura não foi reportada durante as décadas de 1950, 1960, 1970 e parte da década de 1980 devido ao baixo valor comercial da espécie na época (Bonfil, 1994). Sendo assim, a interpretação do impacto da pesca nos estoques desta espécie fica prejudicada.

Um ótimo sumário do conhecimento sobre a espécie em águas brasileiras foi apresentado por Hazin & Lessa (2005). Na costa do Brasil a espécie aparentemente copula na região Sudeste, no período entre dezembro e fevereiro (Amorim, 1992); porém, a ovulação e fertilização ocorre no Nordeste cerca de 3 meses a 4 depois, no período de abril a junho (Hazin *et al.*, 1994). A maioria das fêmeas é capturada em região aberta no Sudeste do Brasil durante o primeiro e último trimestres do ano, sendo capturada próximo da costa durante o primeiro e segundo semestres. O tamanho médio das fêmeas em ambas as áreas é similar (entre 2,00 e 2,70 m de comprimento total).

Os dados disponíveis, embora não conclusivos, indicam que a espécie se desloca do Sudeste, onde copula, para o Nordeste, onde ocorre a ovulação dando, portanto, a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico ao longo da costa do Brasil. Acredita-se, porém, que o ciclo completo da espécie não seja totalmente dentro do Atlântico Sul ocidental, havendo o deslocamento dos indivíduos da região Nordeste do Brasil para a costa do Golfo da Guiné, na África, onde fêmeas em estágios iniciais de gestação são encontradas no período de junho a agosto (Castro & Mejuto, 1995). Essa possibilidade é reforçada pelo fato de que entre os tubarões pelágicos, o tubarão-azul é sem dúvida o maior migrador. Estudos de marcação demonstraram a ocorrência de

deslocamentos transatlânticos, fortalecendo a hipótese da existência de uma única população desta espécie no Atlântico Norte.

1.3 A plataforma continental brasileira

A plataforma continental brasileira apresenta uma extensão de cerca de 6.400 km e largura que varia de um mínimo de 10 km ao largo do Estado da Bahia a um máximo de 300 km na região amazônica. A circulação geral da massa aquática na plataforma brasileira é determinada pelas Correntes de Contorno Oeste como parte do Giro Subtropical Anticiclônico do Atlântico Sul. A costa brasileira ocupa zonas subtropicais e tropicais onde predominam águas oligotróficas transportadas pela Corrente do Brasil (regiões Nordeste, Central e Sul) e pela Corrente Norte do Brasil (regiões Nordeste e Norte) (Castro & Miranda, 1998).

A região da Plataforma Amazônica (4°N-2°S) se caracteriza por um ambiente extremamente dinâmico, devido a uma conjunção de fatores que interagem e produzem características oceanográficas únicas. O rio Amazonas é responsável por cerca de 18% de toda a descarga fluvial mundial nos oceanos e sofre uma influência significativa dos ventos alísios do nordeste (Castro & Miranda, 1998), garantindo a alta produtividade nas costas do Amapá e do Pará (Isaac *et al.*, 1998). As temperaturas de superfície na plataforma superam os 27°C o ano todo e em profundidades de 200 m se situam em torno dos 17°C. A produtividade da Costa Norte é relativamente elevada, favorecendo o desenvolvimento da cadeia trófica (Castro & Miranda, 1998).

A Plataforma Continental Nordeste (2°S -8°S) brasileira é caracterizada por baixas variações de temperatura e com grandes variações de salinidade, principalmente próximo às regiões de descarga fluvial. Do ponto de vista

biológico a costa nordestina é uma região oligotrófica, com baixa densidade de fitoplâncton e pouca produtividade primária.

A Plataforma Continental Leste (8°S-15°S) é influenciada pelas águas quentes e mornas vindas do leste e transportadas pela Corrente Equatorial do Sul, que se encontra com a Corrente do Brasil. Com exceção às áreas estuarinas, esta região é caracterizada por baixa produtividade primária. A região da Plataforma Central (15°S-23°S), entre Abrolhos, Bahia de Campos e Rio de Janeiro é caracterizada por uma combinação entre a Corrente de Água Tropical e Água Central do Atlântico Sul (ACAS), além da Água Costeira. Eventos de ressurgência acontecem entre as latitudes 21° e 23°S quando a ACAS penetra na plataforma interna e temperaturas de 16°C são observadas. A produtividade biológica total na região central é baixa, típica das regiões tropicais. Nesta região, entretanto, existem núcleos de alta produtividade biológica, associados aos bancos e montes submarinos da Cadeia Vitória-Trindade e Abrolhos (Matsuura, 1995). Além disso, a penetração da ACAS e dos vórtices frontais na região costeira determinam um grande aumento de produção primária na região de Cabo Frio (Brandini *et al.*, 1997; Castro & Miranda, 1998).

A região da Plataforma Continental Sudeste, localizada entre Cabo Frio e Cabo de Santa Marta (23°S-28°S) é caracterizada por movimentos ciclônicos da Corrente do Brasil que ocorrem acompanhando as mudanças abruptas da linha continental. Nessa região a Corrente do Brasil é composta por uma mistura entre as massas de água de origem continental e águas salinas de baixa concentração, ocorrentes devido à grande quantidade de estuários (Matsuura, 1995). A região é caracterizada por alta produtividade primária,

favorecendo a sobrevivência de larvas planctônicas e o desenvolvimento da cadeia trófica marinha (Pires-Vanin & Matsuura, 1993; Vazzoler *et al.*, 1999).

A Plataforma Brasileira Sul (28°S-34°S) recebe a influência da Corrente do Brasil e da Corrente das Malvinas na sua porção mais externa. Durante o inverno as águas superficiais são dominadas pela Água Subantártica, que segue em direção norte impulsionada pelas correntes vindas do Uruguai e Argentina. A região recebe ainda uma grande descarga de água doce originária da Lagoa dos Patos (Haimovici *et al.*, 1997).

Embora os ambientes marinhos sejam costumeiramente considerados homogêneos e sem barreiras físicas, uma breve observação da fisionomia da plataforma continental brasileira e de sua dinâmica de correntes revela uma vasta diversificação. As correntes marítimas oligotróficas provindas do Atlântico Oriental constituem-se nas principais determinantes abióticas da costa brasileira, sendo estas de baixíssima produtividade relativa. Contudo, os regimes de massas de água atuantes promovem distinções bastante significativas ao longo da costa, principalmente quanto à temperatura, salinidade e turbidez. Neste caso, características como a existência de um grande número de estuários, regiões coralinas e a ocorrência de áreas de ressurgência permitem o estabelecimento de núcleos de alta produtividade biológica, abrigando populações locais e altos níveis de biodiversidade.

1.4 Estrutura e variabilidade populacional

A identificação e manutenção de estoques diferenciados são fundamentais, principalmente para o setor pesqueiro, pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho & Hauser, 1994), sendo um dos objetivos básicos nos programas de controle e

conservação de espécies em perigo, bem como para a conservação da variabilidade genética (Lacy & Lindenmayer, 1995). Esta questão é especificamente relevante no ambiente marinho, onde as barreiras físicas parecem ser menos efetivas (Awise, 1994; Palumbi, 1994), sugerindo uma tendência à homogeneização genética dos ambientes e organismos (Ward *et al.*, 1995; Levy & Cassano, 1994; Bonhomme *et al.*, 2002). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes, pode estimular a sobre-exploração, reduzir ainda mais os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e eliminar estoques locais (Smith *et al.*, 1990; Kuusipalo, 1999).

Os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e estão sendo atualmente incorporados à atividades voltadas para a conservação de espécies, de forma prática e eficiente. Já há algum tempo, os padrões de DNA mitocondrial (mtDNA) e marcadores microssatélites vêm sendo reconhecidos como 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 através da identificação de haplótipos. (Bermingham e Martin, 1998; Patarnello *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

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 das populações destes peixes. (Duncan *et al.*, 2006) elaboraram um primeiro trabalho filogeográfico global para a espécie de tubarão *Sphyrna lewini*, no qual

observaram uma forte descontinuidade populacional entre os oceanos. No entanto, o baixo número amostral analisado não possibilitou a determinação de estruturas populacionais intra-oceânicas. Outro ponto importante levantado por estes mesmos autores foi a possibilidade da ocorrência de uma espécie críptica no gênero *Sphyrna* na amostra do Oceano Atlântico. Para o tubarão *C. limbatus* foi sugerida uma forte estruturação entre as populações do Atlântico Oeste (Golfo do México e Caribe) e populações do Atlântico Leste (África), oceanos Índico e Pacífico, com a existência de estoques reprodutores distintos (Kenney & Heist, 2006) desta espécie nestas regiões. No entanto, esta hipótese foi formulada com base em amostra com pequeno número de indivíduos capturados na costa africana (n=8) e, desta forma, os haplótipos que poderiam ser correspondentes aos haplótipos do Atlântico Ocidental simplesmente não teriam sido amostrados. Neste mesmo trabalho também foi sugerida uma possível incerteza taxonômica entre *C. limbatus* e *C. tilstoni*.

Utilizando uma amostragem global do tubarão *Galeorhinus galeus* (Chabot & Allen, 2009) revelaram a existência de estrutura populacional para indivíduos amostrados em diferentes oceanos, sem, contudo avaliar as populações de forma restrita a cada um dos oceanos. Na análise de amostragem global do tubarão-baleia *Rhincodon typus* não foram encontradas fortes restrições ao fluxo gênico entre os oceanos, tendo sido detectada apenas uma moderada diferenciação entre o Atlântico e o 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* a partir de amostras coletadas no Brasil, Bahamas (Atlântico Oeste) e Guiné Bissau (Atlântico Leste). Neste estudo ficou evidente a estruturação

nas comparações entre as porções do leste e oeste do Oceano Atlântico, bem como a existência de uma moderada diferenciação entre as amostras brasileiras coletadas no hemisfério sul e as amostras das Bahamas, coletadas no Caribe. E, de acordo com (Chapman *et al.*, 2009) em outro estudo realizado, *S. lewini* apresenta uma forte diferenciação no Atlântico, com estoques diferenciados para o Golfo do México, Caribe e América do Sul.

Nos últimos anos um considerável aumento da aplicação de marcadores moleculares de DNA tem sido observado na análise de problemas relativos à genética de populações e à sistemática. Neste sentido, o desenvolvimento de diversas técnicas de biologia molecular tem disponibilizado ferramentas para a detecção de variabilidade genética, viabilizando a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Sunnucks, 2000). O conhecimento sobre marcadores de DNA evoluiu do seu estado experimental e está atualmente sendo incorporado aos programas de conservação, de forma prática e eficiente. Já há algum tempo, marcadores moleculares tais como os microssatélites e sequências de DNA mitocondrial vêm tendo sua importância reconhecida nos estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris & Berg, 1987; Toledo Filho *et al.*, 1992), permitindo a distinção de populações geográficas com grande eficiência pela identificação de haplótipos. (Bermingham e Martin, 1998; Patarnello *et al.*, 2003; Perdices *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

As observações de que os haplótipos de DNA de populações de muitas espécies podem ser localizados geograficamente, introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avice *et al.*, 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos e no grau de divergências existentes

entre eles, (Avice, 2000) propõe e discute categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas. Neste contexto, os marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite tem sido amplamente empregados no estudo de populações de peixes com inferência sobre conservação e manejo de espécies, estudo de padrões de migração, diferenciação de estoques cultivados, evidências de introgressão genética, sistemas reprodutivos, efeitos de fragmentação de ambientes entre taxa de relacionados, etc (Waters *et al.*, 2000; Neraas & Spruell, 2001; Hoarau *et al.*, 2002; Kokinen *et al.*, 2002; Triantafyllidis *et al.*, 2002; Triantafyllidis *et al.*, 2002b; Filatre *et al.*, 2003; Narun *et al.*, 2004; Mães *et al.*, 2006).

Os marcadores do tipo microssatélite apresentam uma série de características desejáveis em estudos genéticos, por sua característica de caráter codominante, ou seja, permitem a distinção entre homozigotos e heterozigotos, sendo, portanto, altamente informativos (Powell, 1996). São multialélicos, devido ao processo recorrente de expansão e contração no número de unidades repetitivas ao longo das gerações, possibilitando a discriminação de indivíduos geneticamente distintos; são amplificados via PCR, com a utilização de um par de iniciadores específicos complementares às regiões flangeadoras, o que facilita sua obtenção mesmo com pouca quantidade de DNA; e uma vez desenvolvidos os iniciadores, que permitem amplificar tais regiões do genoma, estes podem ser compartilhados entre laboratórios para a realização de diversos estudos. Além disso, o resultado da amplificação via PCR revela o polimorfismo resultante da presença de

diferentes números de elementos simples repetidos na região microssatélite (Morgante & Olivieri, 1993; Ellegren, 2004; Grattapaglia & Kirsh, 2007).

O alto polimorfismo observado nesse tipo de marcador é decorrente das altas taxas de mutações presentes nas regiões microssatélites (Oliveira *et al.*, 2006). As taxas de mutação variam de loco para loco, sendo essa variação de cerca de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração, resultando em uma ampla variação no número de unidades repetidas (Ellegren, 2004). Por este motivo, os marcadores do tipo microssatélite são considerados altamente informativos em estudos genéticos de populações (Goldstein & Schlötterer, 2001; Oliveira *et al.*, 2008). São também amplamente utilizados na construção de mapas genéticos, na análise de paternidade e em estudos forenses (Zhao & Kochert, 1993; Ferdig & Su, 2000; Leoi, 2008; Melo *et al.*, 2008).

Os marcadores microssatélites são potencialmente polimórficos (Tautz, 1989; Weber *et al.*, 1990), uma vez que apresentam grande diversidade no tipo de unidades de repetição. Estes marcadores podem ser classificados como perfeitos quando a sequência repetida não é interrompida por outra base que não pertença ao motivo; imperfeitos, quando entre os motivos existem pares de bases que não correspondam aos mesmos; ou podem ser compostos, quando contêm duas sequências distintas repetidas de forma adjacente (Weber, 1990; Oliveira *et al.*, 2006).

A transferibilidade ou amplificação heteróloga dos iniciadores de regiões microssatélites entre espécies relacionadas é possível de ser realizada devido à homologia de sequências genômicas e está relacionada ao grau de conservação das sequências flangeadoras da região microssatélite e à distância taxonômica entre as espécies de interesse.

Assim, considera-se que a avaliação das condições de variabilidade genética existente nas populações do tubarão-azul na costa brasileira, analisadas com o uso de marcadores moleculares principalmente do tipo microsatélite, poderá resultar em informações que auxiliem no entendimento da distribuição de possíveis agrupamentos genéticos nesta espécie, além de fornecer subsídios para a formulação de instruções que permitam o manejo adequado e a estruturação de programas de conservação desta espécie.

2 Objetivos

Tendo em vista a problemática da exploração pesqueira intensiva que vem se desenvolvendo sobre certas espécies de tubarões da costa brasileira e a necessidade premente da proposição de ferramentas que permitam o estabelecimento de programas de manejo e conservação das espécies, o presente estudo abordou questões acerca da dinâmica das populações da espécie de tubarão-azul *Prionace glauca*, realizado com base em amostras colhidas de exemplares capturados pelas frotas pesqueiras ao longo da costa brasileira, utilizando marcadores moleculares do tipo microsatélites.

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

- desenvolver marcadores moleculares microsatélites a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas de amostras de *Prionace glauca* para auxiliar em avaliações genético-populacionais desta espécie;
- verificar se os diferentes agrupamentos de indivíduos encontrados constituem uma única população ou se existe estruturação genética, identificando as amostras capturadas oriundas do isolamento temporal causado pelos diferentes períodos reprodutivos;
- gerar informações para subsidiar programas de manejo adequado e exploração sustentável dos estoques pesqueiros de representantes do gênero *Prionace* na costa brasileira.

3 Metodologia

3.1 Material

3.1.1 Coleta das amostras

As amostras da espécie *Prionace glauca* foram coletadas nos locais de desembarque de frotas industriais e a bordo de pesqueiros que praticam a captura de tubarões e raias ao longo da costa brasileira. Durante as coletas foram extraídas amostras na forma de fragmentos de tecidos de nadadeiras e tecido muscular e preservadas em álcool 95%.

As amostras foram coletadas em localidades situadas nas proximidades da costa dos estados do Rio Grande do Sul (n=35); Rio Grande do Norte (n=30) e de São Paulo (n=35) (Figura 4), identificados morfológicamente segundo Gadig (2001). Alguns exemplares foram depositados na coleção do Laboratório de Pesquisa em Elasmobrânquios, UNESP de São Vicente, SP e os tecidos foram depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, de Botucatu, SP. Para o desenvolvimento dos microssatélites foi utilizado a população proveniente do Rio Grande do Norte.



Figura 4 - Mapa da localização dos pontos de coleta das amostras de tubarão-azul *Prionace glauca* analisadas. A marcação em vermelho se refere às amostras do Rio Grande do Sul; em amarelo as de São Paulo e em verde, do Rio Grande do Norte.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento dos Microsatélites

Foram desenvolvidos marcadores moleculares do tipo microsatélite para serem utilizados nas investigações da estrutura genética das populações do tubarão-azul *Prionace glauca*.

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular utilizando o protocolo de fenol/clorofórmio, segundo Sambrook e Russel (2001). Após a extração, obteve-se uma biblioteca enriquecida em microsatélites segundo

Billote *et al.*, (1999). Para tanto, foi feita uma digestão enzimática do DNA genômico com a enzima *Rsal*, sendo então ligados adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição e realizada uma pré-amplificação via PCR. Em seguida, os produtos obtidos foram purificados utilizando-se o Kit *Quiaquick PCR purification* (QIAGEN) e foi realizada uma seleção de fragmentos contendo microssatélites identificados através das *beads*, que constituem esferas magnéticas envolvidas por streptavidina (*Streptavidin Magnephere® Paramagnetic Particles* - PROMEGA) e purificação do DNA. O produto resultante da seleção de fragmentos contendo microssatélites foram amplificados para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade.

Após a amplificação, os fragmentos foram clonados com vetor pGEM-T (Promega) e transformados em *E. coli* XL1-Blue, sendo então os clones obtidos estocados e mantidos em freezer -70°C. Os clones positivos foram isolados no DNA plasmidial e posteriormente realizada uma PCR de sequenciamento.

As sequencias obtidas foram analisadas no programa Chromas, a fim de se buscar regiões de microssatélites. Depois da identificação dos fragmentos contendo microssatélites de interesse, foram desenhados os *primers* utilizando o programa Primer3.

A amplificação dos segmentos de DNA da região de microssatélite foi efetuada em ciclador térmico de PCR utilizando-se 12,5µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 100 ng de *primers* (F. 5'- CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG -3' e R. 5'- GGC TTA GCA AGG TGT CTT CTT GG - 3') e 1 unidade de enzima Taq Polymerase (Invitrogen). Cada ciclo de PCR se constituiu basicamente na denaturação inicial a 95°C por 4 minutos, denaturação (Ciclo) 95°C por 30 segundos, hibridação de acordo com a

descrição dos *primers* por 30 segundos e extensão a 72°C ou 68°C, dependendo da marca da Taq utilizada por 30 segundos, com 35 repetições e extensão final a 72°C ou 68°C por 1 minuto. Os produtos amplificados forem visualizados em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado com nitrato de Prata conforme o protocolo modificado de Bassan *et al.*, (1991), como segue:

1. misturar a solução fixadora (15ml de álcool etílico absoluto; 1 ml de ácido etílico) e 0,30g de nitrato de prata, deixar o gel mergulhado na solução por 20 minutos;
2. descartar a solução anterior e lavar rapidamente com água destilada para tirar o excesso da solução;
3. acrescentar a solução reveladora (10ml de Hidróxido de sódio a 5mM, 3ml de formaldeído) sobre o gel e observar até chegar a coloração desejada;
4. descartar o revelador e lavar o gel com água destilada;
5. prosseguir com foto-documentação do gel.

Após corados e fotografados, os géis foram analisados no programa Kodak Digital Science (Kodak). O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular de 10 pares de bases (Invitrogen).

3.2.2 Análise populacional

O DNA genômico foi extraído a partir dos fragmentos dos tecidos de nadadeiras ou muscular conservados em álcool 95%, utilizando o protocolo de Aljanabi & Martinez (1997) que propõem que sejam colocados em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, 290µl de tampão (30mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1%

SDS), 10µl de proteinase K (10mg/ml) e um fragmento de tecido do tamanho de ¼ de grão de arroz; colocar em banho Maria a 55°C por 2 – 3 horas e adicionar 100µl de NaCl (5M), invertendo os tubos para misturar o material. Em seguida, centrifugar o material a 10.000 rpm por 10 min a 25°C, remover para outro tubo cerca de 300µl do sobrenadante, adicionar 600µl de etanol 100% gelado e manter no freezer -70°C por 20 min. Em seguida, centrifugar por 30 min a 14.000 rpm ou 40 min a 12.000 rpm a 4°C, descartar o sobrenadante e adicionar 1ml de etanol 70%. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm, descartar o sobrenadante e secar por 30 min a 37°C ou deixar os tubos abertos em cima de um guardanapo dentro de uma gaveta de um dia para o outro. Finalmente, adicionar 200µl de água milli-Q autoclavada.

Na amplificação dos locos de microssatélites foi utilizado o protocolo descrito no tópico anterior. Além dos *primers* microssatélites desenvolvidos para a espécie *Prionace glauca*, foram também testados 6 *primers* da espécie *Rhinobatos horkelli* relacionados na Tabela 1.

3.2.3. Análises Inter e Intrapopulacional.

As análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas com o uso do programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). O número e a riqueza de alelos foram estimados através do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet *et al.*, 2002).

Os parâmetros coeficiente de endogamia (F_{is}), desequilíbrio de ligação, diferenciação populacional alélica e genotípica (teste Exato de Fisher) e frequência de alelos nulos foram estimados através do programa Genepop v. 4.0 (Rousset, 2007).

Tabela 1 - Primers de microssatélites da espécie *Rhinobatos horkelli** utilizados.

Lócus	Repetições	Primers (5'-3')	T_a (°C)	Tamanho do alelo (pb)
B12	(AC) ₄₀	R:GTAGCAATGGGGACTTGA F:CTCTCTCTCACACACACACA	53	263
A2	(GT) ₃₂	F: GGACTAACGTGTGTGTGTGT R: GACATCCAACCCCACTCT	54	167
A4	(GA) ₉	F: GCGTGGACTAACTTGCTATC R: GTACACCTTGACCTTGCTGT	51	157
A7	(TG) ₅₀ (AG) ₁₄	F: TATCGGCAGCTAGATTGG R: CTCTCTCTCCCTGTCTTCCT	50	179
A9	(TC) ₂₄ (AC) ₄₄	F: CTGTGTGCTTGTGAGGTGT R: GGCTTATCTGTGAGTTCCAC	55	168
C5	(AG) ₁₄	F: TGTGTCGGTGTATCTGAGAG R: TGGATTTGTCAGGACTGG	51	153
C7	(AC) ₃₂	F: ACTAGCGTGGGAACATACAC R: ATGAGAGGACAGAGGAAAC	50	191
E4	(AC) ₄₂	F: GGGTGAGATACACACACACA R: ACAGCATGGTAGTCAGATCC	54	201

* Ferreira e Ferrette (em preparação)

As distâncias genéticas de Nei (1978) e *chord* de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) foram calculadas através do programa MSA 4.05 (Dieringer & Schlotterer, 2003). A determinação do número populacional mais provável para o conjunto de dados amostrados e o teste de atribuição a essas populações foi realizado através da análise bayesiana implementada no programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), sendo que o número de populações K foi estimado com modelo de ancestralidade não misturada, com os alelos não relacionados. Para cadeias de Monte Carlo Markov (MCMC) foram usadas 500.000 simulações e 100.000 gerações de "burn-in" foram usadas para cada valor de K, para permitir uma máxima resolução nas separações das populações. Os demogramas construídos com valores de distância foram

obtidos através do método UPGMA pelo programa Neighbor, implementado no pacote computacional Phylip 3.6 (Felseinstein, 2005).

4 Resultados

4.1 Caracterização dos primers de microsatellite

Na prospecção de *primers* microsatélites de tubarão-azul *Prionace glauca*, foram utilizadas amostras de 35 indivíduos de uma população proveniente do Rio Grande do Sul, capturados em entre as latitudes 30°5' e 33°08' da costa brasileira. Foram obtidos segmentos de DNA contendo sequências microsatélites em aproximadamente 96 clones. Destes, 48 foram sequenciados, sendo que somente 15 apresentaram boas sequências flanqueadoras à região microsatélite (Tabela 2).

Entre os 15 *primers* analisados, três não apresentaram bandas de amplificação, cinco foram monomórficos e sete apresentaram-se altamente polimórficos. Os *primers* polimórficos foram TB01, onde 27 indivíduos apresentaram amplificação e o número de alelos identificado foi 13; para TB02 27 indivíduos apresentaram amplificação, sendo identificados 15 alelos; TB04 com 31 amostras amplificadas e 8 alelos; TB08 com 29 amplificações e 19 alelos; TB13 com 27 amplificações e 7 alelos; e TB15, com 30 amostras amplificadas e 11 alelos. Os sete loci polimórficos apresentaram de 7 a 22 alelos por locus (média=13,5).

Tabela 2 - Primers microsatélites desenvolvidos para o tubarão-azul *Prionace glauca*. Ta, temperatura de anelamento; n, tamanho da amostra; A, número de alelos; Ho, heterozigiosidade observada; He, heterozigiosidade esperada. Hardy-Weinberg (EHW); NS, não significativo, * P <0,05, ** P <0,01. Número de alelos e heterozigiosidade foram calculados utilizando o programa 2.0 Cervus (Marshall et al. 1998) e os testes de equilíbrio Hardy-Weinberg foram realizados utilizando Genepop, opção 1, suboption 3 (Raymond & Rousset, 1995).

Locus	Repetições	Primer (5'-3')	T _a (°C)	Tamanho do alelo (pb)				n	A	H _o	H _e	HWE	F _{is}	Número de acesso
TB01	(GA) ₉	F: TTGGTTGGGAAGAAGACTA R: GGAATATAGACCTGTAAACCA	50	150				34	13	0.4444	0.8477	*	0.4658	GQ845157
TB02	(GT) ₁₄	F: TGCATTAAATCACCACAATC R: GCCTAGGCTTAAAACTCCA	50	218				37	15	0.8710	0.8847	NS	-0.0006	GQ845158
TB04	(CT) ₈	F: ATGATCAAACTTAAACTGGGTGTC R: AGAAAGCTGGCATCTGGTAGAAA	50	131				38	8	0.6552	0.7822	**	0.1477	GQ845159
TB08	(TG) ₁₆ AGGAA (GA) ₂ CA(GA) ₅	F: TGTTGGATAGCAGCAGAC R: ATCACCATAAGCTCAGC	51	191				31	19	0.9333	0.9390	**	-0.0108	GQ845163
TB10	(CA) ₇	R: GGCAGCGTTTTCATCAAG F: GGGGTACGGGTCCACAC	56	167				40	22	0.4815	0.9231	**	0.4686	GQ845170
TB13	(TG) ₆	F: ATGGGGTCAAGAAGCAGAGAA R: ACTTATCCACCCACCACATC	50	155				40	7	0.4074	0.7170	**	0.4211	GQ845166
TB15	(CA) ₅ TACG(CA) ₄	F: ATTTTAGGATGGCAGGTG R: TGTGCTGCATATGTTTATT	51	310				40	11	0.2963	0.8784	**	0.6563	GQ845168
TB05	(AC) ₇ G(CA) ₄	F: TCCATACATACCAACAGAA R: GAACACAGCGGAATCAA	50	237				38	1	-	-	-	-	GQ845160
TB06	(GT) ₁₀	F: TGGGTGGATGTATCTCAAGGAC R: CATCCATGCCACATTCATCAG	55	168				37	1	-	-	-	-	GQ845161
TB07	(GT) ₅ (GA) ₅	F: AGATAAATGGAGGCTCAGACTG R: TTATCATTTACATTTGCCATCC	53	170				37	1	-	-	-	-	GQ845162

TB09	(TG) ₈	F: AGAACCTGGGCAGAACATCA R: CGTGACTTAGCAATGAGTCG	51	215	40	1	-	-	-	-	-	GQ845164
TB11	(GA) ₅	F: CTTGGGAAGAAAAAGTTGACCTT R: TAAACCGACTAATTTCTCCCTCTC	50	179	40	1	-	-	-	-	-	GQ845165
TB14	(GT) ₈	F: CCAAGTCACATGTAGACGGTATC R: TGGGGAGTGAGAAACACAGGTGA	54	160	38	1	-	-	-	-	-	GQ845167
TB16	(TG) ₅	F: GGCATCCTGAGATCATGAAAG R: TTAGGAAAGGGAAGGGCTT	53	270	32	1	-	-	-	-	-	GQ845169



Figura 5 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB15 em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.



Figura 6 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB04, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.

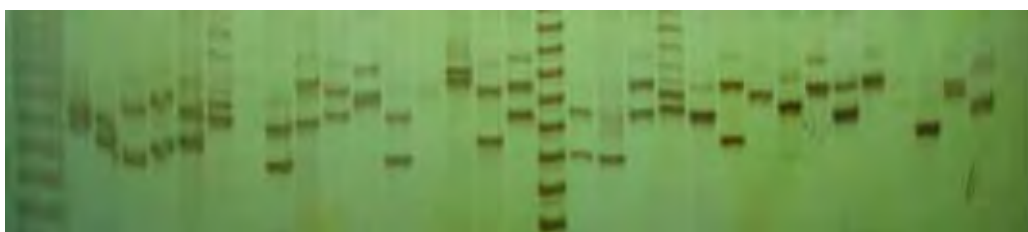


Figura 7 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB08, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.



Figura 8 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB01, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.



Figura 9 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB02, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.

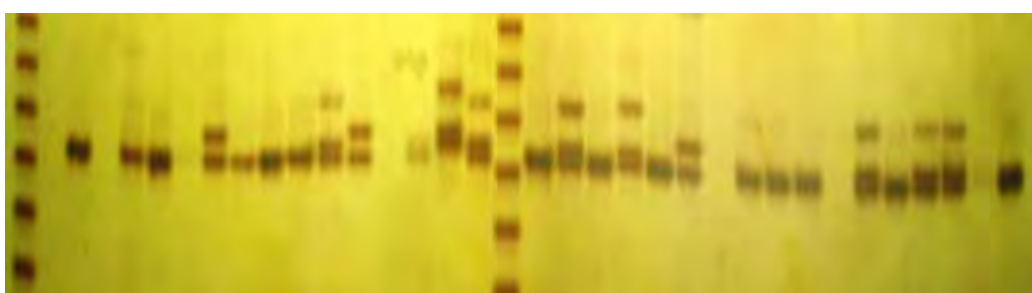


Figura 10 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB13, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.



Figura 11 - Gel de poliacrilamida polimorfo usando o *primer* TB10, em amostras do tubarão-azul *Prionace glauca* obtidas no Rio Grande do Sul.

4.2 Análise populacional

4.2.1 Análise intrapopulacional e variação dos microssatélites

Os oitos locos polimórficos identificados em *Prionace glauca* foram utilizados nas análises das amostras desta espécie provenientes das regiões de Rio Grande do Norte, São Paulo e Rio Grande do Sul, tendo sido verificado que:

Nos indivíduos da população da região do Rio Grande do Sul, o *primer* TB01 revelou a presença de bandas de amplificação em 27 indivíduos, com a observação de 13 alelos; *primer* TB02 - presença bandas de amplificação em 27 indivíduos com 15 alelos encontrados; TB04 - presença bandas de amplificação em 31 indivíduos com 8 alelos encontrados; TB08 - presença bandas de amplificação em 29 indivíduos com 19 alelos encontrados; TB10 - presença bandas de amplificação em 28 indivíduos com 22 alelos encontrados; TB13 - presença bandas de amplificação em 27 indivíduos com 7alelos encontrados; TB15 - presença bandas de amplificação em 30 indivíduos com 11 alelos encontrados; e B12 – com a presença bandas de amplificação em 25 indivíduos com 14 alelos encontrados. Os oitos locos polimórficos apresentaram de 7 a 22 alelos por locus (média=13,5) e heterozigosidade esperada (H_e) variando de 0,72 a 0,93. O índice de endogamia (F_{is}) variou de - 0,01 a 0,65 e sete dos oitos locos analisados apresentaram desvio significativo do HWE (Tabela 3).

Na população da região do Rio Grande do Norte o *primer* TB01 revelou a presença bandas de amplificação em 30 indivíduos com 24 alelos encontrados; TB02 - presença bandas de amplificação em 24 indivíduos com 15 alelos encontrados; TB04 - presença bandas de amplificação em 29

indivíduos com 19 alelos encontrados; TB08 - presença bandas de amplificação em 27 indivíduos com 24 alelos encontrados; TB10 - presença bandas de amplificação em 30 indivíduos com 25 alelos encontrados; TB13 - presença bandas de amplificação em 28 indivíduos com 9 alelos encontrados; TB15 - presença bandas de amplificação em 30 indivíduos com 12 alelos encontrados; e B12 - com a presença bandas de amplificação em 27 indivíduos com 15 alelos encontrados. Nesta população observou-se de 9 a 24 alelos por locus (média=19,37) e heterozigosidade esperada (H_e) variando de 0.7506 a 0.9630. O índice de endogamia (F_{is}) variou de 0,1124 a 0,6609 e os oito locos analisados apresentaram desvio significativo do HWE (Tabela 4).

Para as amostras obtidas na região de São Paulo obtiveram-se padrões de amplificação para os *primers* conforme segue: TB01 - presença bandas de amplificação em 28 indivíduos com 21 alelos encontrados; TB02 - presença bandas de amplificação em 27 indivíduos com 24 alelos encontrados; TB04 - presença bandas de amplificação em 30 indivíduos com 11 alelos encontrados; TB08 - presença bandas de amplificação em 22 indivíduos com 23 alelos encontrados; TB10 - presença bandas de amplificação em 24 indivíduos com 23 alelos encontrados; TB13 - presença bandas de amplificação em 26 indivíduos com 13 alelos encontrados; TB15 - presença bandas de amplificação em 24 indivíduos com 15 alelos encontrados; e B12 - com a presença bandas de amplificação em 28 indivíduos com 18 alelos encontrados.

De modo geral esta população apresentou de 11 a 24 alelos por locus (media =18,5) e a heterozigosidade esperada (H_e) de 0,1786 a 0,7143. O índice de endogamia (F_{is}) variou de 0,1955 a 0,7838, sendo que todos os locos apresentaram desvio significativo do HWE (Tabela 5).

Tabela 3 - Análise dos locos microssatélites polimórficos identificados em *Prionace glauca* nas amostras da população do Rio Grande do Sul. Ta - temperatura de anelamento; n - tamanho da amostra; A - número de alelos; H_O - heterozigosidade observada; H_E - heterozigosidade esperada. Hardy-Weinberg (EHW); NS - não significativo, * P <0,05, ** P <0,01.

Locus	T _a (°C)	n	A	H _O	H _E	HWE	F _{is}
TB01	50	27	13	0.4444	0.8477	*	0.4658
TB02	50	27	15	0.8710	0.8847	NS	-0.0006
TB04	50	31	8	0.6552	0.7822	**	0.1477
TB08	51	29	19	0.9333	0.9390	**	-0.0108
TB10	56	28	22	0.4815	0.9231	**	0.4686
B12	53	25	14	0.6667	0.9202	**	0.2601
TB13	50	27	7	0.4074	0.7170	**	0.4211
TB15	51	30	11	0.2963	0.8784	**	0.6563

Tabela 4 - Análise dos locos microssatélites polimórficos identificados em *Prionace glauca* nas amostras da população do Rio Grande do Norte. Ta - temperatura de anelamento; n - tamanho da amostra; A - número de alelos; H_O - heterozigosidade observada; H_E - heterozigosidade esperada. Hardy-Weinberg (EHW); NS - não significativo, * P <0,05, ** P <0,01.

Locus	T _a (°C)	n	A	H _O	H _E	HWE	F _{is}
TB01	50	30	24	0.8333	0.9548	**	0,1124
TB02	50	24	24	0.6667	0.9601	**	0,2909
TB04	50	29	19	0.7586	0.9335	**	0,1730
TB08	51	27	24	0.6667	0.9630	**	0,2946
TB10	56	30	25	0.4333	0.9452	**	0,5338
B12	53	24	18	0.4583	0.9087	**	0,4849
TB13	50	28	9	0.2500	0.7506	**	0,6609
TB15	51	30	12	0.3929	0.8740	**	0,5423

Tabela 5 - Análise dos locos microssatélites polimórficos identificados em *Prionace glauca* nas amostras da população da região de São Paulo. Ta - temperatura de anelamento; n - tamanho da amostra; A - número de alelos; H_O - heterozigosidade

observada; H_E - heterozigosidade esperada. Hardy-Weinberg (EHW); NS - não significativo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Locus	$T_a(^{\circ}\text{C})$	n	A	H_o	H_E	HWE	F_{is}
TB01	50	28	21	0,2857	0,7143	**	0,2292
TB02	50	27	24	0,3333	0,6667	**	0,2921
TB04	50	30	11	0,5333	0,4667	**	0,4437
TB08	51	22	23	0,3182	0,6818	**	0,2707
TB10	56	24	23	0,2500	0,7500	**	0,1955
B12	53	28	18	0,3750	0,6250	**	0,3220
TB13	50	26	13	0,8214	0,1786	**	0,7838
TB15	51	24	15	0,7308	0,2692	**	0,7226

4.2.2 Análise interpopulacional

Nas análises entre as três populações foi constatado um total de 236 alelos por locos, com a média de 29,5 alelos; a heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,8713 a 0,9618, apresentando a média de 0,9340, enquanto a heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,2651 a 0,7692, com a media de 0,5659. Todas as populações se apresentaram em desequilíbrio de HWE (Tabela 6).

A diferenciação genética identificada entre as populações estimada pelo índice F_{ST} para todos os locos e para todos os pares de populações apresentou valores moderados, variando de 0.0148 a 0.1331, com a média de 0.0506 e valores de p altamente significativos ($p < 0,05$), indicando a ocorrência de diferenciação genética entre as populações de *Prionace glauca* analisadas (Tabela 7). O índice de R_{ST} estimado para todos os locos e para todos os pares de populações apresentou valores variando de 0.0774 a 0.2667 e valores de p significativos ($p < 0,05$) para as oito comparações realizadas (Tabela 8).

A Análise Hierárquica de Variação Molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) foi obtida considerando-se todas as populações em um mesmo grupo e divididas em dois grupos distintos nos quais as populações foram agrupadas de acordo com a região geográfica e seguindo o padrão apresentado pelo dendograma para as populações. O método de AMOVA permite ainda a utilização de ambos os índices, F_{ST} e R_{ST} , os quais foram utilizados neste trabalho.

Quando se considera todas as populações em um mesmo grupo, a maior parte da variabilidade foi encontrada dentro das populações com valores de 94,54% para F_{ST} e 81,04% para R_{ST} . A variabilidade entre as populações apresentou valores de 5,46% em F_{ST} e 18,96% em R_{ST} as quais foram altamente significativas ($p < 0,0001$) indicando estruturação nas populações de *P. glauca*.

O fluxo gênico para todos os locos entre todas as populações foi estimado em $Nm = 4,69$ migrantes por geração de acordo com Nei (1987) indicando a existência de fluxo gênico entre as populações.

Tabela 6 - Resultados obtidos da análise das três populações de tubarão-azul *Prionace glauca*. Ta - temperatura de anelamento; n - tamanho da amostra; NE - número de alelos efetivos; A - número de alelos; H_O - heterozigosidade observada; H_E - heterozigosidade esperada. Hardy-Weinberg (EHW); NS - não significativo, * P <0,05, ** P <0,01; F_{ST} - índice de fixação (P < 0,00001).

Lócus	Ta (°C)	N	ne	A	H _O	H _E	HWE	Fis	Fit	F _{ST}
TB01	50	85	18,3143	37	0,6706	0,9510	**	0,2613	0,2967	0,0479
TB02	50	78	22,5333	41	0,7308	0,9618	**	0,2137	0,2384	0,0315
TB04	50	90	11,9381	24	0,6333	0,9214	**	0,2459	0,3088	0,0834
TB08	51	78	21,6512	36	0,7692	0,9600	**	0,1855	0,2034	0,0220
TB10	56	81	18,5601	32	0,5432	0,9520	**	0,3985	0,4130	0,0242
TB13	50	83	7,4637	23	0,3452	0,8713	**	0,6450	0,6922	0,1331
TB15	51	84	13,3510	23	0,5694	0,9306	**	0,6087	0,6302	0,0551
B12	53	72	12,1263	20	0,2651	0,9240	**	0,3700	0,3794	0,0148
Média			15,7423	29,50	0,5659	0,9340		0,3590	0,3914	0,0506

Tabela 7 - Diferenciação genética (F_{ST}) entre pares de populações de tubarão-azul *Prionace glauca* para todos os locos.

	RS	RN	SP
RS	00000		
RN	0,06669	000000	
SP	0,04475	0,05175	00000

Tabela 8 - Diferenciação genética (R_{ST}) entre pares de populações de tubarão-azul *Prionace glauca* para todos os locos.

	RS	RN	SP
RS	00000		
RN	0,07741	000000	
SP	0,26670	0,21037	00000

Tabela 9 - Análise AMOVA considerando todas as populações em um mesmo grupo utilizando o índice F_{ST} .

Fonte da variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	4	24,610	0,15265 Va	5.46
Dentro das populações	187	494,616	2.64500 Vb	94.54
Total	189	519,226	2.79765	
Índice de fixação F_{ST} : 0.05456				

Tabela 10 - Análise AMOVA considerando todas as populações em um mesmo grupo utilizando o índice R_{ST} ,

Fonte da variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	4	7707.600	57.04475 Va	18.96
Dentro das populações	187	45584.642	243.76814 Vb	81.04
Total	189	53292.242	300.81289	

Índice de fixação R_{ST} : 0.18964

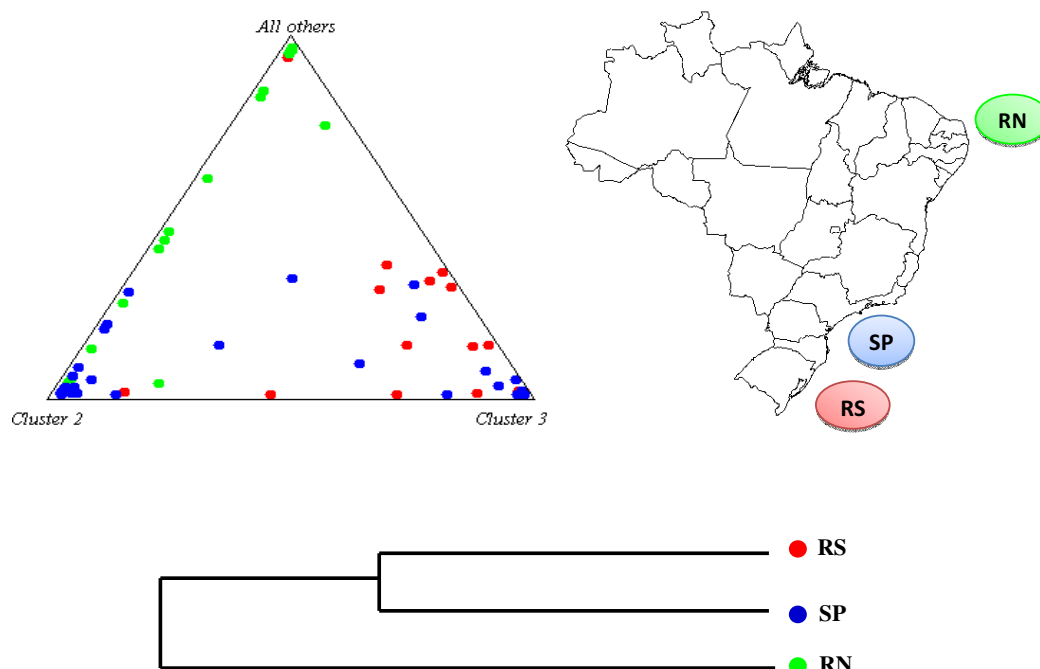


Figura 12 - *Triangle plot* obtido pela aplicação do programa Structure 2.2, representando as atribuições dos genótipos para cada população e dendrograma gerado a partir da distância de Nei(1978) através do método UPGMA. População da região do Rio Grande do Sul (vermelho); da região de São Paulo (azul); e da região do Rio Grande do Norte (verde).

A análise bayesiana realizada para avaliar os níveis de variação entre as populações e fluxo gênico entre elas confirmam a existência de estruturação populacional moderada para as amostras de *Prionace glauca* nas três amostras analisadas, como mostram na Figura 12 o “Triangle plot” gerado no Structure 2.2 e o dendograma baseado na distância de Nei (1978) obtido pelo método UPGMA. Nestes elementos gráficos pode ser identificada a formação de um agrupamento contendo representantes das populações da região do Rio Grande do Sul e da região de São Paulo, e outro contendo os representantes da região do Rio Grande do Norte, identificados claramente no cladograma.

5 Discussão

5.1 Caracterização dos primers microssatélites

Entre os 15 pares de *primers* desenvolvidos especificamente para o tubarão-azul *Prionace glauca*, oito locos foram altamente polimórficos e oito foram monomórficos. O número de alelos em cada loco, a heterozigosidade observada e esperada, o coeficiente de endogamia (F_{is}) e o desequilíbrio de Hardy-Weinberg (WHE), calculados pelo Genepop, apresentaram de 7 a 22 alelos/lócus com média de 13.5 e heterozigosidade média esperada de 0,8615. Seis dos sete loci polimórficos apresentaram desvios de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$), que podem ser resultado da presença de alelos nulos ou ao sistema de acasalamento ou ainda a efeitos da endogamia (Hoarau et. al., 2002).

A análise das características genéticas revelou que a quantidade de locos polimórficos e o número de alelos por loco se apresentaram relativamente baixos, considerando que locos microssatélites são potencialmente multialélicos (Brondani et al., 1998; Goldstein & Schlötterer, 1999; Ellegren, 2004). Em trabalhos de prospecção de microssatélites para espécies de tubarões também foi constatada a existência de um número razoável de regiões genômicas repetitivas e na grande maioria dos microssatélites identificados ficou caracterizada a ausência de polimorfismos populacionais (Heist & Gold 1999; Feldhein et al., 2001; Feldhein et al., 2007). Contudo, os locos microssatélites polimórficos identificados apresentaram altos níveis de resolução em análises de estruturação genética para diversas espécies de tubarões. Assim, considera-se que os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho também são úteis na avaliação de estoques

pesqueiros, podendo fornecer importantes informações para a gestão da pesca de *P. glauca*.

As análises utilizando os *primers* desenvolvidos para o tubarão *P. glauca* e os *primers* heterólogos desenvolvidos para o gênero *Rhinobatos* revelaram alto grau de polimorfismo (média de alelos= 29,50), consistente com a média de alelos observados em outras espécies de peixes (De Woody & Avise, 2000). O desvio significativo do equilíbrio de HWE ($P < 0,05$) apresentado entre os locos nas três populações analisadas pode ter ocorrido devido ao déficit de heterozigotos revelados pelo índice de endogamia F_{is} , onde os valores variam de -1 a +1 e no qual os valores negativos indicam que há excesso de heterozigotos e valores positivos indicam que há déficit de heterozigotos (Wright, 1978), (Tabelas 3, 4 e 5).

Uma das possíveis causas do déficit de heterozigotos poderia estar relacionada a presença de alelos nulos, sendo sua frequência comum em locos de microssatélites (Callen *et al.*, 1993; O'Connell & Wrigth, 1997). Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese de que uma causa provável da ocorrência de alelos nulos poderia ser a baixa eficiência de hibridação do *primer* utilizado para amplificação do loco microssatélite, devido à ocorrência de uma mutação simples em um ou em ambos os sítios de ligação desse *primer* (Callen *et al.*, 1993; Dakin & Avise, 2004).

Do mesmo modo, o baixo índice de heterozigotos encontrado e desvio significativo dos valores de HWE identificado nas análises poderia estar relacionado ao efeito de outras variáveis como endogamia e seleção atuando sobre os locos analisados, o que levaria à queda na riqueza alélica. No

entanto, tais resultados permitem apenas uma suposição das possíveis causas para o desvio de HWE encontrado.

5.2 Análise populacional

Os oitos locos polimorfos utilizados no presente trabalho revelaram a existência de estruturação gênica moderada entre as três populações analisadas. Segundo Wright (1978), valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 seriam indicativos de uma baixa estruturação; valores entre 0,05 a 0,15 indicariam uma estruturação moderada; valores entre 0,15 a 0,25 corresponderiam a níveis de estruturação genética alta e valores acima de 0,25 indicariam forte estruturação genética, podendo estar relacionados à distinção entre espécies, em casos extremos. Para a espécie *P. glauca* os índices de F_{ST} mostraram-se altamente significativos e relacionados a uma diferenciação genética correspondente à de estruturação populacional, com a existência de um nível de fluxo gênico moderado entre populações das três localidades estudadas (0,0447 a 0,0666; $p > 0,05$). Nas análises utilizando o índice R_{ST} (0,0774 a 0,2667) foi encontrado um espectro maior de diferenciação populacional. Neste caso poderia ser considerada a existência de diferenças nos modelos de mutação para justificar a diferenciação encontrada.

Enquanto o índice F_{ST} baseia-se no modelo de mutação de alelos infinitos (IAM), o índice de R_{ST} baseia-se no modelo de mutação *stepwise* (SMM). Mais frequentemente, o modelo *stepwise* é utilizado em estudos utilizando marcadores microssatélites, enquanto o modelo de mutação de alelos infinitos é aplicado com maior recorrência em análises de sequências de DNA. De modo geral espera-se obter índices de R_{ST} maiores do que os índices

de F_{ST} (Slatkin, 1995). A análise hierárquica de variação molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) mostrou existir diferenciação entre as populações de *P. glauca* analisadas quando utilizados ambos os índices (F_{ST} – IAM e R_{ST} - SMM) e para ambas as formas de agrupamento das populações (um único grupo e divididas em dois grupos), indicando assim, de modo mais incisivo, a existência de estruturação genética nestas populações (Tabelas 9 e 10).

O índice de fluxo gênico constatado para todos os locos foi de 4,69 integrantes por geração. Segundo Nei (1987), valores de Nm acima de 1 indicam que o fluxo gênico constituiria um fator atuante para a diferenciação genética entre as populações. Porém, os resultados denotam que as populações de *P. glauca* analisadas estão geneticamente estruturadas, ainda que com baixos níveis, e que o valor do fluxo corresponde a um nível efetivo de migrações com cruzamentos interpopulacionais. O fluxo gênico, mesmo entre populações geograficamente distantes, pode ser mais bem compreendido pela observação das taxas de migração da espécie.

Na análise realizada utilizando o programa Structure 2.2 foi gerado o *Triangle plot* que demonstra visualmente as relações geográficas entre as populações, denotando a estruturação genética pelo distanciamento dos haplótipos, bem como a existência de fluxo gênico entre os haplótipos compartilhados geograficamente. O dendograma elaborado a partir da distância de Nei (1978) para verificar as relações existentes entre as populações indica, de modo incisivo, a formação de um grupo formado pelos indivíduos capturados na região do Rio Grande do Sul e de São Paulo e outro constituído pela população da região do Rio Grande do Norte. Tal resultado já era esperado uma vez que, em linhas gerais, a sequência dos eventos e

processos que conformam o ciclo reprodutivo do tubarão-azul no Oceano Atlântico segue um padrão anual e a distribuição espacial desses eventos apresenta limites latitudinais.

Para a espécie *P. glauca* a cópula deve ocorrer principalmente na região entre latitudes 20° e 35°S, no período de setembro a dezembro; a ovulação e o desenvolvimento inicial dos embriões até o CF de 25 cm, ocorre entre as latitudes 0° e 35°S, no período de janeiro a julho, após o qual as fêmeas migram em direção ao sul, abandonando a região equatorial e se concentrando na região entre as latitudes 25° e 35°S, para completar a gestação na segunda metade do ano (Hazin *et al.*, 2000). No nordeste do Brasil o parto nesta espécie acontece em latitudes superiores a 30°S, principalmente ao sul de 35°S no período entre os meses de setembro e dezembro. Hazin *et al.*, (2000) reconhecem, contudo, que o parto não deve ocorrer nessa região, pois a escassez de fêmeas de julho a dezembro sugere uma possível migração para o Golfo de Guiné, na costa africana. Este fato é corroborado por Castro e Mejuto (1995) que relacionaram o aumento no tamanho médio dos embriões de acordo com a longitude, sugerindo que as fêmeas grávidas estariam migrando em direção leste nos meses de junho a agosto. Estes autores, entretanto, não especificam se as amostras foram obtidas durante esses três meses em todas as faixas de longitude.

Dados sobre a pesca realizada ao longo dos três meses na direção oeste-leste (Hazin *et al.*, 1994b; 2000), no sudeste e sul do Brasil (Amorim, 1992; Amorim *et al.*, 1998; Vooren, 1999; Legat, 2001; Azevedo, 2003) e no Golfo de Guiné (Castro e Mejuto, 1995), parecem indicar que a distribuição sazonal e espacial das fases do ciclo reprodutivo de *P. glauca* abrangem toda a

bacia oceânica do Atlântico Sul, entre 0° e 40°S (Fig. 2.17b), como também ocorre nos oceanos Atlântico Norte e Pacífico Norte (Nakano, 1994; Kohler *et al.*, 1998). Assim, a cópula ocorreria no Sudeste e Sul do Brasil na primavera e início do verão, de outubro a janeiro. Após isso as fêmeas migram em direção norte, à procura de águas tropicais favoráveis ao desenvolvimento inicial dos embriões, permanecendo na região equatorial até o final do inverno (Hazin *et al.*, 1994b; Castro e Mejuto, 1995), quando iniciam a migração em direção sul, chegando à faixa latitudinal do sul do Brasil (Lat < 25°S) a partir de setembro e outubro em estado avançado de gestação, com embriões próximos ao tamanho de nascimento (CF = 40 cm). O parto ocorreria no período de setembro a dezembro, ao sul de 33 °S, em região ainda desconhecida.

A posição latitudinal da área de criação, onde se concentram os jovens-do-ano de ambos os sexos e machos juvenis, é dependente da massa de água subtropical, (Água Central do Atlântico Sul – ACAS), que apresenta temperaturas de 16 a 18°C, formada pela convergência entre a corrente do Brasil, com água tropical que flui em direção sul e a corrente das Malvinas, que se caracteriza como massa de água subantártica que flui em direção norte (García, 1997).

Os empreendimentos visando à conservação de espécies e populações devem ser empregados de forma a se conseguir, além da preservação dos elementos biológicos no ambiente, também a adoção de medidas de manejo adequado. Nesse aspecto, trabalhos que indiquem o que deve ou não ser conservado, bem como os procedimentos que devem ser utilizados nesta atividade, são fundamentais. Os resultados da análise das amostras referentes às populações da espécie de tubarão-azul *Prionace glauca*, representando três

pontos de captura próximos à costa brasileira, mostram que estas se apresentam estruturadas geneticamente, ou seja, a diversidade genética encontrada nos exemplares das três amostras se apresenta determinante da existência de agrupamentos diferenciados entre si. Ainda que de modo pouco incisivo, as populações da região do Rio Grande do Sul e de São Paulo podem ser agrupadas, com diferença demonstrada em relação à população da região do Rio Grande do Norte. Dessa forma, para manter a variabilidade genética nessa espécie pode-se propor, com base nestes resultados, que as atividades de conservação identifiquem a população do Rio Grande do Norte de forma independente às das regiões do Rio Grande do Sul e de São Paulo, que mantém certa identidade.

Mesmo para a espécie estudada, estudos posteriores podem indicar a necessidade de ampliar a abrangência do processo de conservação. Como o tamanho das populações obedece a um processo dinâmico de sustentação, há a necessidade também do controle de outros fatores como aqueles determinados pela pesca nestas regiões, para que a variabilidade genética existente seja mantida. Porém, como são questionáveis os esforços empregados para conservar a variabilidade neutra, identificada pelos marcadores moleculares aqui empregados, do tipo microssatélite, são fundamentais estudos que indiquem a variabilidade adaptativa e também a capacidade de suporte da pesca nestas regiões, para saber se é possível manter o tamanho populacional efetivo que garanta a diversidade genética.

Considera-se, pois, que os resultados obtidos neste trabalho, com a caracterização da estrutura populacional de *P. glauca* em pontos diferentes da

costa brasileira poderá servir de auxílio para o estabelecimento de planos de manejo e de conservação da espécie.

6 Referências

- Amorim, A. F. (1992). Estudo da biologia, pesca e reprodução do cação azul, *Prionace glauca* L. 1758, capturado no sudeste e sul do Brasil. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. Brazil, 176 p.
- Avice, J.C. (2000). Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice, J.C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.
- Avice, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Bermingham, E., Martin, A.P. (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.
- Billot N., Lagoda P.J.L., Risterucci A. M., Baurena F.C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR marked in tropical crops. *Fruits* v. 54 (4) 277-288.
- Bonfil, R. (1994). Overview of word elasmobranch fisheries. *FAO Fisheries Technical Paper*, Nº 341.
- Brandini, F.P.; Lopes, P.M.; Gtseit, K.S.; Spach, H.L. & Sassi, R. (1998). Planctonologia na plataforma continental do Brasil: Diagnose, e revisão bibliográfica. Programa REVIZEE/MMA/CIRM/FEMAR, 196p.

Bonhomme, F.; Naciri, M.; Bahri-Sfar, L.; Lemaire, C. (2002). Comparative analysis of genetic structure of 2 species of marine fish *Dicentrarchus labrax* and *Dicentrarchus punctatus*. C R Biol 325:213-20

Camhi, M.; Fowler, S.; Musick, J.; Brautigam, F. S. (1998). Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, no. 20. 39p.

Carey, F. G. and Scharold, J. A. (1990). Movements of blue sharks in depth and course. Mar. Biol., 109: 329-342.

Carvalho, G.R.; Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Ver. Fish Biol. Fish. 4: 326-350.

Castro, A.L.F.; Stewart, B.S.; Wilson, S.G. (2007). Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). Molecular Ecology, 16, 5183–5192.

Castro, J. I.; Woodley, C. M. & Brudek, R. L. (1999). A preliminary evaluation of the status of shark species. FAO Fisheries Technical Paper, 380: 1 - 72.

Castro, B.M.; Miranda, L.B. de. (1998). Physical oceanography of the western Atlântic Continental Shelf located between 40N and 34oS coastal segment (4,W). In: Robinson, A. R. & Brink, K. H. The Sea, 11:209-251.

Castro, J.I. (1987). The Position of Sharks in Marine Biological Communities An Overview. In: Cook, S. (edit.). Sharks. An Inquiry into Biology, Behavior, Fisheries and Use. Proc. of a Conf. Portland. Oregon, State University Extension Service, 1987, p.11-17.

Castro, J.A. & Mejuto, J. (1995). Reproductive parameters of blue shark, *Prionace glauca*, and other sharks in the Gulf of Guinea. Mar. Freshwater Res., 46:967-97.

Chapman, D.D.; Pinhal, D.; Shivji, M.S. (2009). Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research*. doi: 10.3354/esr00241.

Compagno, L.J.V. (1990). Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, v. 28, p. 33-75.

Compagno, L.J.V. FAO. (1984). Species Catalogue. Sharks of the World. A, Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes. *FAO Fish. Synop.*, 4(125): 251-655.

Compagno, J. J. V. (2002). Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. No. 1, Vol. 2. Rome, FAO. 2001. 269p.

Duncan, K.M.; Martin, A.P.B.; Bowen, W.; De Couet, H.G. (2006). Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) *Molecular Ecology* 15, 2239–2251

Ellegren, H. (2004). Microsatélites: seqüências simples com evolução complexa. *Nature Reviews Genetics*, v.5, p. 435-445.

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

Falk, T.M.; Teugels, G.G.; Abban, E.K.; Villwock, W.; Renwranz, L. (2003). Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 81-92.

Feldheim, K.A.; Gruber, S.H.; Ashley, M.V. (2002). The breeding biology of lemon sharks at a tropical nursery lagoon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 1655–1661.

Feldheim, K.A.; Gruber, S.H.; Ashley, M.V. (2001). Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 10, 295–303.

Felsenstein, J. (2004). *Phlip (Phylogeny Inference Package)*, Version 3.6b. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. University of Washington, Seattle.

Figueiredo, J.L. (1977). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo, 104 p.

Ferreira, C.M.; Nunes, J.A.; Oliveira, E.C.; Tessier, M.F.; Sampaio, C.L.S. (2003). Análise dos desembarques da frota artesanal da Pituba, Salvador, Bahia. In: I Congresso Brasileiro de Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. Resumos: CD Rom.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2o edição, Brasília, EMBRAPA-CENARGEN

Ferris, S.D. and Berg, W.J. (1987). The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. In: *Population Genetics and Fisheries Management* (Ryman, N. and Utter, F., eds.). University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 277-301.

Ferdig, M. T. & Su, X. Z. (2000). Microsatellite Markers and Genetic Mapping in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, n. 16, p. 307-312.

Fillatre, E. K.; Etherton, P.; Heath, D.D. (2003). Bimodal run distribution in a northern population of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*): life history and genetic analysis on temporal scale. *Molecular Ecology* 12, p. 1793-1805.

Gadig, O.B.F. (1994). Fauna de tubarões da costa Norte/Nordeste do Brasil (Chondrichthyes: Elasmobranchii). Dissertação de Mestrado em Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 330 p.

Gadig, O.B.F. (2001). Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo. 343p.

Gaida I.H. (1997). Population structure of the Pacific angel shark, *Squatina californica* (Squatiniformes: Squatinidae), around the California Channel Islands. *Copeia*, 4, 738–744.

Grattapaglia, D.; Kirst, M. (2007). Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools, 2007.

Gruber, S.H. (1990). Life style of sharks. In: Gruber, S.H. (ed.) *Discovering sharks*. American Litoral Society, Special Publication No 14.

Haimovici, M.; Castello, J.P. & Vooren, C.M. (1997). Fisheries. In: *Subtropical Convergence Environments: the Coastal and Sea in the Southwestern Atlantic*.

Hazin, F.H.V. (1991). Ecology of the blue shark, *Prionace glauca*, in the southwestern equatorial Atlantic. M.Sc. Dissert. Tokyo University of Fisheries, 123 pp.

Hazin, F.H.V.; Pinheiro, P.B.; Broadhurst, M.K. (2000). Further notes on the reproduction of the blue shark and a postulated migratory pattern in the South Atlantic Ocean. *Ciencia e Cultura* 52:114-120.

Hazin, F.H. & Lessa, R.P. (2005). Synopsis of biological information available on blue shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic ocean. Collective Volume Scientific Papers, ICCAT, 58(3): 1179-1187.

Heist, E.J.; Gold, J.R. (1999). Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 1, 182–186.

Heist, E.J.; Graves, J.E.; Musick, J.A. (1995). Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 3, 555–562.

Hiltoni-Taylor, C. (2000). IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 61 p.

Hoarau, G.; Rijnsdorp, A. D.; Van Der Veer, H.W.; Stam, W.T.; Olsen, J.L. (2002). Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology*, 11, 1165-1176.

IUCN (2006). IUCN red list of threatened species. www.iucnredlist.org. Downloaded July 2006.

ICCAT. (2005). Report of the 2004 inter-sessional meeting of the ICCAT subcommittee on by-catches: shark stock assessment. Tokyo, Japan, 14-18 de junho, 2004. Col. Vol. Sci. Pap., ICCAT, Madrid, 58(3): 799-890.

Isaac, V.J.; A.R. Araújo; Santana, J.V. (1998). A Pesca no Estado de Amapá, alternativas para seu desenvolvimento sustentável. Série Estudos do Amapá, 11-132.

Keeney, D.B.; Heist, E.J. (2003). Characterization of microsatellite loci isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. *Molecular Ecology Notes*, 3, 501–504.

Keeney, D.B. and Heist, E.J. (2006). Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology* 15, 365-294.

Keeney, D.B.; Heupel, M.; Hueter, R.E. and Heist, E.J. (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* (2005) 14, 1911–1923.

Kotlik, P.; Berrebi, P. (2002). Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24:10-18.

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

Koskinen, M.T.; Nilsson, J.; Veselov, J.; Potukin, A.G.; Ranta, E.; Primmer, C. R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus Thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391-401.

Kotas, J.E.; Petrere Junior, M.; Azevedo, V G. & Santos, S. (2005). A pesca de emalhe e de espinhel de superfície na região sudeste-sul do Brasil. MMA, Programa Revizee, Série Documentos REVIZEE - Score-Sul. São Paulo, Instituto Oceanográfico, USP. 72 p.

Lacy, R.C. & Lindenmayer, D.A. (1995). A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum, *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in south-eastern Australia. I. Demographic stability and population persistence. *Biological Conservation* 73:119-129.

Last, P. & Stevens, J.D. (2009). Sharks and Rays of Australia. CSIRO, Hobart. 639 p.

Lessa, R.P.T.; Batista, V.; Almeida, Z. (1999). Occurrence and biology of the daggernose shark, *Isogomphodon oxyrinchus* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) off the Maranhão coast (Brazil). Bull. of Mar. Scien., 64(1): 115-128.

Lessa, R.P. (1986). Contribuição ao conhecimento da biologia de *Carcharhinus porosus* Ranzani, 1839 (Pisces, Chondrichthyes) das reentrâncias maranhenses. Acta Amazônica, 16/17 (no. único): 73-86.

Levy, J.A. & Cassano, V.P.F. (1994). Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology. 107 B (4): 515-517.

Matsuura, Y. (1995). Exploração pesqueira-ambiente marinho no litoral brasileiro:1-15 in MMA, 1995. Os ecossistemas brasileiros e os principais macrovetores de desenvolvimento: subsídios ao planejamento da gestão ambiental/Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Secretaria 40 de Coordenação dos Assuntos de Meio Ambiente, Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA – Brasília:104p.

Mães, G.E.; Pujolar J.M.; Raeymaekers J.A.M.; Dannewitz, J.; Volckaert, F.A.M. (2006). Microsatellites conservation and Bayesian individual assignment in four *Anguilla* species Marine Ecology Progress Series, 391,p. 251-261.

Melo, C.D.; Oliveira, A.A.D.; Seerig, A.; Carvalho, C.D. (2008). Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia;

Mendonça, F.F.; Oliveira, C.; Gadig, O.B.F.; Foresti, F. (2009). Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii*

(Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology*, 7(2) 213-216

Menezes, N.A.; Buckup, P.A.; Figueiredo, J.L. & Moura, R.L. (2008). Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 197 p.

Nunes, A.S.; Dominguez, J.M.L. (2004). Habitats essenciais para peixes – HEP na Costa do Dendê, Bahia. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, XVI Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí (SC). Resumos: p. 7.

Nunes, J.A.; Tessier, M.; Ferreira, C.M.; Sampaio, C.L.S. (2003). A bicuda, *Sphyræna guachancho* Cuvier, 1829 (Actinopetygii), e elasmobrânquios desembarcados pela frota artesanal da Pituba, Salvador (BA). In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, Porto Seguro (BA). Resumos: 214-220.

Oliveira, J. E.; Dantas, L.L.J.; Castellen, S.M.; Machado, D. M. (2008). Identification of microsatellites for papaya by DNA data bank exploration; 2008.

Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Vieria, M.L.C. (2006). Origin, Evolution and Genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*; p. 294-307.

Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Anu. Ev. Ecol. Syst.* 25: 547

Palumbi, S.R.; Baker C.S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 426–435.

Pardini, A.T.; Jones, C.S.; Noble, L.R. (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. Phylogenet. Evol.* 28: 420-429.

Perdices, A.; Cunha, C.; Coelho, M.M. (2004). Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 192-203.

Pires-Vanin, A.M.S. & Matsuura, Y. (1993). Estrutura e função do ecossistema de plataforma continental da região de Ubatuba, Estado de São Paulo: uma introdução. *Inst. oceanogr., São Paulo*, (10): 1-8. Edição Especial.

Powell, W.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S.; Rafalski, A. (1996). The comparasions RFLP, RAPD, AFLP, and SSR markers for geroplasm analysis. *Molecular Breeding*; v.2, p.238-255.

Polzin, T.; Daneschmand, S.V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20.

Rosa, R.S. (1997). Espécies de elasmobrânquios ameaçadas no Brasil. Resumos da I Reunião da Sociedade Brasileira para Estudo dos Elasmobrânquios, Ilhéus, p. 111-113.

Rosa, R.S.; Menezes, N.A. (1996). Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 13(3):647-667.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sadowski, V. (1989). Selachier aus dem litoral von São Paulo, Bresilien. *Beit. Neotrop. Fauna*.v. 5(2) p.71-88, 1967.

Schrey, A.W.; Heist, E.J. (2003). Microsatellite analysis of population structure in shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 60, 670–675.

Schultz, J.K.; Feldheim, K.A.; Gruber, S.H.; Ashley, M.V.; McGovern, T.M.; Bowen, B.W. (2008). Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). Molecular Ecology 17(24) 5336-5348.

Silva, M.O.; Gadig, O.B.F. (1994). Aspectos ecológicos de juvenis de *Sphyrna lewini* (Chondrichthyes, Sphyrnidae) no litoral de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 20, Rio de Janeiro. Resumos. p. 93.

Smith, P.J.; Jamieson, A. & Birley, A.J. (1990). Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. J. Cons. Int. Explor. Mer. 47: 231- 328

Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios – SBEEL. (2005). Plano Nacional de Ação para a Conservação e o Manejo dos estoques de Peixes Elasmobrânquios no Brasil. Recife www.sbeel.org.br/downloads/plano.pdf

Strecker, U.; Faúndez, V.H.; Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. 33, 469-481.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. Trends ecol Evol. 15:199-203.

Toledo-Filho, S.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Galhardo, E.; Donola, E. (1992). Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: USP, 39 p. USP. Cadernos de Ictiogenética.

Travassos, M.F. & Hazin, F.H.V. (2005). National report of Brazil - Brazilian tuna fisheries- 2005 Annual meeting of the ICCAT standing committee on research and statistics (SCRS) -ICCAT.

Vazzoler, A.E.A.; Soares, S.H.S. & Cunningham, P.T.M. (1999). Ictiofauna da costa brasileira. In R. H. Lowe-McConnell. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Editora da Universidade de São Paulo, 1999:424-467.

Vooren, C. M. (1997). Demersal Elasmobranchs. *In*: Seeliger, U.; Odebrecht, C. & Castello, J. P (Eds.). Subtropical Convergence Environments: the coast and sea in the southwestern Atlantic. Rio Grande, RS. 141 - 146 p.

Wang, J.; Lin, H.; Huang, S.; Pan, C.; Chen, X.; Chiang, T. (2004). Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1143-1156.

Ward, R.D.; Woodswark, M. & Skibinski, D.O.F. (1995). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology.* 44: 48-52.

Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, p. 524-530.

Yokota, L. (1998). Caiçara do Norte (RN): Um Berçário de Tubarões e Raias. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, p. 64 MacVector™ 6.5 (1998). Oxford Molecular Ltd.

Zhao, X.P.; Kochert, G. (1993). Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, v.21, p. 607-614.