

**Caracterização da estrutura genética populacional do  
tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamoharai*) no  
Atlântico Equatorial utilizando marcadores  
moleculares.**

BRUNO LOPES DA SILVA FERRETTE





**unesp**

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

**Caracterização da estrutura genética populacional do  
tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamoharai*) no  
Atlântico Equatorial utilizando marcadores  
moleculares.**

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: Bruno Lopes da Silva Ferrette  
Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti  
Co-orientador: Prof. Dr. Rui Coelho**

**Botucatu  
2012**

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

Ferrette, Bruno Lopes da Silva.

Caracterização da estrutura genética populacional do tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamoharai*) no Atlântico equatorial utilizando marcadores moleculares / Bruno Lopes da Silva Ferrette. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Rui Coelho

Capes: 20204000

1. Genética de populações. 2. Tubarão - Pesca. 3. Tubarão - Conservação.

Palavras-chave: Conservação; D-loop; Estruturação populacional; Lamniformes *Pseudocarcharias kamoharai*; Tubarões.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti pela confiança em mim depositada, pela orientação e ajuda durante todo o Mestrado, pelo interesse no trabalho e todas as orientações nesses anos. Não falo só por mim quando digo que ele é um exemplo para todos nós do laboratório, como pessoa e pesquisador.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Rui Coelho, do FPSR e do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, também por confiar em mim para o trabalho, pelo apoio teórico em suas estadias aqui no Brasil, por todo o material que me enviou para o estudo. Outro grande pesquisador que eu tive o prazer de conhecer!

Agradeço muito ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira por todo o auxílio teórico e prático, sem sua ajuda não teria conseguido chegar a meus resultados e sem sua presença no laboratório não poderíamos trabalhar, mais um grande pesquisador que nos inspira.

Quero agradecer também ao Prof. Dr. Otto Bismarck Fazzano Gadig pelo material cedido e também pelos ensinamentos transmitidos sobre a biologia dos peixes cartilagosos, com todo o entusiasmo que ele mostrou durante os cursos e disciplinas que pude participar ao longo da minha formação, antes e durante o mestrado. Você é um dos responsáveis por eu gostar deste grupo de animais.

Ao Dr. Fernando Fernandes Mendonça, o líder de nosso grupo de estudos de elasmobrânquios e um grande amigo, cuja orientação, paciência e conhecimento do trabalho tornaram possível que eu chegasse até aqui. Abração!

Muitos agradecimentos a todos os servidores da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, que foram fundamentais para que eu pudesse concluir esta etapa da minha formação.

Tenho muito a agradecer também aos meus colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, por todo o apoio, amizade e alegria proporcionados esse tempo trabalhando juntos. Um agradecimento também aos técnicos e funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo ótimo serviço prestado e pela disposição de sempre ajudar!

Agradeço muito a todos aos meus irmãos da República Biotererê por todo o apoio, força, descontração e alegria que passamos e continuaremos passando no futuro. Duas pessoas se tornaram meus novos irmãos, Luis

Henrique (Japa) e Diego (Giz) e sempre foram companheiros nos piores e melhores momentos. Um brinde a vocês, meus amigos!

Agradeço a todos os meus amigos, novos e de muito tempo, pela confiança que vocês têm em mim, pelo apoio, carinho e alegria que podemos passar durante nossos encontros. Vocês estão sempre comigo, mesmo longe!

Um agradecimento mais que especial para a minha família; à minha mãe Léa, meu pai Admir e ao meu irmão Diego, vocês são o verdadeiro motivo que me faz continuar na luta da vida e seguir meus sonhos, com vocês ao meu lado não irei fracassar. E a todo os demais da minha família, meus avós, tios e primos, pois sem a sua confiança e carinho não chegaria tão longe! Um beijão a vocês!

E que venham muitas outras alegrias e conquistas ao lado de todos vocês!

## EPÍGRAFE

“A vida só pode ser compreendida  
olhando-se para trás; mas só pode ser  
vvida olhando-se para frente.”

Soren Kierkegaard

## RESUMO

Para o setor pesqueiro, a identificação e manutenção de estoques diferenciados são fundamentais, pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos, sendo um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo, a conservação da variabilidade genética. Entre os tubarões mais explorados, as espécies pelágicas apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento de suas populações devido às suas distribuições em vastas áreas geográficas. Entre essas espécies, *Pseudocarcharias kamoharai*, popularmente conhecida como tubarão-crocodilo ou tubarão-cachorro, atinge tamanhos máximos em torno de 140 cm de comprimento total, habita profundidades máximas em torno de 600 metros e ocorre em todos os oceanos tropicais, sendo registrada no Brasil principalmente nas áreas oceânicas do Nordeste. A análise genética molecular realizada utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) de 125 indivíduos capturados em quatro regiões distintas no Oceano Atlântico (Equatorial Oeste, Noroeste Africano, Golfo da Guiné e Sudoeste Africano) Permitiu identificar 22 haplótipos com diversidade haplotípica  $h=0.627$  e diversidade nucleotídica  $\pi=0.00167$ . Estes índices são similares aos encontrados em outras espécies de tubarões pelágicos também do Atlântico e podem ser considerados dentro dos níveis médios de diversidade genética entre os tubarões. O índice de  $F_{ST}=0.00125$  obtido nas comparações pode sugerir ausência de estruturação populacional entre os quatro grupos amostrados. Tendo em vista a contínua inclusão de espécies de



tubarões na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar na gestão adequada da pesca e na conservação desta espécie no Oceano Atlântico.

**Palavra-Chave:** Conservação, D-loop, Estruturação populacional, Lamniformes, *Pseudocarcharias kamoharai*, Tubarões.

## ABSTRACT

For the fishing sector, the identification and delimitation of the fishing stocks constitute fundamental information due to their direct relationship to the overall productivity and sustainable utilization of the resources. This constitutes a basic objective in terms of population management and conservation of endangered species that can be represented by the conservation of the genetic variability. Among the most exploited sharks, pelagic species have a greater complexity in terms of evaluation and monitoring due to their distributions along large geographical areas. One of these species is the crocodile shark, *Pseudocarcharias kamoharai*, which reaches maximum sizes of around 140 cm in total length, inhabits maximum depths of around 600 meters, and occurs in all tropical oceans including in Brazil, mainly in the Northeast region. The molecular genetic analysis using sequences of the mitochondrial DNA control region (D-loop) of 125 individuals captured in four distinct regions in the Atlantic Ocean (Western Equatorial, Northwest Africa, Gulf of Guinea and Southwest Africa), allowed the identification of 22 haplotypes which revealed a haplotype diversity of  $h=0.627$  and a nucleotide diversity of  $\pi=0.00167$ . These indices showed to be similar to those found in other species of pelagic sharks, also from the Atlantic sites and can be considered inside of the average levels of genetic diversity among the sharks. The value of  $F_{ST}=0.00125$  index found in the comparisons may suggest the absence of population subdivision among the four sampled regions analyzed. Given the continued inclusion of shark species in the Red List of the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), the results obtained in this study may be used to help a

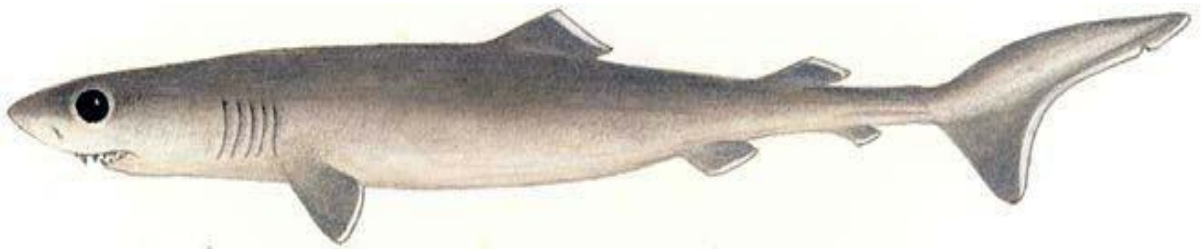
more sustainable management of fisheries and conservation programs of this species in the Atlantic Ocean.

**KeyWords:** Conservation, D-loop, Populational Structure, Lamniformes, *Pseudocarcharias kamoharai*, Shark.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<i>Aspectos Gerais dos Peixes .....</i>	<i>2</i>
<i>Elasmobrânquios Pelágicos .....</i>	<i>7</i>
<i>Pseudocarcharias kamoharai .....</i>	<i>14</i>
<i>Biologia Molecular aplicada à Conservação de Espécies.....</i>	<i>20</i>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<i>Coleta de amostras .....</i>	<i>31</i>
<i>Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento .....</i>	<i>32</i>
<i>Análise das seqüências.....</i>	<i>34</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

# Introdução



## INTRODUÇÃO

### ***Aspectos Gerais dos Peixes***

Recentes descobertas de fósseis de vertebrados primitivos do Cambriano Inferior estenderam o surgimento dos vertebrados para cerca de 540 milhões de anos atrás. Em um mesmo depósito fóssil na China foram encontrados dois tipos de vertebrados, o *Mylokuningia* e o *Haikouichthys*, ambos pequenos com cerca de 3 centímetros de comprimento, possuindo forma semelhante a dos peixes. A evidência de um crânio e miômeros em forma de W caracterizaram estes animais como Vertebrata verdadeiros (Shu et al. 1999). Os Branchiostomas ou anfioxos (que são encontrados enterrados na areia em águas rasas) são os mais próximos exemplos deste tipo de animal e que ainda vivem nos dias atuais (Compagno et al. 2005).

A classe Chondrichthyes foi caracterizada inicialmente como um grupo de peixes primitivos e de pouco sucesso evolutivo; na verdade, constituem uma linhagem derivada de peixes extremamente adaptada ao seu ambiente, amplamente distribuída e diversificada (Compagno 1973, 2000). No passado eram muito mais abundantes e diversificados e, segundo registros fósseis, possuíam mais de 3000 espécies. Peixes de morfologia muito semelhante a dos tubarões modernos (Figura 1) já nadavam nos oceanos quando os dinossauros caminhavam sobre a Terra há pelo menos 150 milhões de anos (Grogan & Lund 2004).

Os fósseis atualmente disponíveis destes organismos representam provavelmente apenas uma pequena fração da diversidade total do grupo

existente há pelo menos 400 milhões de anos. A julgar pelos dados existentes nos volumes da última década do Zoological Record, a taxa anual de descrição de novas espécies de Chondrichthyes fósseis pode ser maior do que a das espécies que vivem atualmente. Durante sua longa existência, os Chondrichthyes aumentaram e diminuíram sua biodiversidade repetidas vezes, acompanhando as flutuações na biodiversidade de outros organismos marinhos e de água doce durante os Períodos Paleozóico, Mesozóico e Cenozóico e até os dias atuais. Os peixes cartilagosos quase foram extintos e, em seguida se recuperaram dos fatores que causaram a extinção dos principais grupos de organismos marinhos durante a transição do Permiano-Triássico e ao final do Cretáceo (Carroll 1988), tiveram muitas radiações e sucederam grupos competitivos ao longo de sua história de vida. Não há evidências de que o número de espécies de Chondrichthyes diminuiu durante os últimos 65 milhões de anos, após a extinção do Cretáceo. Em vez disso, recuperaram-se do Cenozoico com vigor e flexibilidade evolutiva, já que novas oportunidades ecológicas surgiram nos mares pós-Cretáceo (Compagno 1990).

© Julius T. Csotonyi  
csotonyi.com

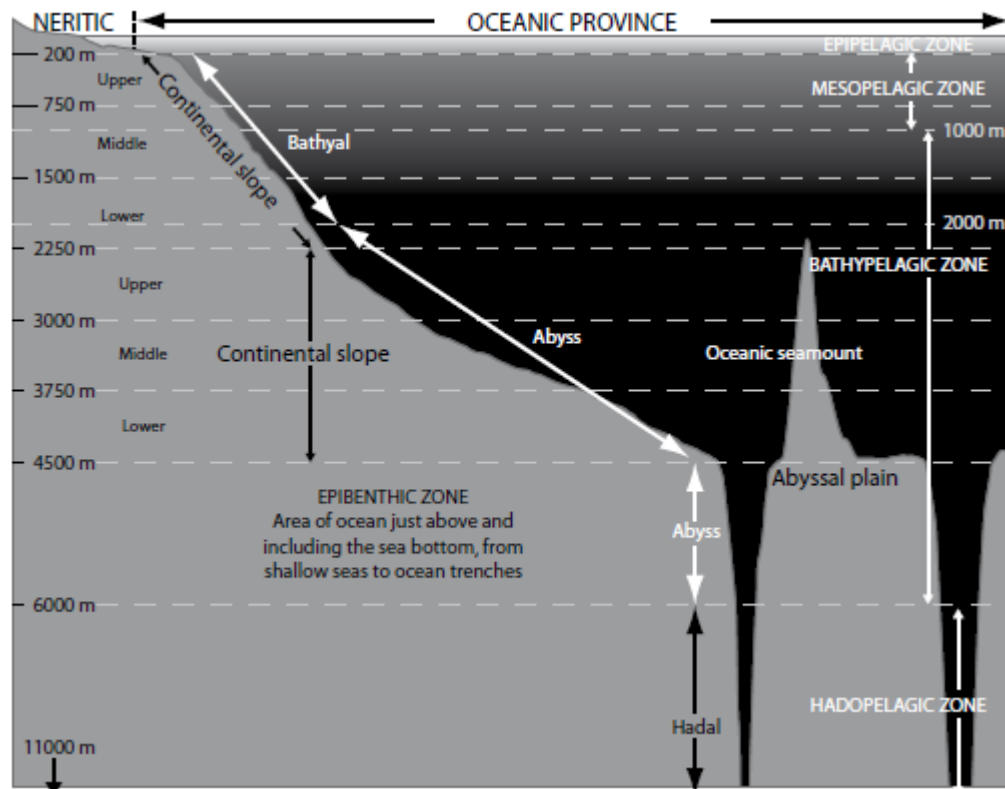


**Figura 1.** Representação de um tubarão *Ctenacanthus* sp. (esquerda) e uma réplica de um fóssil de *Stethacanthus* sp. (direita), ambos tubarões ancestrais extintos. Retiradas de <http://www.csotonyi.com/> em 18/02/2011.

As informações disponíveis atualmente relatam a existência de aproximadamente 954 a 1125 espécies de elasmobrânquios, compondo uma distribuição que abrange pelo menos nove ordens, 57 famílias e 182 gêneros (Compagno et al. 2005). Na classe Holocephali, existem pelo menos 34 espécies descritas de quimeras (Chimaeriformes) (Didier 1995; Didier & Stehmann 1996; Didier 1998). Estudos recentes realizados com capturas e investigações em grandes profundidades nos oceanos descobriram novas espécies de quimeras e os pesquisadores acreditam haver ainda mais. Das 13 espécies não descritas de quimeras, nove são de águas da Nova Zelândia e da Austrália (Last & Stevens 1994).

Os peixes cartilagosos apresentam diversos hábitos alimentares, variando desde planctívoros até predadores do topo de cadeia alimentar e exibem todas as estratégias reprodutivas conhecidas em vertebrados, desde a postura de ovos até a viviparidade placentária (Snelson et al. 2008). A maioria dos Chondrichthyes vive no ambiente marinho; entretanto, muitos utilizam áreas estuarinas como áreas de berçário, outros entram em rios e há espécies que são endêmicas e vivem em água doce. Eles habitam desde áreas próximas às praias, recifes, ilhas, em zonas pelágicas (0-200m), batiais (200-2000m) e até abissais, situadas a mais de 2000m de profundidade (Figura 2). Algumas espécies são bentônicas, como as raias da família Rajidae e os cações-anjo (Squatinae); outras, como o tubarão-anequim (*Isurus oxyrinchus*) são pelágicos, restringindo a maior parte de suas atividades às camadas superficiais do oceano (Compagno et al. 2005).

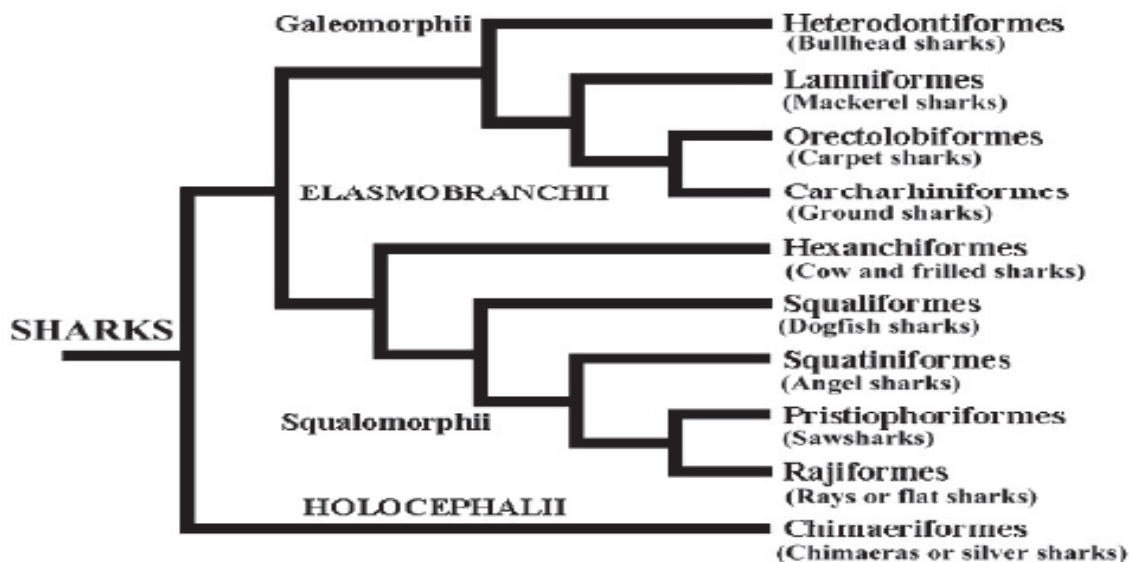




**Figura 2.** Esquema ilustrativo das Zonas Oceânicas (Camhi et al. 2009b).

Há muita discussão sobre a antiga classificação tipológica dos Chondrichthyes, em que tubarões e raias representavam a subclasse Elasmobranchii e as quimeras representavam a subclasse Holocephali. A maioria das chaves de classificação dos elasmobrânquios modernos subdivide a subclasse Elasmobranchii em grupos de tubarões (Squalii, Pleurotremata) e as raias (Batoidea, Hypotremata). Pesquisas recentes mostram que os atuais elasmobrânquios podem ser divididos em duas superordens, representadas por Squalomorphii e Galeomorphii. Classificações cladísticas modernas (Shirai 1996; De Carvalho 1996; Compagno 2000) refutam a idéia de que os batóides comporiam uma ordem, Rajiformes, à qual pertence o grupo dos tubarões squalomorfos, que é grupo irmão dos Pristiophoriformes, grupo dos peixes-serra. Os batóides são tubarões achatados dorso-ventralmente com nadadeiras

peitorais alargadas. Esta ordem de tubarões é a de maior sucesso em termos de números e de diversidade morfológica.



**Figura 3.** Cladograma ilustrativo das formas de tubarões modernos (Compagno 2000).

No ambiente natural, as maiores ameaças aos elasmobrânquios são representadas pela atividade pesqueira, pela destruição dos habitats e pela poluição do ambiente marinho, que podem gerar problemas para a administração da pesca e conservação dos estoques. Somam-se a estes fatores as limitações ligadas à estratégia de vida adotada pelas espécies (Camhi et al. 1998). As características do ciclo de vida do tipo K - Estrategista tornam os Chondrichthyes frágeis e suscetíveis à sobrexploração, pois geralmente apresentam crescimento lento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e alta longevidade (Hoenig & Gruber 1990), que constituem fatores limitantes para a reação das espécies a mortalidades excedentes

impostas aos estoques pela pesca, decorrente da estreita relação entre estoque e recrutamento (Holden 1974; Holden 1977).

Os modelos utilizados na gestão de pescarias tradicionais de teleósteos não se aplicam aos elasmobrânquios, tornando o gerenciamento desses recursos extremamente complexo. Em escala mundial, o manejo dos estoques de elasmobrânquios é complicado pela falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações. A atividade pesqueira envolve o paradoxo de que tubarões e raias têm baixo valor econômico, o que lhes confere baixa prioridade quando se consideram aspectos da pesquisa e da conservação, ao passo que a demanda por subprodutos, como as nadadeiras, é muito alta, estimulando o aumento da exploração (Bonfil 1994).

Em todo o globo, devido à atividade pesqueira, a cada dia, novas espécies de elasmobrânquios são incluídas na lista vermelha das espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN (Camhi et al. 1998).

### ***Elasmobrânquios Pelágicos***

Tubarões e raias pelágicos formam um grupo relativamente pequeno, representado cerca de 6% de todas as espécies de peixes cartilaginosos e possuem uma baixa diversidade em relação aos Chondrichthyes costeiros. São espécies geralmente muito ativas, nadam grandes distâncias, habitam a coluna d'água e não estão intimamente associadas com o fundo do oceano. As ordens Squaliformes e Lamniformes possuem a maior diversidade entre as espécies oceânicas, enquanto os membros da ordem Carcharhiniformes provavelmente

possuem maior biomassa. As ordens Carcharhiniformes, Rajiformes e Squaliformes possuem a maior diversidade entre as espécies semipelágicas. Não há registro de quimeras (Chimaeriformes) oceânicas ou semipelágicas, sendo que a maioria das espécies habitam as plataformas continentais e insulares (Compagno 2008).

A grande maioria das espécies oceânicas vive toda ou grande parte de sua vida longe de grandes massas continentais. Contudo, algumas espécies habitam áreas próximas às plataformas continentais e insulares, à profundidade de cerca de 200m, podendo habitar também áreas costeiras para se alimentar, procriar ou participar de atividades de interações sociais. As espécies semipelágicas penetram áreas oceânicas, mas concentram-se nas proximidades das grandes massas continentais, na plataforma continental (Compagno 2008).

Quanto à sua distribuição, as espécies oceânicas podem ser epipelágicas, confinadas às regiões superficiais do oceano, em regiões abrangendo desde a superfície até profundidades de 200m; mesopelágicas, quando habitam áreas de pouca luminosidade abaixo da zona epipelágica, em profundidades que variam entre 200m e 1000m; ou batipelágicas, habitando áreas sem luz a mais de 1000m de profundidade, podendo alcançar profundidades até 2000m (Compagno 2008).

Compagno (1990) analisou os tubarões considerando os ecomorfotipos, determinado a inclusão de diversos táxons que podem ou não ser filogeneticamente relacionados, mas que são agrupados por semelhanças morfológicas, de habitat ou de comportamento. Os tubarões oceânicos

apresentam alguns desses ecomorfotipos, sendo classificados como taquipelágicos ou de alta velocidade, por possuírem um morfotipo “tuna-like”, com corpos fusiformes, nadadeira caudal em forma de lua, quilhas em seu pedúnculo caudal, altas temperaturas corporais e mecanismos circulatórios especializados na retenção de calor para reforçar as investidas em altas velocidades e poderem permanecer em velocidades menores por mais tempo. São representantes deste ecomorfotipo os membros da família Lamnidae, como o cação-marracho (*Lamna nasus*), o tubarão-salmão (*L. ditropis*) e o anequim (*Isurus oxyrinchus*). Um provável ramo especializado deste ecomorfotipo, formando um subtipo de seu próprio, é o tubarão-frade (*Cetorhinus maximus*), que possui uma forma única de filtragem dinâmica para a alimentação, mas comparável com os mecanismos de alimentação de muitos teleósteos. Tubarões taquipelágicos alimentam-se geralmente de organismos marinhos de tamanho moderado, mas há um ramo chamado arquipelágico que engloba a elite dos tubarões superpredadores, localizados no ápice da cadeia alimentar, que combinam um tamanho grande e poderosas mandíbulas que os permitem matar e desmembrar presas ativas de grande porte e força, como outros tubarões, raias, pinípedes e cetáceos (Compagno 1990).

Durante o período Cretáceo surgiram grandes tubarões lamnídeos superpredadores (Cretoxyrinidae e Squalicoracidae) de porte avantajado, que exploravam grandes peixes e provavelmente grandes répteis marinhos e aves. Após eventos de extinção ocorridos no Cretáceo, a maioria das espécies de tubarões encontrados passou a ser de pequeno porte. Contudo, tubarões gigantes voltaram a surgir em algumas famílias, apesar de uma possível competição das archaeocetes e das primeiras baleias squalodontes

odontocetes com grandes bocas cheias de dentes como a dos tubarões (Evans 1987; Harrison & Bryden 1988). Durante o Mioceno Superior, surgiu entre os tubarões lamnídeos um dos maiores superpredadores de todos os tempos, o tubarão dente-grande, *Carcharodon megalodon*, que podia medir entre 12,4 e 17,8m de comprimento. Junto com ele haviam outros superpredadores de menor porte como o tubarão mako dente-de-lança, *Isurus hastalis*, que possivelmente atingia 6m de comprimento e o grande tubarão-branco, *Carcharodon carcharias*, que atinge entre 6,4 e 7,1m de comprimento, sendo o seu mais próximo representante que ainda vive nos oceanos (Evans 1987).

O morfotipo macroceânico é definido por grandes tubarões oceânicos com longas nadadeiras peitorais, como o tubarão-azul (*Prionace glauca*), o galha-branca (*Carcharhinus longimanus*), o lombo-preto (*Carcharhinus falciformis*), os tubarões-raposa (família Alopiidae), o anequim-preto (*Isurus paucus*) e o tubarão boca-grande (*Megachasma pelagios*). Este morfotipo é caracterizado por espécies de tubarões de pequeno a médio porte, com corpos fusiformes e pequenas nadadeiras peitorais, sendo representado por alguns membros de pequeno porte das ordens Squaliformes e Lamniformes, como o tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamohara*) (Compagno 2008).

Entre as raias aquilopelágicas estão representantes das famílias Myliobatidae, Rhinopteridae e Mobulidae. No morfotipo aquilopelágico ocorreu um aperfeiçoamento das nadadeiras peitorais, de modo que elas se tornaram órgãos propulsores com forma de asas. O ecomorfotipo rajobêntico é representado por espécie de raia pelágica (*Pteroplatytrygon violacea*) que possui o seu disco peitoral alargado que constitui seu principal modo de propulsão, já que sua calda geralmente é reduzida (Compagno 1990).

Todas as 64 espécies de tubarões e raias pelágicas estão listadas no Apêndice I da CITES. Considerando que a preferência de habitat dominante de algumas dessas espécies não é bem definida, cerca de metade delas são consideradas oceânicas e a outra metade semipelágica, sendo que algumas das espécies aqui definidas como semipelágicas podem ocorrer em diversos habitats (Compagno 2008).

Uma análise do status global de 21 espécies constantes da Lista Vermelha – 16 de tubarões pelágicos e 5 de raias – capturados regularmente nas pescarias em alto-mar, foi apresentada por Dulvy et al. (2008). Foi verificado que a maioria destas espécies são epipelágicas e altamente migratórias, realizando movimentos de longa distância. Apresentam-se particularmente vulneráveis às frotas de pesca industriais que operam em mar aberto com artes de pesca pelágica, incluindo espinhéis, redes de cerco e redes de emalhar (Camhi et al. 2009a).

Tubarões pelágicos ocorrem em águas internacionais e grande parte migra através das fronteiras nacionais. Pelo fato de os animais se movimentarem regularmente entre as Zonas Econômicas Exclusivas (ZEEs) de países diferentes e em alto-mar, e não são beneficiados plenamente com as regulamentações que se aplicam apenas às águas ou frotas de um único país. Em decorrência disto, considera-se que para garantir a conservação destas espécies e maximizar os benefícios obtidos pelos esforços de gestão interna, torna-se necessário o estabelecimento de programas de cooperação internacionais para impor medidas de manejo por região, ou mesmo de um oceano inteiro, se for necessário (Anonymous 2008, Camhi et al. 2009a).

No mundo todo, por volta de 32% de todos os elasmobrânquios pelágicos estão ameaçados de desaparecimento ou de drástica diminuição de seus estoques (6% estão em perigo e 26% estão vulneráveis). Mais de 24% das espécies estão próximas do cumprimento de critérios para serem postas em uma categoria de ameaçadas, 19% possuem status pouco preocupante e 25% possuem dados insuficientes. A proporção de espécies oceânicas e semipelágicas ameaçadas é a mesma, cerca de 31%. Entretanto, as espécies semipelágicas possuem quase duas vezes mais espécies próximas de ameaçadas que as espécies oceânicas (31% versus 16%). Uma porcentagem um pouco maior de espécies oceânicas possui dados insuficientes em contraste com espécies semipelágicas (28% versus 25%) e quase duas vezes mais são consideradas como em estado preocupante (25% versus 13%) (Camhi et al. 2009b). Dulvy et al. (2008) apresentaram uma lista de 21 espécies de tubarões e raias pelágicas capturados regularmente em pescarias em alto-mar. A proporção destas espécies tidas como ameaçadas (52%) é maior do que todas as outras espécies pelágicas, pois são capturados em grandes quantidades em pescarias sem o devido manejo (Camhi et al. 2009b).

É amplamente aceito que as informações sobre a pesca de elasmobrânquios são insuficientes e inadequadas e isto é particularmente verdadeiro para as espécies capturadas em alto-mar (Bonfil 1994; Camhi et al 1998; Fowler et al 2005; Dulvy et al 2008; ICCAT, 2008, Camhi et al 2009a). Uma consequência direta deste fato é a falta de dados específicos da pesca, no que se refere às espécies capturadas. Embora a Food and Agriculture Organization (FAO) tenha documentado o desembarque de 102 espécies de elasmobrânquios em 2007, somente 19,5% da biomassa foi documentada ao



nível de espécie. O maior número de registros espécie-específicos é encontrado para o Oceano Atlântico (29%), seguido pelo Pacífico (17%), Índico (9%) e região Sul (6%). Os peritos consideram que estes dados subestimam enormemente o nível de mortalidade e mesmo de desembarque para estas espécies. A falta de registros de captura espécie-específicos e de descartes de fauna acompanhante também compromete a utilidade do banco de dados da FAO para avaliar os efeitos da pesca sobre o status populacional das espécies (Camhi et al. 2009a).

Como os produtos de tubarões são exportados em nível mundial, as estatísticas do comércio poderiam complementar dados sobre a pesca para desenvolver estimativas mais robustas sobre a mortalidade anual de tubarões. Em um trabalho visando a identificação espécie-específica de nadadeiras de tubarões comercializadas no mercado de Hong Kong, país que importa entre 50% e 85% das barbatanas de elasmobrânquios de todo o mundo (Vannuccini 1999; Clarke 2004), foi observado que as capturas mundiais de tubarões podem ser de três a quatro vezes maiores do que os dados constantes das estatísticas oficiais relatadas pela FAO (Clarke et al. 2006). Em um extenso estudo em Hong Kong, corroborado pelas análises de DNA forense das barbatanas, Clarke et al. (2006) estimaram que os tubarões pelágicos são responsáveis por pelo menos um terço das barbatanas comercializadas.

Em todo o mundo há uma crescente preocupação com o aumento das capturas de tubarões e as consequências dessa exploração para muitas de suas populações em diversas regiões oceânicas. Tal fato se deve, em parte, pela relação que muitas espécies de tubarões têm com o recrutamento dos estoques e longos períodos de recuperação em resposta à sobrepesca (baixa

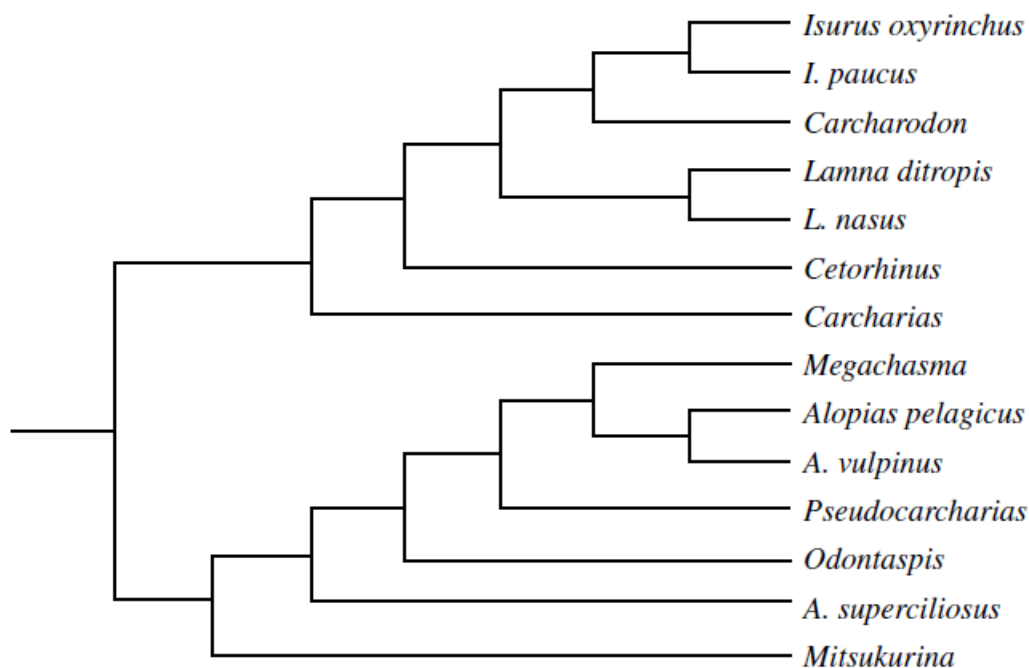
produtividade biológica devido à maturidade sexual tardia, poucos filhotes, embora com baixa mortalidade natural) e complexas estruturas espaciais (tamanho / segregação sexual e a migração sazonal) (FAO 1999).

Alguns países têm planos de gestão específicos para as capturas de tubarões e estes incluem o controle de acesso, medidas técnicas, incluindo as estratégias de redução de capturas acessórias de tubarões e suporte para o uso dos animais inteiros e não apenas as nadadeiras. No entanto, dada a ampla distribuição dos tubarões, principalmente em alto-mar e a longa migração de muitas espécies, é cada vez mais importante o desenvolvimento de cooperações internacionais e a elaboração de planos de gestão integrados de manejo da pesca (Camhi et al. 2009a).

### ***Pseudocarcharias kamoharai***

A origem dos tubarões Lamniformes foi estimada para o período Jurássico Médio, sendo a datação do primeiro fóssil do gênero *Paleocarcharias* encontrada no Jurássico Superior, na Europa. O gênero possuía um corpo orectolobóide bentônico, mas apresentava claramente dentes Lamniformes (Duffin 1988). Os primeiros registros das famílias dos Lamniformes existentes, Odontapsidae e Mitsukurinidae, datam do Cretáceo Inferior, há cerca de 115 milhões de anos, sendo que os lamnídeos surgiram no Paleoceno, os alopídeos, em sua grande maioria, no Eoceno Inferior e os cetorhinídeos no Oligoceno (Cappetta 1987; Cappetta et al. 1993).

Os Lamniformes são um grupo de tubarões de tamanho moderado, sendo formado por sete famílias, dez gêneros e quinze espécies reconhecidas (Compagno 2001), sendo que suas inter-relações ainda não estão completamente resolvidas. Shirai (1996) reconheceu Mitsukurinidae como grupo irmão primitivo de todo o resto da ordem, seguido por dois clados, um com Odontaspidae e Pseudocarchariidae e o outro com Megachasmidae como grupo irmão de Alopiidae, Lamnidae e Cetorhinidae. Em um estudo molecular (Martin & Naylor 1997) foram definidos dois clados distintos: um com *Carcharias* na sua base e Cetorhinidae e Lamnidae acima; outro com *Megachasma*, *Pseudocarcharias*, *Alopias* e *Odontaspis* (Figura 4).



**Figura 4.** Filogenia dos Lamniformes (Martin & Naylor 1997).

Pertencente à ordem Lamniformes, família Pseudocarchariidae, o gênero *Pseudocarcharias* possui somente uma espécie, *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara, 1936), conhecida popularmente por tubarão-crocodilo

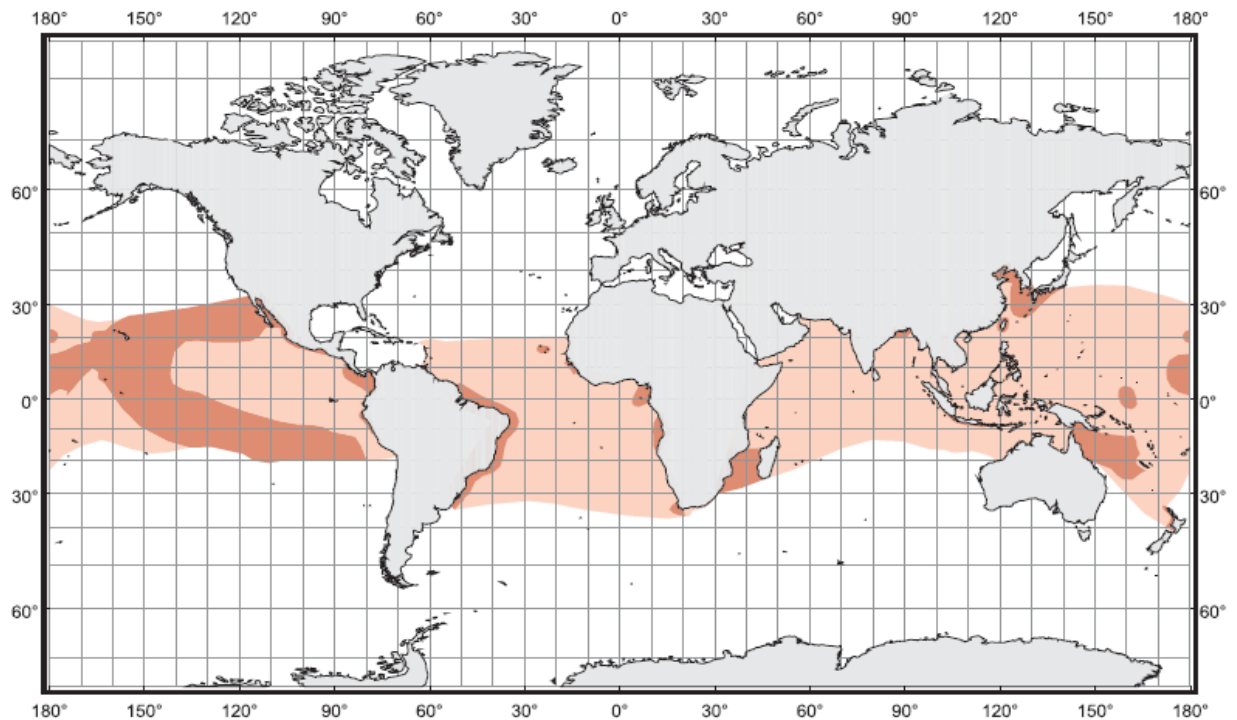
ou tubarão-cachorro (Compagno 2001, 2005). A espécie (Figura 5) é caracterizada pelos olhos grandes, sem membrana nictitante, dentes finos e longos com bordas lisas, pedúnculo caudal com quilha dérmica, coloração marrom uniforme e nadadeiras com margens claras (Last & Stevens 1994; Nelson 1994; Menezes et al. 2003).



**Figura 5.** Exemplar de *Pseudocarcharias kamoharai* (NOAA Observer Program) - [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Pseudocarcharias\\_kamoharai.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Pseudocarcharias_kamoharai.jpg)

A espécie *P. kamoharai* é oceânica epipelágica e, possivelmente, mesopelágica, ocorrendo em todos os oceanos tropicais (Figura 5), com maior número de registros no sul do Pacífico e ocupando o ambiente desde as camadas superficiais até cerca de 590m de profundidade, (Compagno 1984, 2001; Cigala-Fulgosi 1992; Long & Seigel 1997). Os primeiros registros da espécie no oceano Atlântico, indicavam sua presença somente nas margens orientais, leste e sul das Ilhas de Cabo Verde, Guiné Bissau, Guiné, Angola e África do Sul (Cadenat 1963). O primeiro registro de *P. kamoharai* na margem

ocidental ocorreu na costa brasileira, com base no exemplar capturado no litoral de Santa Catarina (Sadowsky et al. 1988). Os olhos grandes, mas não reflectivos do tubarão-crocodilo sugerem atividade noturna na zona epipelágica, movimentando-se em direção à superfície durante a noite e descendo para áreas abaixo da termoclina durante o dia (Compagno 2001).



**Figura 6.** Distribuição de *Pseudocarcharias kamoharai* (Compagno 2001).

Os hábitos alimentares de *P. kamoharai* são pouco conhecidos. Contudo, seus dentes longos e flexionados, mandíbula longa e forte e sua reação quando capturado, sugerem que a espécie pode caçar presas oceânicas ativas de tamanho moderado. Com base em estudos de conteúdo estomacal de quatro indivíduos, verificou-se que sua dieta inclui pequenos peixes ósseos das famílias Gonostomatidae e Myctophidae, como também invertebrados marinhos como pequenos camarões e moluscos

(Onychoteuthideos, Mastigoteuthideos, Pholidoteuthideos e Cranchiideos) (Compagno 1984).

A espécie apresenta-se com a de menor porte entre os Lamniformes, sendo que as fêmeas adultas apresentam em média comprimento em torno de 1,20m de comprimento total (CT) enquanto os machos tamanhos em torno de 1,10m CT. Acredita-se que a reprodução ocorra durante todo o ano, uma vez que não há sazonalidade na atividade reprodutiva (Fujita 1981; White 2007; Oliveira et al. 2010). Os machos tornam-se maduros em torno de 80cm CT e as fêmeas a cerca de 91,5cm CT (Oliveira et al. 2010).

Os Chondrichthyes apresentam fecundação interna, fecundidade relativamente baixa e uma grande diversidade de estratégias reprodutivas (Last & Stevens 1994). A reprodução do *P. kamoharai* ocorre por viviparidade matrotrofica ovofágica, com fecundidade uterina de no máximo quatro embriões e o nascimento ocorrendo com o comprimento total entre 41,5 cm (Oliveira et al. 2010). A ovofagia, que também ocorre em *P. kamoharai*, é um tipo de viviparidade em que após uma inicial nutrição pelo saco vitelínico, os embriões em desenvolvimento passam a ingerir ovos não fertilizados cedidos pela mãe, para continuar o seu desenvolvimento. A ovofagia pode resultar em recém-nascidos de grande tamanho em algumas espécies, chegando a atingir cerca de 100cm de CT (Hamlet & Koob 1999).

A ovofagia é o modo de reprodução da maioria dos Lamniformes, somente o *Carcharias taurus*, se reproduz por adelfofagia, estratégia reprodutiva em que ocorre o canibalismo uterino e nasce apenas um filhote por gestação. A ovofagia evoluiu em uma pequena família de Carcharhiniformes,

os Pseudotriakidae (Yano 1992, 1993). Estudos realizados sobre as alterações na morfologia e na massa das gônadas ao longo do tempo sugerem que na região do Atlântico Equatorial, a espécie não apresenta uma temporada reprodutiva bem definida, com o acasalamento e o parto ocorrendo possivelmente durante um período prolongado do ano (Oliveira et al. 2010).

Exemplares de *Pseudocarcharias kamoharai* são capturados em todo o mundo, predominantemente como captura acessória na pesca de espinhel pelágico dirigida a outras espécies como o espadarte, *Xiphias gladius L.* e os atuns (Scombridae) (Hazin et al. 1990). Contudo, a espécie também é ocasionalmente capturada por outros métodos de pesca como redes de emalhar (redes de atuns) e pescas com iscas de lulas (Compagno 2001). Dado o seu baixo valor comercial, exemplares capturados são geralmente descartados. Abe et al. (1969) relataram que, embora esta espécie seja tratada como peixes de lixo no mercado atacadista central de Tóquio, o fígado é proporcionalmente muito grande, com cerca de 20% do peso corpóreo total e o conteúdo esqualeno é também muito elevado, compreendendo 60-70% da biomassa do fígado. Assim, em algumas partes do mundo, o fígado pode ser utilizado para comercialização (White et al. 2006).

Com base nas características de sua história de vida, a International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) listou o tubarão-crocodilo na relação de espécies vermelhas ameaçadas de extinção como "baixo risco / quase ameaçada" ou "quase ameaçada" (Compagno & Musick 2005). No entanto, as avaliações de risco ecológico da Austrália Ocidental e Oriental sobre a pesca de atum e espadartes classificam o tubarão-crocodilo como em "risco médio" (Webb et al. 2008).

Apesar da deficiente plataforma de informações existente, as avaliações de risco da IUCN sugerem que as populações de tubarão-crocodilo têm diminuído significativamente devido à pesca pelágica com espinhel (Compagno & Musick 2005). No entanto, não há muitos estudos sobre a ocorrência, distribuição e abundância da espécie, sua estrutura populacional ou das características dos estoques existentes.

### ***Biologia Molecular aplicada à Conservação de Espécies***

Os tubarões pelágicos se distribuem em vastas extensões de mar aberto, sendo extremamente difícil estimar o tamanho das populações existentes e delinear os estoques. Muitas espécies migram através das fronteiras nacionais ou em águas internacionais, onde podem ser exploradas por frotas pesqueiras de vários países (Kohler et al. 1998; Musick et al. 2000), dificultando seu controle e manejo. Uma melhor compreensão da distribuição e do número de estoques destes peixes abundantes, mas vulneráveis, torna-se, pois, urgente e essencial para a sua conservação e gestão adequada (Heist 2009).

A maior dificuldade na aplicação das análises de variação molecular para tubarões pelágicos é decorrente do seu alto potencial de migração, onde os valores de  $F_{ST}$  esperados devem ser muito baixos. Espécies marinhas tendem a ter valores mais baixos de  $F_{ST}$  quando comparadas a organismos de água doce ou com espécies anádromas (Ward et al. 1994). Os organismos



marinhos pelágicos parecem ter valores ainda mais reduzidos de  $F_{ST}$  devido ao seu grande potencial de dispersão.

Enquanto estudos tradicionais de marcação e recaptura são muito úteis para a identificação de estoques únicos de tubarões pelágicos (Kohler et al. 1998; Kohler & Turner 2008), marcações e metodologias genéticas podem fornecer informações complementares e não idênticas. Os resultados de estudos de marcação e recaptura fornecem dados diretos sobre o deslocamento de indivíduos, indicando muitas vezes que alguns tubarões percorrem grandes distâncias. No entanto, nem todos os tubarões que se movem são "migrantes eficazes" no contexto da dinâmica de estoques e da genética populacional. (Heist 2009).

A utilização de diversos tipos de marcadores moleculares altamente polimórficos tem viabilizado a análise de um grande número de indivíduos, contribuindo para solucionar diversos aspectos populacionais em peixes. Os marcadores moleculares podem ser classificados em marcadores à base de proteínas (por exemplo, isoenzimas) e marcadores baseados em DNA que são divididos em marcadores mitocondriais e nucleares. Cada um dos tipos de marcadores moleculares possui características positivas e negativas (custo, qualidade do tecido necessário, resolução) que deverão influenciar no seu potencial de aplicação em estudos populacionais, como no presente estudo e também para outras espécies de tubarões pelágicos (Heist 2009).

A eletroforese isoenzimática (isoenzimas são diferentes formas alélicas de proteínas enzimáticas) foi o primeiro método molecular amplamente utilizado para avaliar a estrutura genética das populações de peixes marinhos

(Utter 1991), sendo este um método barato e que requer equipamentos menos especializados do que os métodos baseados em DNA (Murphy et al. 1996). No entanto, as isoenzimas possuem inconvenientes graves para o uso em tubarões pelágicos. Um ponto fraco é que os tubarões geralmente apresentam baixo polimorfismo em proteínas, o que reduz a eficácia em discriminar os estoques por este método. Em um estudo com vinte exemplares de tubarão azul (*Prionace glauca*), Smith (1986) observou que apenas 3 de 27 loci eram polimórficos (heterozigosidade média de 0,037). Eitner (1995) encontrou apenas um heterozigoto em seis tubarões anequim (*Isurus oxyrinchus*) analisado com 14 loci isoenzimáticos. A variação isoenzimática nas três espécies reconhecidas de cação-raposa (*Alopias vulpinus*, *A. superciliosus* e *A. pelagicus*) foi igualmente baixa, mas uma amostra de cação-raposa apresentou-se homozigota para alelos alternativos em vários loci, sugerindo a presença de uma espécie desconhecida (Eitner 1995). Outra desvantagem de isoenzimas é que para se marcar um número representativo de loci é preciso coletar tecidos de vários órgãos, tornando a amostragem não letal e a análise isoenzimática em postos de desembarque impraticável.

A descoberta da aplicação do DNA mitocondrial como marcador molecular no final da década de 70 (Awise et al. 1979; Brown et al. 1979) produziu um grande impacto nos estudos moleculares da genética de populações e evolução. O mtDNA animal é uma molécula circular pequena, fechada covalentemente, com tamanho geralmente variável de 14 a 26kb (Billington & Hebert 1991). Apresenta um conteúdo gênico altamente conservado, representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e

13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui ainda uma região de cerca de 1kb rica em sequências AT, denominada região controle (D-loop). Apesar de não codificante, essa região é importante, pois contém os promotores de transcrição das cadeias leve e pesada, assim como a origem de replicação da cadeia pesada (Clayton 1982). O DNAm<sub>t</sub> apresenta uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, cerca de 5 a 10 vezes superior à do DNA nuclear (Brown *et al.* 1979; Harrison 1989), o que resulta em altos níveis de variação inter e intraespecífica.

Entre suas possíveis aplicações do DNAm<sub>t</sub> nos estudos genéticos e evolutivos incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética (Avise 1986; Avise *et al.* 1987; Moritz *et al.* 1987; Bechenbach *et al.* 1990); análises de zonas de contato entre espécies (Ferris *et al.* 1983; Szymura *et al.* 1986) e de fluxo gênico (Brown & Chapman 1991; Sanetra & Crozier 2003); estudos de biogeografia histórica (Avise 1987; Sivasundar *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002) e de caracterizações de estrutura populacional (Graves 1998; Stepien & Faber 1998; Pestano & Brown 1999), além do seu emprego crescente no campo da sistemática molecular, para inferência de relações filogenéticas (Alves-Gomes *et al.* 1995; Ortí *et al.* 1996; Alves-Gomes 1998; Saitoh *et al.* 2003; Thacker 2003) e em estudos de conservação (Beheregaray *et al.* 2002; Li *et al.* 2005).

A identificação e manutenção de estoques diferenciados constituem elementos de fundamental importância para o setor pesqueiro, principalmente por suas relações diretas com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho & Hauser 1994), sendo a conservação da variabilidade

genética um dos objetivos básicos nos programas de controle e conservação de espécies em perigo (Lacy & Lindenmayer 1995). Essa questão é especificamente relevante no ambiente marinho, onde as barreiras físicas parecem ser menos expressivas (Aulsebrook 1994; Palumbi 1994), sugerindo uma tendência à homogeneização genética dos organismos (Ward *et al.* 1994; Levy & Cassano 1994; Bonhomme *et al.* 2002). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes pode estimular a sobre-exploração, reduzir os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e até eliminar estoques locais (Kuusipalo 1999).

Segundo Haig (1998), a aplicação dos métodos de conservação deve ser adotada com base na estrutura das populações. Se uma população é estruturada, sua diversidade deve ser localmente conservada, visto que já devem existir adaptações locais que seriam perdidas se esta população fosse misturada com indivíduos de outras populações. No entanto, se a população é homogênea em todos os pontos da sua distribuição, pode-se então optar pela concentração dos esforços de proteção desta espécie em uma determinada área e utilizar espécimes aí existentes como matrizes para re-colonização de outras áreas impactadas, quando houver necessidade.

A variabilidade e diferenciação populacional podem ser resultantes da atuação de vários fatores tais como a seleção natural, favorecendo genótipos ou alelos diferentes em cada subpopulação; processos aleatórios na transmissão dos alelos a cada geração (deriva genética); diferenças ao acaso nas frequências alélicas dos fundadores das subpopulações e fluxo gênico entre as subpopulações (Hartl 2010).

O fluxo gênico exerce influência importante na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto cada população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin 1993). O grau e a direção do fluxo gênico entre populações separadas podem agir como uma força poderosa atuando na manutenção ou na homogeneização das diferenças genéticas (Slatkin, 1987). Desse modo, na presença de fluxo gênico intenso, as populações tendem a evoluir conjuntamente, uma vez que a migração atua na homogeneização das frequências alélicas. Por outro lado, quando o fluxo gênico é restrito ou ausente, cada população tende a evoluir de maneira independente. Embora o fluxo gênico tenda a ser uma força homogeneizadora, ela também tem o potencial de promover divergências entre subpopulações através da criação e dispersão de combinações únicas de alelos (Slatkin 1987), atuando, assim, como uma força criadora.

Segundo Avise (1994), fatores intrínsecos das populações como o grau de fluxo gênico e sua estrutura genética, a mobilidade dos organismos e a existência de barreiras físicas ou ecológicas constituem características que podem ser determinadas, do mesmo modo que características comportamentais como filopatria, história de vida dos organismos, padrões de dispersão e fluxo gênico ligados ao sexo, influencia diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais, eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética e a distância geográfica entre as populações.

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*, onde foi observada 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 (Keeney & Heist 2006). No entanto, esta hipótese foi formulada com base em amostra com pequeno número de indivíduos capturados na costa africana (n=8) e, desta forma, não pode ser descartada a idéia de que 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*.

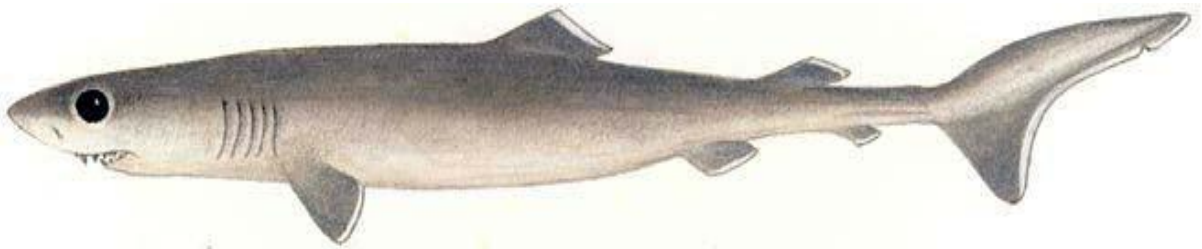
Utilizando uma amostragem global do tubarão *Galeorhinus galeus* Chabot & Allen (2009) revelaram a existência de estrutura populacional para indivíduos amostrados em diferentes oceanos sem, contudo, avaliar as populações de forma restrita a cada um dos oceanos. Na análise realizada com amostragem global do tubarão-baleia *Rhincodon typus*, não foram encontradas fortes restrições ao fluxo gênico entre os oceanos, tendo sido detectada

apenas uma moderada diferenciação entre a amostra da população do oceano Atlântico e do 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 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. De acordo com Chapman *et al.* (2009) em outro estudo realizado, *S. lewini* apresenta uma forte diferenciação no Atlântico, com estoques distintos no Golfo do México, Caribe e América do Sul.

Recentes declínios globais nas populações de tubarões têm chamado muito a atenção para os efeitos devastadores da sobre-exploração dos ecossistemas marinhos (Baum *et al.* 2003). No entanto, interpretações corretas e possíveis correções dos valores destes declínios exigem tanto conhecimento demográfico quanto genético dos estoques. Para o desenvolvimento de mecanismos de controle da pesca adequados à espécie *P. kamoharai* é necessário um conhecimento consistente a respeito da biologia populacional, incluindo a determinação da variabilidade genética, fluxo gênico e estruturação populacional ao longo da distribuição da espécie. Assim, este estudo buscou tais parâmetros analisando amostras populacionais do Oceano Atlântico, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop).

# Objetivos





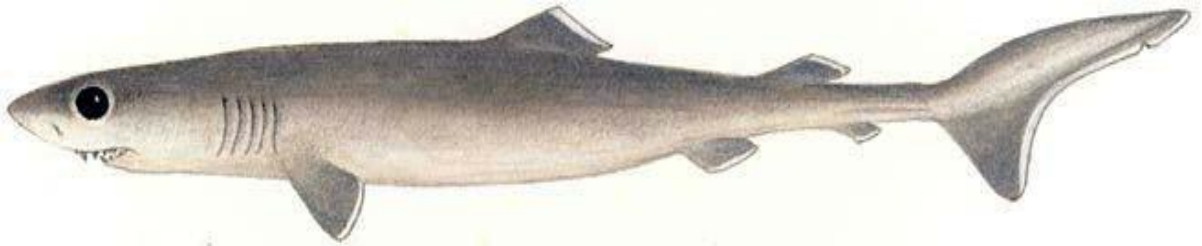
## OBJETIVOS

Considerando a relevância dos tubarões em um contexto ecológico geral e também sua atual importância mundial como um recurso econômico que apresenta a urgente necessidade da formulação de medidas de conservação, este trabalho buscou, de modo geral, fornecer dados a respeito da caracterização dos estoques e da dinâmica populacional do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial.

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

- identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial que formam os estoques de *P. kamoharai* no oceano Atlântico;
- averiguar se há ocorrência de estoques isolados ou um único estoque no oceano Atlântico do tubarão *P. kamoharai*;
- propor uma hipótese filogeográfica, estabelecendo as relações entre as populações desta espécie;
- gerar informações que possam subsidiar programas de manejo adequado e exploração sustentável da espécie de tubarão *P. kamoharai* no oceano Atlântico.

# Material e Métodos

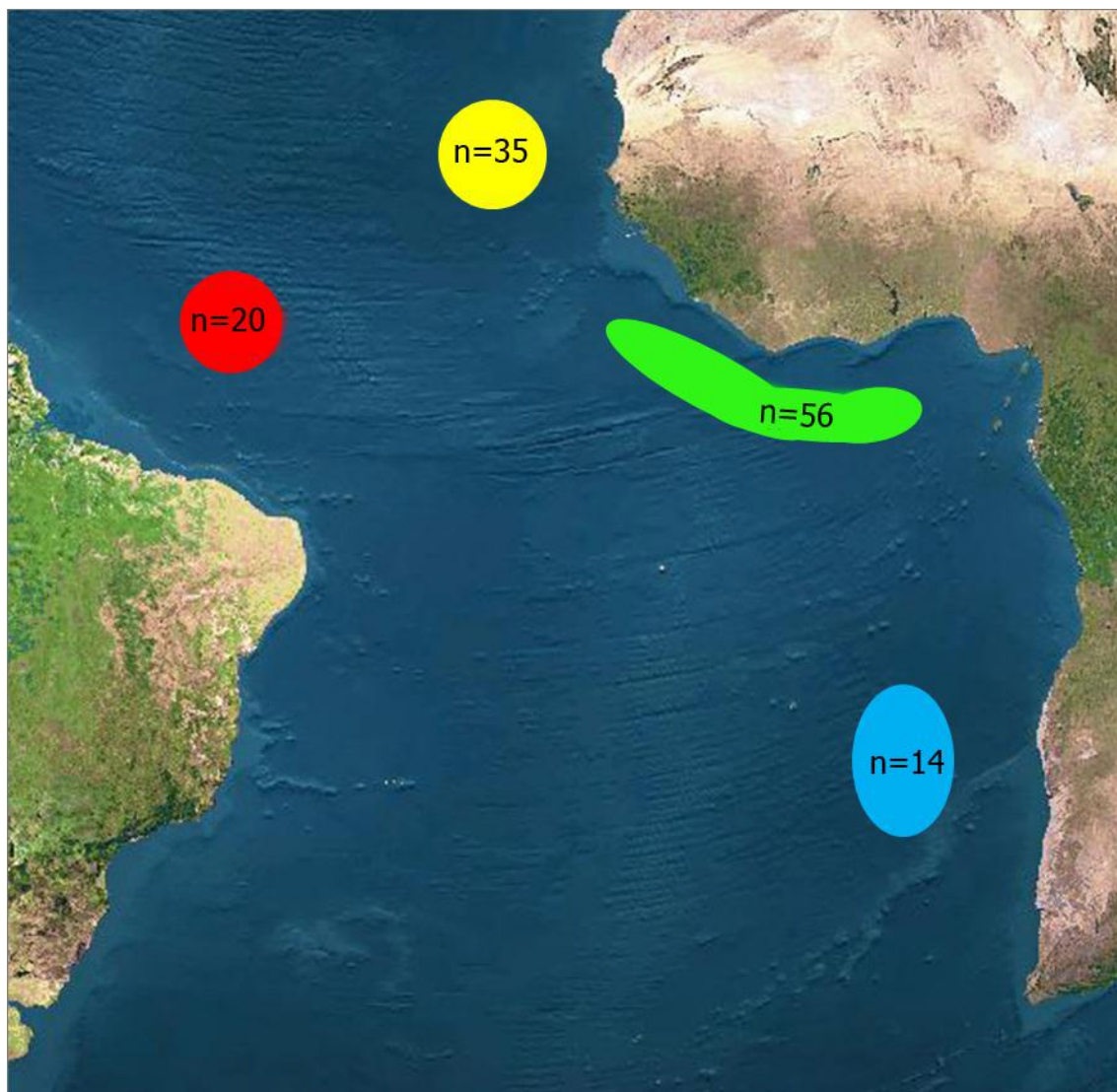


## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Coleta de amostras***

O trabalho desenvolvido fez parte de um acordo de colaboração científica estabelecido entre pesquisadores do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve (CCMAR) e do Instituto das Pescas e do Mar de Portugal (IPIMAR).

As amostras de tecido muscular de tubarões da espécie *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara, 1936) foram coletadas por observadores de bordo em navios da frota industrial portuguesa ao longo da costa africana ocidental (Oceano Atlântico). Nas análises desenvolvidas neste estudo foram utilizadas amostras de 125 indivíduos de ambos os sexos, coletadas com os registros de posicionamento geográfico e demarcadas pelo Sistema Global de Posicionamento (GPS), sendo 20 amostras provenientes da região denominada para este estudo de Equatorial Oeste, 35 amostras da região denominada Noroeste Africano, 56 amostras da região do Golfo da Guiné e 14 amostras da região do Sudoeste Africano (Figura 7). Ainda em campo, o material biológico coletado dos exemplares capturados e identificados foi acondicionado em frascos contendo etanol a 95% e enviado ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu, SP. Todas as amostras foram catalogadas e depositadas no banco de amostras de acordo com as normas do LBGP, credenciado no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositário de Amostras do Patrimônio Genético.



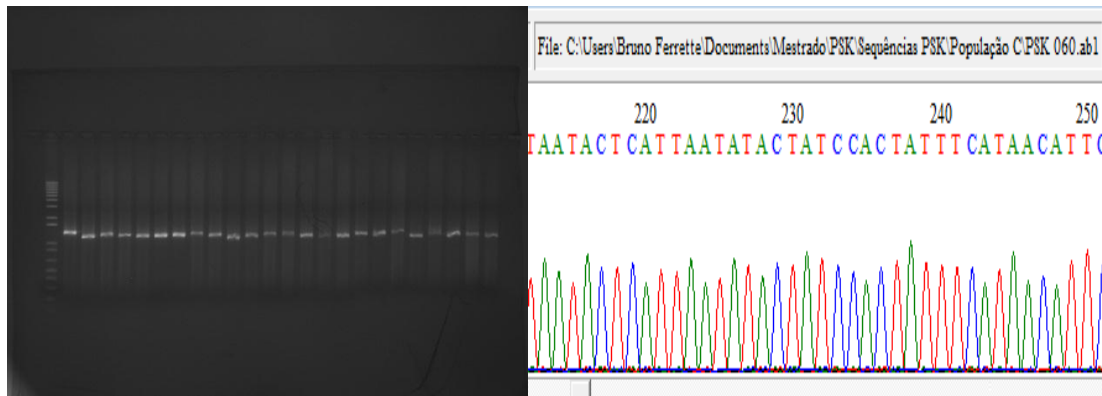
**Figura 7.** Grupos amostrais de tubarão-crocodilo, *P. kamoharai* e localidades dos indivíduos coletados. Em vermelho, zona Equatorial Oeste ; Amarelo, Noroeste Africano (zona de Cabo Verde e Mauritânia); Verde, Golfo da Guiné; Azul, SE Atlântico (zona da Namíbia).

### ***Extração de DNA, amplificação e sequenciamento***

O DNA genômico total foi extraído utilizando o kit Phire® Animal Tissue Direct PCR seguindo o protocolo: 5 ul de Tampão de diluição e 0,125 ul de

DNA Release Additive uma porção de 0,5 mm de diâmetro do tecido livre de etanol. Após a mistura dos reagentes, a solução contendo o tecido foi deixada durante 5 minutos em temperatura ambiente (~24°C) e 2 minutos a 98°C para desnaturar o DNA Release Additive. Após a desnaturação a extração do DNA está pronta para ser usada na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

A amplificação dos fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foi realizada utilizando reações em cadeia de polimerase (PCR) com 10,0 µl de volume final contendo: 3,6 µl de água ultra-pura autoclavada, 5 µl de tampão 2x *Phire® Animal Tissue PCR* (que inclui dNTPs e MgCl<sub>2</sub>), 0,25 µl de *primer Forward* (Pro-L 5'-AGGGRAAGGAGGGTCAAACCT-3') a 10µM, 0,25 µl de *primer Reverse* (282H 5'-AAFGCTAFFACCAAACCT-3') a 10 µM, 0,2 µl de *Taq DNA Polimerase (Phire® Hot Star II DNA Polymerase)* e 0,5 µl de DNA. A PCR seguiu o seguinte programa: denaturação inicial a 98°C durante 4 minutos; 30 ciclos com denaturação a 98°C durante 5 segundos, 55°C durante 5 segundos para anelamento e extensão a 72°C durante 30 segundos; extensão final durante 2 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados foram descritos em Keeney & Heist (2006). Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando Bluegreen®, sob luz azul.



**Figura 8.** À esquerda, constatação da amplificação da região D-loop em amostras de indivíduos de *P. kamoharai* visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando BlueGreen®, sob luz azul. À direita, eletroesferograma de uma sequência de um indivíduos de *P. kamoharai*.

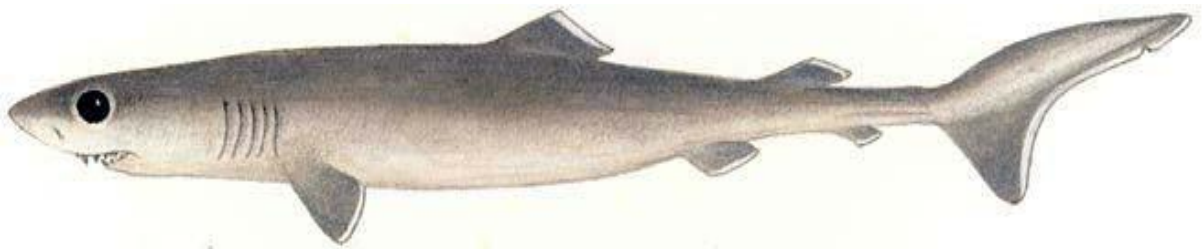
Uma reação de purificação enzimática foi realizada utilizando *ExoSAP-IT*® para o preparo das amostras amplificadas, antes das reações de sequenciamento de DNA. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir do seguinte protocolo: para cada amostra 2µl de pré-mix (fornecido no kit - Dye-Terminator), 2µl de produto de PCR purificado e 2µl de cada primer F (F - 5' CTC CCA AAG CCAAGA TTC TG - 3' and R 5' - GGC TTA GCA AGG TGT CTT CTT GG - 3') (10µM) sintetizado e descrito por (Mendonça et al. 2009), em termociclador. Em seguida, a composição nucleotídica destes fragmentos foi determinada no sequenciador automático ABI 3130.

### ***Análise das sequências***

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

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA com a aplicação do programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) que utiliza a estatística  $F$  de Wright (1951, 1965). Nestas análises foram avaliadas as subdivisões das variações genéticas. Para a análise de estruturação populacional segundo Wright (1978), os valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 configuram uma baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15, uma estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25, uma estruturação alta e acima de 0,25, uma forte estruturação genética. A significância estatística da  $F_{ST}$  é determinada pelas permutações não-paramétricas, considerando-se 1000 permutações (Excoffier *et al.* 2005). As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões. A matriz de distância genética e a árvore de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) e as redes de haplótipos foram elaboradas com critérios de parcimônia estatística utilizando o programa Network 4.6 (Bandelt *et al.* 1999).

# Resultados





## RESULTADOS

O sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de 125 indivíduos da espécie *P. kamoharai* resultou em 747 nucleotídeos analisáveis, com 15 sítios polimórficos, originando 22 haplótipos (Tabela 1). As frequências nucleotídicas observadas foram de A=0.317, T=0.342, C=0.207 e G=0.134. As diversidades haplotípicas ( $h$ ) e nucleotídicas ( $\pi$ ) foram  $h=0,627$  e  $\pi=0.00167$ , respectivamente. O valor obtido para a diversidade genética para a espécie ficou em  $0,4474\pm 0,1367$ . O haplótipo (1) mais comum, compartilhado por 74 indivíduos, foi encontrado em indivíduos de todas as regiões estudadas (Tabela 2).

As diversidades haplotípicas e nucleotídicas totais apresentaram altos índices de diferenciação, sendo a maior diversidade observada entre os indivíduos do grupo amostral da Golfo da Guiné ( $h=0.711$ ,  $\pi=0.00187$ ) e a menor diversidade foi identificada entre os indivíduos do Equatorial Oeste ( $h=0.447$ ,  $\pi=0.00125$ ) (Tabela 2).

**Tabela 1.** Sítios polimórficos da região controladora do mtDNA dos haplótipos da espécie *P. kamoharai*. Os haplótipos estão listados na coluna da esquerda e as posições dos sítios polimórficos apresentam-se na primeira linha.

		<b>Sítios Polimórficos</b>													
<b>Haplótipos</b>	<b>227</b>	<b>229</b>	<b>231</b>	<b>235</b>	<b>256</b>	<b>271</b>	<b>278</b>	<b>280</b>	<b>297</b>	<b>298</b>	<b>307</b>	<b>335</b>	<b>349</b>	<b>489</b>	<b>635</b>
1	G	T	T	A	A	A	C	T	C	C	G	T	G	T	A
2	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	C	.
3	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
4	A	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
7	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C
9	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
10	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.
12	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.
14	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.
16	A	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	C	.
19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
20	A	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.
21	A	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
22	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.

**Tabela 2.** Distribuição geográfica dos haplótipos de *P. kamoharai* com os números de indivíduos de cada região. Os haplótipos exclusivos de cada área amostrada estão apontados em cor tijolo.

Haplótipos	Equatorial Oeste	Noroeste Africano	Golfo da Guiné	Sudoeste Africano
1	15	21	28	10
2	<b>1</b>	-	-	-
3	<b>1</b>	<b>1</b>	2	-
4	<b>1</b>	2	3	2
5	<b>1</b>	3	13	<b>1</b>
6	<b>1</b>	-	-	-
7	-	2	<b>1</b>	-
8	-	<b>1</b>	-	-
9	-	<b>1</b>	-	-
10	-	<b>1</b>	-	-
11	-	<b>1</b>	-	-
12	-	<b>1</b>	-	-
13	-	-	<b>1</b>	-
14	-	-	<b>2</b>	-
15	-	-	<b>1</b>	-
16	-	-	<b>1</b>	-
17	-	-	<b>1</b>	-
18	-	-	<b>1</b>	-
19	-	-	<b>1</b>	-
20	-	-	<b>1</b>	-
21	-	-	<b>1</b>	-
22	-	-	-	<b>1</b>
Total	20	34	57	14

**Tabela 3.** Estatísticas populacionais de *P. kamoharai*: *n*, tamanho amostral; *N*, número de haplótipos; *h*, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica.

<b>Localidade</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>N</i></b>	<b><i>h</i></b>	<b><math>\pi</math></b>
Equatorial Oeste	20	6	0,447	0,00125
Noroeste Africano	34	10	0,617	0,00171
Golfo da Guiné	57	14	0,711	0,00187
Sudoeste Africano	14	4	0,495	0,00138
<b>TOTAL</b>	<b>125</b>	<b>22</b>	<b>0,627</b>	<b>0,00167</b>

Na estimativa de diferenciação genética pelo método de Análise de Variância Molecular (AMOVA) observa-se que não há estruturação entre todas as localidades estudadas ( $F_{ST}=0.00125$ ) (Tabela 4).

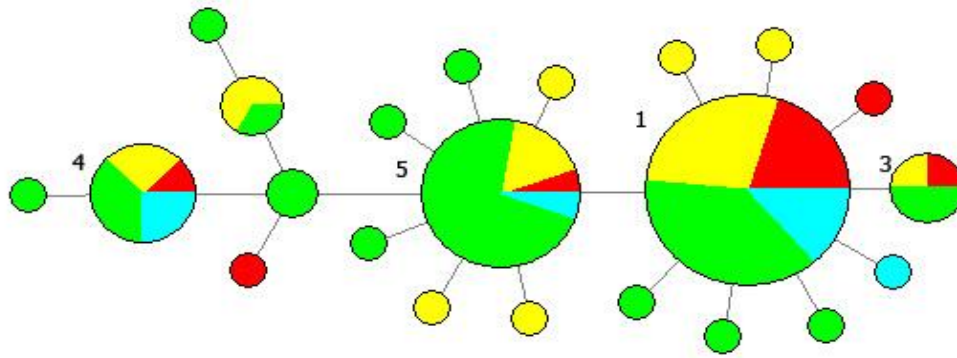
**Tabela 4.** Diferenciação genética  $F_{ST}$  entre os pares de populações de *P. kamoharai*. Nível de significância de  $p < 0,05$  em 1000 permutações.

	Equatorial Oeste	Noroeste Africano	Golfo da Guiné	Sudoeste Africano
Equatorial Oeste	0,00000	–	–	–
Noroeste Africano	-0,01628	0,00000	–	–
Golfo da Guiné	0,02274	-0,00399	0,00000	–
Sudoeste Africano	-0,04497	-0,003543	-0,00275	0,00000

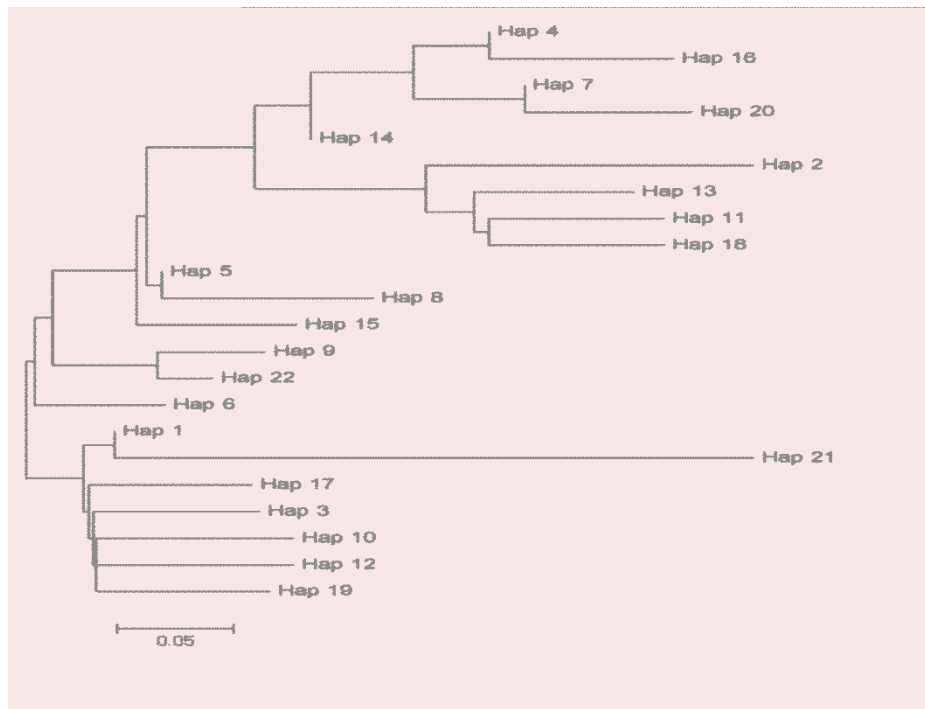
**Tabela 5.** Valores de  $F_{ST}$  encontrados para os agrupamentos arbitrários feitos a partir da proximidade geográfica dos indivíduos amostrados de *P. kamoharai*. Nenhum destes valores obteve significância estatística ( $p < 0,05$ ). Legenda: A: Equatorial Oeste, B: Noroeste Africano, C: Golfo da Guiné e D: Sudoeste Africano.

	<i>Hipóteses de Estruturação</i>	$F_{ST}$	$P$	<i>% da variação</i>
1	<b>AB / CD</b>	-0,00120	0,48485	0,84
2	<b>AC / BD</b>	-0,00542	0,51222	0,84
3	<b>AD / BC</b>	0,00547	0,50831	1,93
4	<b>ABC / D</b>	-0,01958	0,50538	-2,26
5	<b>A / BCD</b>	0,00125	0,49071	0,79
6	<b>B / ACD</b>	-0,01093	0,51222	-1,77
7	<b>C / ABD</b>	0,00596	0,50342	3,5
8	<b>A / BC / D</b>	-0,00418	0,52297	-0,18
9	<b>A / BD / C</b>	-0,00044	0,53763	3,44
10	<b>A / CD / B</b>	-0,00414	0,55230	-0,40

Como a rede haplotípica (Figura 9) e o dendograma (Figura 10.) não sugeriram agrupamentos geográficos, foram construídos reagrupamentos arbitrários hipotéticos entre grupos amostrais geograficamente mais próximos. Estes agrupamentos e seus respectivos valores de  $F_{ST}$  encontram-se descritos na Tabela 5.



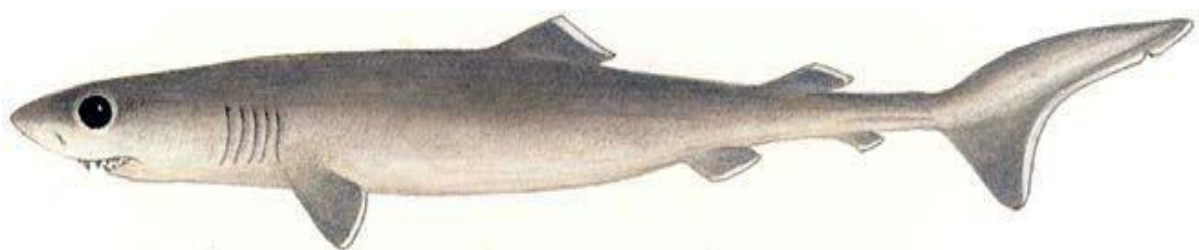
**Figura 9.** Rede de haplótipos com o agrupamento das localidades de coleta de *P. kamoharai*. Os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequências dos haplótipos. Em vermelho são indivíduos no grupo amostral do Equatorial Oeste; em amarelo da Noroeste Africano; em verde do Golfo da Guiné e em azul do Sudoeste Africano. Os números apresentados referem-se aos haplótipos mais frequentes e encontrados em todas as regiões amostradas.



**Figura 10.** Árvore de haplótipos de *P. kamoharai* construída utilizando o método Neighbor-Joining, com modelo evolutivo Kimura 2p e com 1000 réplicas de bootstrap.

Na rede de haplótipos e no dendograma elaborado utilizando apenas os haplótipos encontrados, não foram observados agrupamentos relacionados geograficamente que indicassem a existência de estruturação populacional.

# Discussão





## DISCUSSÃO

O tubarão-crocodilo *P. kamoharai* é encontrado em todos os oceanos, entre as latitudes 44°S e 37°N. No entanto, sua distribuição é mais heterogênea quando comparada com a distribuição de outras espécies com grande capacidade de migração como atuns, espadartes e outras espécies de tubarões pelágicos, tais como o tubarão azul (*Prionace glauca*) e o tubarão galha-branca (*Carcharhinus longimanus*) (Last & Stevens 1994). De um modo geral, o tubarão-crocodilo parece apresentar uma distribuição limitada a ambientes específicos. A espécie é abundante no Oceano Pacífico Tropical, mas rara em regiões subtropicais (Bailey et al. 1996, Molony 2005). Romanov et al. 2008 disseram ter encontrado um padrão oposto no Oceano Índico, onde a espécie é abundante em regiões subtropicais e rara nos trópicos. No Oceano Atlântico tropical ocidental, Hazin et al. (1990) forneceram a primeira evidência de que esta espécie era relativamente comum.

Romanov et al. (2008) sugerem que a abundância da espécie *P. kamoharai* está aumentando no Oceano Índico devido à diminuição da abundância de grandes predadores de topo, como os grandes tubarões, teleósteos e mamíferos marinhos. Contudo, não há registros sobre a predação da espécie por qualquer predador de topo que possam apoiar estas observações.

No presente estudo pode ser observado que *P. kamoharai* foi capturado em uma faixa latitudinal relativamente extensa, sendo o maior número de indivíduos capturados em regiões próximas ao equador no oceano Atlântico. Amorim et al. (1998) descreveram uma baixa abundância de *P. kamoharai* no

sul do Brasil, entre as latitudes: 17°S e 35°S. Da mesma forma, os dados obtidos nas coletas realizadas para este estudo, as frequências desta espécie também parecem ser menores ao Sul do continente africano.

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

Baixos índices de diversidade nucleotídica são comuns em estudos realizados utilizando a região controle do mtDNA como marcador molecular em tubarões, tanto entre as espécies pelágicas quanto costeiras. Para *Carcharias taurus*, Ahonen et al. (2009) encontraram valores de  $\pi=0,0041 \pm 0,00003$  e em estudos com *Galeorhinus galeus* e *Carcharhinus limbatus*, os valores de diversidade nucleotídica foram  $\pi=0,0071 \pm 0,0037$  e  $\pi=0,00214 \pm 0,0130$ , respectivamente (Keeney & Heist 2006, Chabot & Allen 2009).

Entre os representantes dos tubarões pelágicos, os valores de diversidade nucleotídica encontrados têm se mostrado relativamente baixos, como descrito por Hoelzel et al. (2006) em um estudo realizado com o tubarão-peregrino *Cetorhinus maximus*, onde foram encontrados valores de  $\pi=0,0013 \pm 0,0009$ . Para o tubarão baleia, foram encontrados valores de  $\pi=0,0011 \pm 0,006$

e para uma das espécies de tubarão-raposa (*Alopias. superciliosus*) foi encontrado um valor de  $\pi=0,00140 \pm 0,00047$  (Morales et al.). Estes valores se apresentam similares aos encontrados para a espécie *Pseudocarcharias kamoharai* no presente estudo ( $\pi=0.00167$ ) e tais resultados reforçam a hipótese de que tubarões pelágicos apresentam uma variabilidade genética que pode ser considerada muito baixa em relação àquela encontrada entre as espécies costeiras.

O valor de diversidade haplotípica encontrado no presente estudo ( $h=0.627$ ) também pode ser considerado baixo quando comparado aos de outras espécies de tubarões pelágicos. Em *C. taurus*, o valor de diversidade haplotípica encontrado foi de  $h=0,725 \pm 0,0002$  (Ahonen et al. 2009) e estudos com *G. galeus*, *C. limbatus* e *C. maximus* revelaram valores de  $h=0,92 \pm 0,01$ ,  $h=0,805 \pm 0,018$  e  $h=0,720 \pm 0,028$ , respectivamente, para estas espécies (Hoelzel et al. 2006, Keeney & Heist 2006, Chabot & Allen 2009). Para outros elasmobrânquios como *Rhincodon typus*, *Sphyrna lewini*, *Rhizoprionodon lalandii*, *Stegostoma fasciatum*, os valores de diversidade haplotípica foram de  $h=0,80 \pm 0,020$ ,  $h=0,974 \pm 0,008$ ,  $h=0,8239$  e  $h=0.484 \pm 0.112$ , respectivamente (Duncan et al. 2006, Castro et al. 2007, Mendonça et al. 2009b & Dudgen et al. 2009). A Tabela 6 abaixo ilustra valores de diversidade nucleotídica e haplotípica de algumas espécies de tubarões e de outros vertebrados pelágicos.

Pelas análises de variância molecular entre toda a área de estudo foi observada a inexistência de estruturação populacional para a espécie *P. kamoharai*, que apresentou o valor de  $F_{ST}=0.00125$ , característico de

populações panmíticas com alto grau de fluxo gênico entre indivíduos de toda a área de distribuição da espécie.

Nas análises de estruturação populacional através de cenários hipotéticos, também não foi observado qualquer agrupamento que pudesse caracterizar diferenciação populacional entre os grupos amostrais. Nas hipóteses 4 e 5, consideradas com maior probabilidade da existência de possível estruturação devido às disposições geográficas das amostras, também não foram observados indícios de diferenciação populacional.

**Tabela 6.** Diversidade da região do mtDNA em algumas espécies de vertebrados pelágicos (Elasmobrânquios, Teleósteos, Quelônios e Cetáceos).

Espécie	Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )	Diversidade Haplotípica (h)	Referências
<i>Cetorhinus maximus</i>	0.0013±0.0009	0.720±0.028	Hoelzel et al. (2006)
<i>Carcharhinus limbatus</i>	0.0021±0.0013	0.805±0.018	Keeney et al. (2005)
<i>Carcharias taurus</i>	0.004±0.00003	0.725±0.002	Ahonen et al. (2009)
<i>Sphyrna lewini</i>	0.013±0.0068	0.80±0.02	Duncan et al. (2006)
<i>Pristis zijsron</i>	0.0036±0.0026	0,555±0,078	Phillips et al. (2011)
<i>Pristis clavata</i>	0.004±0.0028	0.489±0.0072	Phillips et al. (2011)
<i>Pristis microdon</i>	0.0044±0.0029	0.65±0.0032	Phillips et al. (2011)
<i>Mustelus schimitti</i>	0.0015	0.226	Pereyra et al. (2010)
<i>Galeorhinus galeus</i>	0.0071±0.0037	0,92±0,01	Chabot & Allen (2009)
<i>Rhincodon typus</i>	0.0011±0.006	0.97±0,01	Castro et al. (2007)
<i>Triakis semifasciata</i>	0.0067		Lewallen et al. (2007)
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	0.004843±0.002941	0.8239	Mendonça et al. (2009)
<i>Alopias superciliosus</i>	0.00140 ± 0.00047	0.123 ± 0.00142	Morales et al.
<i>Stegostoma fasciatum</i>	0.089±0.086	0.484±0.112	Dudgen et al. (2009)
<i>Thunnus obesus</i>	0.054	0.98-1.0	Martinez et al. (2006)
<i>Xiphias gladius</i>	0.0148±0.0005	0.997	Lu et al. (2006)
<i>Thunnus thynnus</i>	0.015	0.991	Carlsson et al. (2004)
<i>Acanthocybium solandri</i>	0.053	0.999	Garber et al. (2005)
<i>Caretta caretta</i>	0.0236±0,0121	0.579±0.028	Bowen et al. (2004)
<i>Physeter macrocephalus</i>	0.002±0.0003	0.86	Lyrholm et al. (1996)
<i>Orcinus orca</i>	0.0053±0.0031	0.874±0.013	Hoelzel et al. (2002)
<i>Tursiops truncatus</i>	0.013-0.024	0.42-0.92	Natoli et al. (2004)
<i>Delphinus delphis</i>	0.012-0.021	0.853-1.0	Natoli et al. (2006)

A topologia da rede de haplótipos gerada para os grupos amostrais de *P. kamoharai* denota as divergências genéticas entre os indivíduos analisados, sem, contudo, apresentar correlações entre os diferentes ramos e as distribuições geográficas dos haplótipos. Na rede de haplótipos também é observado um padrão característico de populações não estruturadas. Tais resultados reforçam a hipótese de não haver estruturação populacional entre os grupos amostrais analisados, o que dá indicação de que todos os indivíduos fazem parte de uma única população e um de mesmo estoque no oceano Atlântico, não havendo diferenças significativas para agrupá-los em populações distintas.

A não significância estatística de  $F_{ST}$  e o fato de a grande maioria dos exemplares de *P. kamoharai* estudados apresentarem expressiva identidade em parte da região controle do mtDNA pode demonstrar a ausência de estruturação populacional da espécie na região amostrada e tais informações sugerem, portanto, a existência de um único estoque da espécie no oceano Atlântico. Um estudo global realizado com o tubarão-frade (*C. maximus*) também caracterizou ausência de estruturação genética entre as amostras estudadas, com valores não significativos de  $F_{ST}$  (Hoelzel *et al.* 2006). Por outro lado, embora ambas as espécies sejam consideradas grandes migradores pelágicos, Castro *et al.* (2007) encontraram estruturação populacional significativa entre as amostras de tubarão-baleia (*R. typus*) analisadas num estudo global envolvendo indivíduos capturados no oceano Atlântico, Oceano Índico e Pacífico, sendo que boa parte dos haplótipos encontrados nos exemplares do Atlântico mostrou-se exclusiva.

Estes resultados demonstram a necessidade de estudos genéticos e sua importância na história evolutiva dos organismos, bem como para o manejo das espécies exploradas comercialmente. Estudos filogeográficos que apresentem amostragens abrangentes e em escalas geográficas apropriadas, incluindo habitats com características ecológicas diferentes (como a oceânica e a continental, tropical ou subtropical) têm uma chance maior de detectar unidades evolutivamente significativas, que tornariam possível o desenvolvimento e aplicação de medidas de conservação adequadas (Rocha *et al.* 2007).

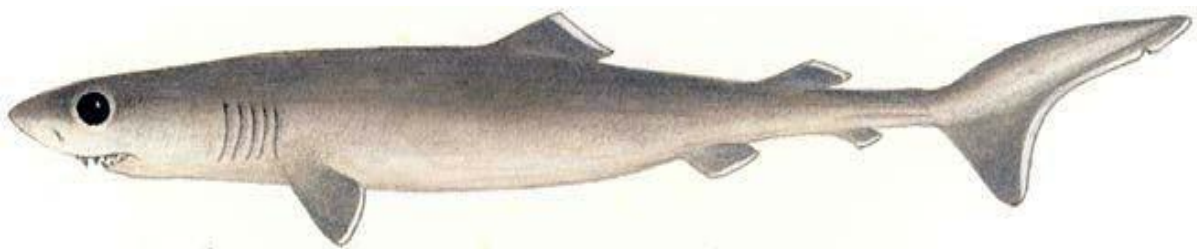
Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade da maioria das espécies de tubarões e raias à exploração pesqueira (Camhi *et al.* 1998), trabalhos sobre a estrutura populacional de muitas espécies de tubarões pelágicos vêm sendo publicados atualmente em uma maior frequência. Contudo, são necessários mais trabalhos envolvendo um maior número de localidades amostradas, pois como essas espécies habitam grandes áreas dos oceanos, torna-se necessário realizar em certos casos uma amostragem global da espécie e, deste modo, possibilitar a elaboração de planos adequados de manejo para estas espécies.

Neste contexto, estudos populacionais utilizando marcadores moleculares, como no presente estudo, constituem uma importante ferramenta para a caracterização da estrutura genética populacional das espécies pelágicas frequentemente pescadas e que devem ser levados em consideração para a formulação de planos de conservação e manejo. Como a ocorrência do tubarão-crocodilo abrange extensas áreas do oceano Atlântico, esforços e

cooperação internacionais serão necessários para a criação de um plano eficaz e sustentável de manejo e conservação desta espécie.

A expansão dos mercados globais por produtos de tubarão e do crescimento da pesca em alto-mar têm intensificado a pressão de exploração dos tubarões de mar aberto. A expansão da captura tem ocorrido na ausência de programas abrangentes de coleta de dados e regimes sustentáveis de gestão da pesca. Os estudos para avaliar os impactos da pesca industrial efetuada em ambientes pelágicos sobre os tubarões devem ser expandidos através da ação conjunta de recursos científicos, com o manejo desses recursos sendo realizado pelos países pesqueiros e por organizações regionais de gestão de pesca, como recomendado pela FAO no International Plan of Action (IPOA) para tubarões (FAO, 1999), CITES e IUCN (Cavanagh et al. 2009).

# Considerações Finais





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

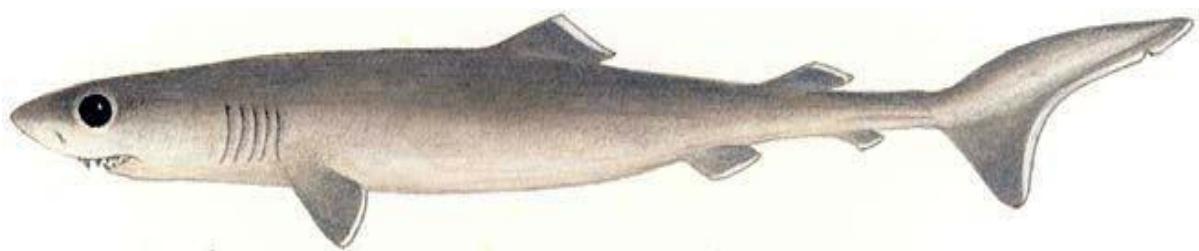
Os atuais níveis de sobrepesca aos quais os tubarões têm sido submetidos vêm causando drásticos declínios populacionais em diversas espécies, colocando várias delas nas listas de risco iminente de extinção. Entre os tubarões impactados pela pesca, a espécie *Pseudocarcharias kamoharai*, com ocorrência em todos os oceanos tropicais, encontra-se classificado como “Quase Ameaçado”, de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). Embora a espécie não seja relacionada entre os tubarões com valor comercial, sua captura “acidental” é bastante frequente. Considerando a importante relação entre a sustentabilidade de recursos pesqueiros com as características genético-populacionais, torna-se evidente a necessidade do conhecimento a respeito dos níveis e diversidade genética e sua distribuição geográfica, padrões de fluxo gênico e caracterização de unidades evolutivas significativas.

No presente trabalho apresentam-se os primeiros resultados sobre a estrutura genética populacional do tubarão-crocodilo ou tubarão-cachorro, *P. kamoharai*, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial de grupos amostrais representativos do Oceano Atlântico. Em todas as análises efetuadas observam-se índices relacionados à ausência de estruturação populacional, caracterizando um alto grau de fluxo gênico em toda a área geográfica amostrada. Para fins de gestão da pesca visando à conservação desta espécie, pode-se sugerir a existência de um único estoque de *P. kamoharai* nas localidades amostradas. No entanto, do ponto de vista

genético, a caracterização de um único estoque não deve ser considerado como um indicativo de status favorável à pesca. Os índices de moderada a baixa variabilidade genética encontrados podem representar um risco ao potencial evolutivo da espécie, além de promover uma menor habilidade populacional de resposta às alterações ambientais, podendo levar a espécie a um risco efetivo de extinção.

Para o conhecimento abrangente a respeito das populações de *P. kamoharai*, viabilizando a manutenção genética da espécie, mantendo-se os níveis atuais de captura, recomendam-se avaliações continuadas a respeito da variabilidade genética remanescente. Por outro lado, torna-se necessária e fundamental a continuidade e complementação deste estudo, compreendendo grupos amostrais que sejam representativos de toda a área de distribuição da espécie.

# Referências



## REFERÊNCIAS

- Abe T, Isokawa S, Aoki K et al. (1969) Notes on some members of Osteodonti (Class Chondrichthyes)-II. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* 60, 1–3.
- Ahonen H, Harcourt RG, Stow AJ (2009) Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Molecular Ecology*, 18(21):4409-4421.
- Alves-Gomes JA (1998) The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi; Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. p. 447-460.
- Alves-Gomes JA, Ortí G, Haygood M, Meyer M et al. (1995) Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12(2): p. 298-318.
- Amorim AF, Arfelli CA & Fagundes L (1998) Pelagic elasmobranchs caught by longliners off southern Brazil during 1974-97: an overview. *Marine and Freshwater Research* 49,621–632.
- Anonymous (2008) Proposal for inclusion of porbeagle shark *Lamna nasus* on the appendices of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (CITES). Prepared by the European Community and its Member States, Proposal II /10/ Rev.1, pp. 197–212.
- Avise JC (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans Roy Soc London B*. 312: 325-342.
- Avise JC (1994) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman and Hall, New York, pp 511.
- Avise JC, Arnold J & Ball RM et al. (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*.18, pp. 489-522. Pub. by: Annual Reviews Stable URL:<http://www.jstor.org/stable/2097141>.
- Avise TC, Giblin-Davidson C, Laerm J et al. (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic population of the pocket gopher, *Geomys pinelis*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6694-6698.
- Bailey K, Williams PG, Itano D (1996) By-catch and discards in western Pacific tuna fisheries: a review of SPC data holdings and literature. *Oceanic Fisheries Programme Technical Report, SPC, Noumea (New Caledonia)*. 34, 171p.

Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evo*, 16:37-48.

Baum JK, Myers RA, Kehler DG et al. (2003) Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science* 299:389-392.

Bechenbach AT, Thomas WK, Soharabi H (1990) Intraspecific sequenci variation and mitochondrial genome of raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genome*. 33:13-15.

Beheregaray LB, Sunnucks P & Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 65–73.

Billington N, Herbert P (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquati Sci*. 48: 80-94.

Bonfil R (1994) Overview of world elasmobranch fisheries. *FAO Fisheries Technical Paper*, 341. 119 pp.

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

Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle. *Molecular Ecology*, 14, 2389–2402.

Brown BL & Chapman RW (1991) Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Evolution*. 45:1147-1161.

Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1967-1971.

Cadenat J (1963) Notes d'Ichtyologie ouest-africaine XXXIX – notes sur les Requins de la famille des Carchariidae et formes apparentées de l'Atlantique ouest-africaine (avec la description d'une espèce nouvelle: *Pseudocarcharias pelagicus*, classée dans un sousgenre nouveau). *Bulletin de l'Institut Français d'Afrique Noire, Tome XXV, Serie A 2*, 526–537.

Camhi MD et al. (1998) The biology of the Chondrichthyan fishes, in *Sharks and Their Relatives. Ecology and Conservation*. IUCN Species Survival Commission 20, 39 pp.

Camhi MD, Lauck E, Pikitch EK et al. (2009a) A Global Overview of Commercial Fisheries for Open Ocean Sharks, in *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds) Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444302516.ch14.

Camhi MD, Valenti SV, Fordham SV et al. (2009b) *The Conservation Status of Pelagic Sharks and Rays: Report of the IUCN Shark Specialist Group Pelagic Shark Red List Workshop*. IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group. Newbury, UK. x + 78p.

Cappetta H (1987) *Chondrichthyes II, Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii*. Vol. 3B in *Handbook of Paleichthyology*. H.P. Schultze, Ed., Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munich, Germany, 193 pp.

Cappetta H, Duffin CJ & Zidela J (1993) Chondrichthyes, in *The Fossil Record*, Vol. 2. M.J. Benton, Ed., Chapman & Hall, London, 593–609.

Carlsson J, McDowell JR, Diaz-Jaimes P et al. (2004), Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13: 3345–3356. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02336.x.

Carroll RL (1988) *Vertebrate paleontology and evolution*. W.H. Freeman, New York. 698 pp.

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

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

Cavanagh RD, Fowler SL & Camhi MD (2009) Pelagic Sharks and the FAO International Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks, in *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444302516.ch38.

Chabot CL & Allen LG (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Molecular Ecology*, 18: 545-552.

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

Cigala-Fulgosi F (1992) Addition to the fish fauna of the Italian Miocene. The occurrence of *Pseudocarcharias* (Chondrichthyes, Pseudocarchariidae) in the lower Serravillian of Parma province, Northern Apennines, *Tertiary Research*, 14 (2): 51 – 60.

Clarke SC (2004) Understanding pressures on fishery resources through trade statistics: A pilot study of four products in the Chinese dried seafood market. *Fish and Fisheries* 5: 53–74.

Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL et al. (2006) Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conservation Biology*. 20(1), 201–211.

Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28:693-705.

Compagno LJV & Musick JA (2005) *Pseudocarcharias kamoharai*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 31 January 2012.

Compagno LJV (1973) Interrelationships of living elasmobranchs. In P.H. Greenwood, R.S. Miles and C. Patterson, eds. Interrelationships of fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society Supplement* 1, 53:15–61.

Compagno LJV (1984) FAO Species Catalogue. Vol. 4, Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. *FAO Fisheries Synopsis*. No. 125, Parts 1 and 2. FAO, Rome, Italy.

Compagno LJV (1990) Alternative life history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes* 28:33–75.

Compagno LJV (1999) Chapter 1. Systematics and body form. Pp. 1–42 in W.C. Hamlett, ed. *Sharks, Skates and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes*. Johns Hopkins Press, USA.

Compagno LJV (2000) An overview of chondrichthyan systematics and biodiversity in southern Africa. *Transactions of the Royal Society of South Africa*. 54(1):75–120.

Compagno LJV (2001) *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 1. Sharks of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of the Shark Species Known to Date. Vol. 2. Bullhead, Mackerel and Carpet Sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes)*. FAO, Rome, Italy, 269 pp.

Compagno LJV (2008) Checklist of oceanic sharks and rays. In *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*, Camhi MA, Pikitch EK (eds). Blackwell Publishing: Oxford.

Compagno LJV, Dando M, Fowler S. 2005. *Sharks of the world*. New Jersey: Princeton University Press. 368 p. (Princeton Field Guides).

De Carvalho M (1996) Higher-level elasmobranch phylogeny, basal squalians, and paraphyl. Pp. 35–62, figs 1–7 in M.L.J. Stiassny, R. Parenti and G.D. Johnson, eds. *Interrelationships of fishes*. Academic Press, San Diego, USA and London, UK.

Didier DA & Stehmann M (1996) *Neoharriotta pumila*, a new species of longnose chimaera from the Northwestern Indian Ocean (Pisces, Holocephali, Rhinochimaeridae) *Copeia* 1996 (4):955–965.

Didier DA (1995) Phylogenetic systematics of extant chimaeroid fishes (Holocephali, Chimaeroidei). *American Museum Novitates*. 3119.

Didier DA (1998) The leopard Chimaera, a new species of chimaeroid fish from New Zealand (Holocephali, Chimaeriformes, Chimaeridae). *Ichthyology Research* 45, 281–289.

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

Duffin CJ (1988) The Upper Jurassic selachian *Palaeocarcharias* de Beaumont (1960). *Zoological Journal of the Linnean Society* 94, 271–286.

Dulvy NK, Baum JK & Clarke S et al. (2008) You can swim but you can't hide: The global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18(5), 459–482.

Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, de Couet GH (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239-2251.

Eitner BJ (1995) Systematics of the genus *Alopias* (Lamniformes: Alopiidae) with evidence for the existence of an unrecognized species. *Copeia* 1995, 562–571.

Evans PGH (1987) *The natural history of whales and dolphins*. Croom Helm, London. 343 pp.

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

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

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

Ferris SD, Sage SD, Huang CM et al. (1983) Flow of mitochondrial DNA across species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80, 2290-2294.



Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (1999) International Plan of Action for Reducing Incidental Catch of Seabirds in Longline Fisheries. International Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks. International Plan of Action for the Management of Fishing Capacity, Rome, FAO, 26 pp.

Fowler SL, Cavanagh RD, Camhi M et al. (2005) *Sharks, Rays and Chimaeras: The Status of the Chondrichthyan Fishes. Status Survey*. IUCN/SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. x + 461 pp.

Fujita K (1981) Oviparous embryos of the pseudocarchariid shark, *Pseudocarcharias kamoharui*, from the central Pacific. *Japanese Journal of Ichthyology* 28, 37–44.

Garber AF, Tringali MD & Franks JS (2005) Population genetic and phylogeographic structure of wahoo, *Acanthocybium solandri*, from the western central Atlantic and central Pacific Oceans. *Marine Biology*, 147 (2005), pp. 205–214.

Graves JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89, 427–437.

Grogan ED & Lund R (2004) The origin and relationships of early Chondrichthyes. In: *Biology of Sharks and Their Relatives* (eds. J. C. Carrier, J. A. Musick and M. R. Heithaus). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3–31.

Haig SM (1998) Molecular contribution conservation. *Ecology*. 79, 413-425.

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

Hamlett WC & Koob T (1999) Female reproductive system. Pp. 398-443. In W. C. Hamlett (ed.), *Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranchs Fishes*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Harrison GR (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol.* 1989, 4, 6-11.

Harrison R & Bryden MM (1988) Whales, dolphins and porpoises. International Publishing Corp., Hong Kong. 240pp.

Hartl DL (2010) Princípios de genética de populações. Hartl DL, Clarck AG (tradução: Lura Roberta Pinto Utz, Maria Regina Borges-Osório, Nelson Jurandi Rosa Fagundes); consultoria, supervisão e revisão: Eizirik E. 4ªed. Porto Alegre. 660p. ISBN: 978-85-363-2305-3.

Hazin FHV, Couto AA, Kihara K et al. (1990) Distribution and abundance of pelagic sharks in the south-western equatorial Atlantic. *Journal of the Tokyo University of Fisheries.* 77, 51–64.

Heist EJ (2009) Molecular Markers and Genetic Population Structure of Pelagic Sharks, in *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444302516.ch28.

Hoelzel AR, Natoli A, Dahlheim ME et al. (2002) Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): Implications for demographic history. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 269, 1467–1473.

Hoelzel AR, Shivji MS, Magnussen J, Francis MP (2006) Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biol. Lett.* 2, 639–642. (doi:10.1098/rsbl.2006.0513).

Hoenig JM & Gruber SH (1990) Life-history patterns in the elasmobranchs: implications for fisheries management. Pages 1-16 in Pratt HL, Gruber SH & Taniuchi T eds. *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of fisheries*. NOAA Tech. Rep. NMFS 90.

Holden MJ (1974) Problems in the rational exploitation of elasmobranch populations and some suggested solutions. In: *Sea fisheries research* (Harden FR ed.), p. 117-137. John Wiley & Sons, New York.

Holden MJ (1977) Elasmobranchs. In: *Fish population dynamics* (Gulland JA ed.), Chap. 9. John Wiley & Sons, New York.

ICCAT. 2008. Report of the 2007 data preparatory meeting of the Shark Species Group. *ICCAT Collective Volume of Scientific Papers.* 62(5), 1325–1404.

Keeney DB & Heist EJ (2006) Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology.* 15, 3669–3679.

Kohler NE & Turner PA (2008) Stock structure of the blue shark (*Prionace glauca*) in the North Atlantic Ocean based on tagging data. In: *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA). Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Kohler NE, Casey JG & Turner PA (1998) NMFS cooperative shark tagging program, 1962–1993: an atlas of shark tag and recapture data. *Mar. Fish. Rev.* 60, 1–87.

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

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

Last PR & Stevens JD (1994) *Sharks and Rays of Australia*. CSIRO, Collingwood, Victoria, Australia, 513 pp.

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

Lewallen, E. A., Anderson, T. W. & Bohonak, A. J. (2007). Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology* 152, 599–609.

Li M, Wei F, Goossense B et al. (2005) Mitochondrial filogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fungens*): Implication for conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 78-89.

Long DJ & Seigel JA (1997) A crocodile shark, *Pseudocarcharias kamoharai*, (Selachii: Lamnidae) from pelagic waters off Baja California, Mexico. *Oceanides*. 12(1), 61-63.

Lu C-L, Chen CA, Hui C-F, Tzeng T-D & Yeh S-Y (2006) Population genetic structure of the swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the Indian Ocean and west Pacific inferred from the complete DNA sequence of the mitochondrial control region. *Zool. Stud.* 45.

Lyrholm T, Leimar O & Gyllensten U (1996) Low diversity and biased substitution patterns in the mitochondrial DNA control region of sperm whales: implications for estimates of time since common ancestry. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1318–1326.

Martin AP & Naylor GJP (1997) Independent origins of filter feeding in megamouth and basking sharks (Order Lamniformes) inferred from phylogenetic analysis of cytochrome *b* gene sequences, in *Biology of the Megamouth Shark*. K. Yano, J.F. Morrissey, Y. Yabumoto, and K. Nakaya, Eds., Tokai University Press, Tokyo, 39–50.

Martínez P, Gonzalez EG, Castilho R, Zardoya R (2006) Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Mol Phylogenet Evol.* 39, 404-416.

Mendonça FF et al. (2009) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotrop. ichthyol.*, Porto Alegre, v. 7, n. 2, June 2009.

Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology*. 7(2), 213-216.

Menezes NA, Buckup PA; Figueiredo JL & Moura RL (2003) Catálogo das Espécies de Peixes do Brasil. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 159p.

Molony B (2005) Estimates of catches and mortalities of seabirds, mammals, sharks and turtles in longline fisheries of the western and central Pacific Ocean, 1990-2004. Paper prepared for the workshop: Hook, Line and Bycatch: Setting the agenda for mitigation of bycatch in longline fisheries. Kota Kinabalu (Malaysia). 70p.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animals mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Eol Syst*. 18, 269-292.

Murphy RW, Sites JM, Buth DG et al. (1996) Proteins: Isozyme electrophoresis. In: *Molecular Systematics* (eds. Hillis DM, Moritz C & Mable BK). Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 51–120.

Musick JA, Burgess G, Cailliet G et al. (2000) Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries*. 25, 9–13.

Natoli A, Cañadas A, Peddemors VM et al. (2006) Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus* sp.). *Journal of Evolutionary Biology*. 19, 943–954. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.01033.x.

Natoli A, Peddemors VM & Hoelzel AR (2004) Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 363–375. doi: 10.1046/j.1420-9101.2003.00672.x.

Nelson JS (1994) *Fishes of the world*. 3rd edn. London:Wiley.

Oliveira P, Hazin FHV, Carvalho F et al. (2010) Reproductive biology of the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai*. *Journal of Fish Biology* 76, 1655–1670. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02606.x.

Ortí G, Petry P, Porto JIR et al. (1996) Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol Evol*. 42, 169-182.

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

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

Pestano J & Brown RP (1999) Geographical structuring of mtDNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266, 815–823.

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

Rocha LA, Craig MT, Bowen BW (2007) Phylogeography and the conservation genetics of coral reef fishes. *Coral Reefs* 26, 501–512

Romanov EV, Ward P, Levesque JC, Lawrence E (2008) Preliminary analysis of crocodile shark (*Pseudocarcharias kamoharai*) distribution and abundance trends in pelagic longline fisheries IOTC Working Party on Ecosystems and Bycatch (WPEB) Bangkok, Thailand. 20-22 October 2008. 29p.

Rozas J *et al.* (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19, 2496–2497.

Sadowsky V, Amorim AF & Arfelli CA (1988). Primeiro registro do ocorrência de *Pseudocarcharias kamoharai* (Chondrichthyes) no lado oeste do Oceano Atlântico. 15º Congr. Bras. Zool., Resumos, Curitiba, 31 de janeiro.05 de fevereiro de 1988, 275. (Abstract.).

Saitoh K, Miya M, Inoue JG *et al.* (2003) Mitochondrial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J Mol Evol.* 56, 464-472.

Sanetra M & Crozier RH (2003) Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol.* 12, 2281-2295.

Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH *et al.* (2008) Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology* 17(24), 5336-5348.

Shirai S (1996) Phylogenetic interrelationships of neoselachians (Chondrichthyes, Euselachii). pp. 9–34 in Stiassny MLJ, Parenti R and Johnson GR, eds. *Interrelationships of fishes*. Academic Press, San Diego, USA and London, UK.

Shu DG *et al.* (1999) Lower Cambrian vertebrates from south China. *Nature*. 402, 42-46.

Sivasundar A, Bermingham E & Ortí G (2001) Population structure and geography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol Ecol.* 10, 407-417.

Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236, 787-792.

Slatkin M (1993) Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution*, Vol. 47, No. 1 (Feb., 1993), pp. 264-279. Published by: Society for the Study of Evolution. Article Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2410134>.

Smith PJ (1986) Low genetic variation in sharks (Chondrichthyes). *Copeia*, Vol. 1986, No. 1, pp. 202-207.

Snelson FF, Roman BL & Burgess GH (2008) The reproductive biology of pelagic elasmobranchs. In: *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds. Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA). Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Stepien CA & Faber JE (1998) Population genetic structure. Philogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Mol Ecol*. 7, 1757-1769.

Szymura JM, Spolsky C, Uzzell T (1986) Concordant change in mitochondrial and nuclear gene in a hybridzone between two frog species (genus *Bombina*). *Experientia*. 41, 1469-1470.

Tamura K, Peterson D, Peterson N et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Thacker CE (2003) Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol*. 26, 354-368.

Utter FM (1991) Biochemical genetics and fishery management – An historical perspective. *Journal of Fish Biology*. 39, 1–20.

Vannuccini S (1999) *Shark Utilization, Marketing and Trade*. FAO Fisheries Technical Paper No. 389. FAO, Rome, Italy. 470 pp.

Ward RD, Woodward M & Skibinski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44, 213–232.

Ward, RD & Grewe, PM (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 4, 300–325. (doi:10.1007/BF00042907.)

Webb H, Hobday A, Dowdney J et al. (2008) Ecological Risk Assessment for the Effects of Fishing: Eastern Tuna & Billfish Fishery: Longline Sub-fishery. Report for the Australian Fisheries Management Authority.

White WT (2007) Biological observations on lamnoid sharks (Lamniformes) caught by fisheries in eastern Indonesia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 87, 781–788.

White WT, Last PR, Stevens JD et al. (2006) *Economically Important Sharks and Rays of Indonesia*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.

Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann Eugen.* 15, 323–354.

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

Wright S (1978). *Evolution and the Genetics of Populations: Variability Within and Among Natural Populations*, Vol. 4. Chicago: University of Chicago Press.

Yano K (1992) Comments on the reproductive mode of the false cat shark *Pseudotriakis microdon*. *Copeia*. 2, 460-468.

Yano K (1993) Reproductive biology of the slender smoothhound, *Gollum attenuatus*, collected from New Zealand waters. *Environmental Biology of Fishes*. 38, 59-71.