

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOTECNOLOGIA

SUHAILA KARIM KHALIL JASER

**Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico
ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação**

São Paulo

2020

SUHAILA KARIM KHALIL JASER

Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Co-orientador: Dr. Rodrigo Rodrigues Domingues

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Jaser, Suhaila Karim Khalil

Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação / Suhaila Karim Khalil Jaser; orientador Alexandre Wagner Silva Hilsdorf; coorientador Rodrigo Rodrigues Domingues. -- São Paulo, 2020.

133 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. GENÉTICA DE POPULAÇÕES. 2. CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA. 3. BIOLOGIA PESQUEIRA. I. Hilsdorf, Alexandre Wagner Silva, orientador. II. Domingues, Rodrigo Rodrigues, coorientador. III. Título.

Nome: JASER, Suhaila Karim Khalil

Título: Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de doutor em ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado *Biotechnologia aplicada ao estudo de agulhões e espartartes do Atlântico Ocidental: Abordagens sobre genética populacional*, protocolo nº 001/2016, sob a responsabilidade de *Prof. Dr. Alexandre W. S. Hilsdorf (orientador)* e *Suhaila Karim Khalil Jaser (orientanda)*, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi considerado APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Mogi das Cruzes em reunião de 17/02/2016. *

Vigência do Projeto*	<i>De 01/02/2016 à 30/06/2020.</i>
Espécie/ Linhagem	<i>Peixe/ Selvagem</i>
Nº de animais	<i>500</i>
Peso/Idade	<i>-</i>
Sexo	<i>M + F</i>
Origem	<i>Coleção de Amostras do Guy Harvey Institute Research</i>

*Orientação técnica nº5 do CONCEA, de 27 de abril de 2015.

Mogi das Cruzes, 17 de Fevereiro de 2016.

Prof.ª Dra. Maria Santana de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UMC

Prof.ª Maria Santana de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

*Esta tese é dedicada aos meus pais Anis K. K. Jaser e Eucileide C. de
Morais, com carinho e gratidão por terem investido em minha
educação e acreditarem na minha capacidade.*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a mim concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de iniciação científica e de mestrado que foram essenciais para meu desenvolvimento profissional e acadêmico, além da contribuição com o projeto de doutorado por meio de financiamentos ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA), onde o mesmo foi conduzido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder financiamento a diversos projetos conduzidos no LAGOAA, possibilitando compra de equipamentos e insumos, sem os quais esta tese não poderia ser desenvolvida.

À Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), por intermediar o recebimento de recursos do LAGOAA.

Ao Prof. Dr. Mahmood Shivji e à Dra. Andrea M. Bernard do Conservation Biology & Genetics Laboratory, Halmos College of Natural Sciences and Oceanography, Nova Southeastern University, por nos concederem amostras de *Tetrapturus pfluegeri* avaliadas no presente estudo e por todas as contribuições intelectuais e parcerias com o LAGOAA.

Aos doutores Freddy Arocha do Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente; Fábio Hissa Vieira Hazin do Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco; e Andrés Domingo da Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), Montevideo, Uruguay, pelas amostras de agulhões concedidas.

Ao Prof. Dr. Alberto Ferreira de Amorim pelas aulas, contribuições e apoio na pesquisa com peixes-de-bico.

Ao Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf pela orientação ao longo de oito anos, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pelo apoio na carreira acadêmica.

Ao Dr. Caio Augusto Perazza por toda a ajuda durante o andamento do projeto, por ter conduzido algumas das análises estatísticas e ter me auxiliado na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Rodrigo Domingos Domingues pela co-orientação no projeto de doutorado e auxílio com questões teóricas e análises estatísticas.

A todos os colegas de laboratório que, de alguma forma, estiveram presentes durante minha formação acadêmica, em especial à Ma. Letícia Rafaela de Moraes pela ajuda com experimentos de bancada, pela contribuição em decisões de questão experimental, pela parceria e amizade durante os anos em que trabalhamos juntas no LAGOAA.

Aos meus pais Anis K. K. Jaser e Eucileide C. de Moraes e meu irmão Eyas A. K. Jaser por todo o apoio, auxílio financeiro, suporte emocional e manutenção de minhas necessidades para que eu pudesse me dedicar às atividades acadêmicas.

À minha querida amiga Ma. Jaíra Bento do Prado por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, por sempre se lembrar de mim e se importar comigo.

Às minhas grandes amigas, Dra. Bianca C. S. Campitelli de Barros e Ma. Camila Kaori Z. H. de Lima pela amizade, apoio, suporte emocional durante os momentos difíceis e por compartilhar comigo a alegria das conquistas pessoais.

Agradeço também à minha sogra Roseli Ramos e à minha cunhada Rafaela Ramos por me receberem da melhor forma em sua família.

Ao meu namorado Me. Raul Cosme Ramos do Prado pelo companheirismo, apoio e suporte.

Por fim, agradeço aos meus gatinhos Gota e Francisco por me fazerem companhia, me proporcionarem alegria e felicidade e me fornecerem carinho em todos os momentos.

“O mar é generoso e belo. Mas pode tornar-se tão cruel e tão rapidamente, que aves assim, que voam mergulhando no mar e caçando com as suas fracas e tristes vozes, são demasiado frágeis para enfrentá-lo.”
(HEMINGWAY, 1952, p.32)

“Quantas pessoas ele irá alimentar? Mas serão merecedoras de um peixe assim? Não, claro que não. Ninguém merece comê-lo, tão grande a sua dignidade e tão belo o seu modo de agir.”
(HEMINGWAY, 1952, p. 74)

RESUMO

JASER, Suhaila Karim Khalil Jaser. **Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação.** 2020. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os peixes-de-bico (agulhões e espadarte) são distribuídos globalmente, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais, sendo representados por seis espécies no oceano Atlântico. Como grandes predadores, ocupam o ápice da cadeia alimentar, desempenhando um importante papel ecológico no ambiente marinho. Além disso, os peixes-de-bico são capturados acidentalmente pela pesca industrial e são alvos na pesca esportiva. Assim, mudanças na abundância de indivíduos podem resultar em efeitos negativos para a produtividade, estabilidade e estrutura dos ecossistemas marinhos. Devido à forte pressão sobre os estoques marinhos de peixes de interesse para pesca causada pelas mudanças ambientais e pesca predatória várias espécies têm seus estoques em processo de declínio populacional. Dessa forma, dados genéticos são importantes para o planejamento do manejo pesqueiro ao fornecer informações a respeito da distribuição, estrutura e diversidade genética das populações, além de ser uma ferramenta altamente precisa para identificar espécies quando caracteres morfológicos diagnósticos para uma identificação espécie-específica não estão disponíveis. Portanto, o presente trabalho objetivou empreender o primeiro estudo genético populacional de uma espécie de agulhão endêmica do oceano Atlântico, *Tetrapturus pfluegeri* (agulhão-verde ou *longbill spearfish*), utilizando marcadores moleculares nucleares e mitocondriais. Ademais, metodologias de genética forense foram aplicadas para se conhecer a composição de peixes-de-bico em comercialização na maior central de abastecimento de produtos agrícolas da América Latina, a CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo).

Palavras-chave: agulhões, pesca industrial, conservação, estoque pesqueiro, marcadores moleculares

ABSTRACT

JASER, Suhaila Karim Khalil. **Molecular biology applied to genetic studies of Western Atlantic billfish and swordfish: population aspects and forensic techniques for management and conservation.** 2020. 133 f. Thesis (Ph.D.) - Biotechnology Post Graduation Program. University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2020.

Billfish and swordfish species are globally distributed, inhabiting mostly in tropical and subtropical waters; six occur in the Atlantic Ocean. As big predators, they are in the apex of the food chain. Moreover, they are catch by the industrial fisheries and are target species in the sport fishing. So, changes in the population size can lead to negative effects on productivity, stability and structure of the marine environments. Due to the great pressure suffered by the marine fish stocks with economical value, induced by the environmental changes and predatory fishing, many species are suffering a process of population decline. Thus, genetic data works as a basis for fisheries management by providing information about the population's distribution, structure, and diversity. It is also a highly accurate tool for species identification when diagnosis morphological data for specie-specific identification are not available. Therefore, the present work was the first to assess population genetic data of a billfish species endemic of the Atlantic Ocean, *Tetrapturus pfluegeri* (longbill spearfish), using mitochondrial and nuclear molecular markers. Furthermore, DNA-based forensic tools were applied to find the marketed billfish and swordfish species composition in the largest central supply of agricultural products in Latin America, the CEAGESP (General Warehouse Company of São Paulo).

Keywords: billfish, industrial fishing, conservation, fisheries stocks, molecular markers.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução geral	13
1.1 Peixes-de-bico	13
1.2 Importância econômica dos peixes-de-bico	16
1.3 Estoque pesqueiro e gestão de pesca	17
1.4 Uso de marcadores moleculares em estudos genéticos populacionais de peixes-de-bico..	21
1.5 Marcadores moleculares para identificação de espécies	28
1.6 Objetivos.....	31
1.7 Justificativa e apresentação da tese	32
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2: Avaliação populacional do agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>) no Atlântico ocidental - implicações para o manejo pesqueiro e conservação de estoques.....	47
RESUMO	47
ABSTRACT	48
2.1 Introdução.....	49
2.2 Métodos	51
2.2.1 <i>Amostragem e isolamento do DNA genômico</i>	51
2.2.2 <i>Análises populacionais por DNA mitocondrial</i>	52
2.2.3 <i>Análise populacional por microssatélites</i>	54
2.3 Resultados.....	58
2.3.1 <i>Análises populacionais por DNA mitocondrial</i>	58
2.3.2 <i>Análises populacionais por microssatélites</i>	61
2.4 Discussão.....	68
2.4.1 <i>Diversidade genética</i>	68
2.4.2 <i>História demográfica de <i>Tetrapturus pfluegeri</i></i>	70
2.4.3 <i>Diferenciação genética</i>	72
2.4.4 <i>Conservação e manejo pesqueiro</i>	77
2.5 Conclusões.....	79
REFERÊNCIAS	80
CAPÍTULO 3 Genética forense aplicada à identificação de peixes-de-bico do Atlântico comercializados no sudeste brasileiro	89
RESUMO	89
ABSTRACT	90
3.1 Introdução.....	91
3.2 Métodos	94
3.3 Resultados.....	96
3.4 Discussão.....	99
3.5 Conclusões.....	102
REFERÊNCIAS	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
APÊNDICES	108
ANEXOS	132

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO 1: Introdução geral

1.1 Peixes-de-bico

O termo “peixes-de-bico” é utilizado para denominar algumas espécies de peixes ósseos marinhos que têm como principais características a presença de estrutura semelhante a uma lança (agulhões) ou espada (espadarte) na região frontal da cabeça; nadadeira dorsal que se estende ao longo de grande parte do corpo e nadadeiras pélvicas estreitas. As espécies existentes constituem dois grupos taxonômicos, (I) Xiphiidae, representado por uma única espécie, o espadarte (*Xiphias gladius*) e (II) Istiophoridae, composto pelos agulhões, os quais são atualmente representados por nove espécies organizadas em cinco gêneros. As espécies conhecidas até o momento e inseridas no grupo dos agulhões são: agulhão-vela (*Istiophorus platypterus*), agulhão-negro (*Istiompax indica*), agulhão-branco (*Kajikia albida*), espadim-raiado (*Kajikia audax*), agulhão-azul (*Makaira nigricans*), agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*), agulhão-polegar (*Tetrapturus georgii*), espadim-do-Mediterrâneo (*Tetrapturus belone*) e espadim-de-bico-curto (*Tetrapturus angustirostris*) (WILLIAMS et al., 2018). Existe também notificação de um terceiro grupo, a família Xiphiorhynchidae, cujos representantes já estão todos extintos (NAKAMURA, 1985).

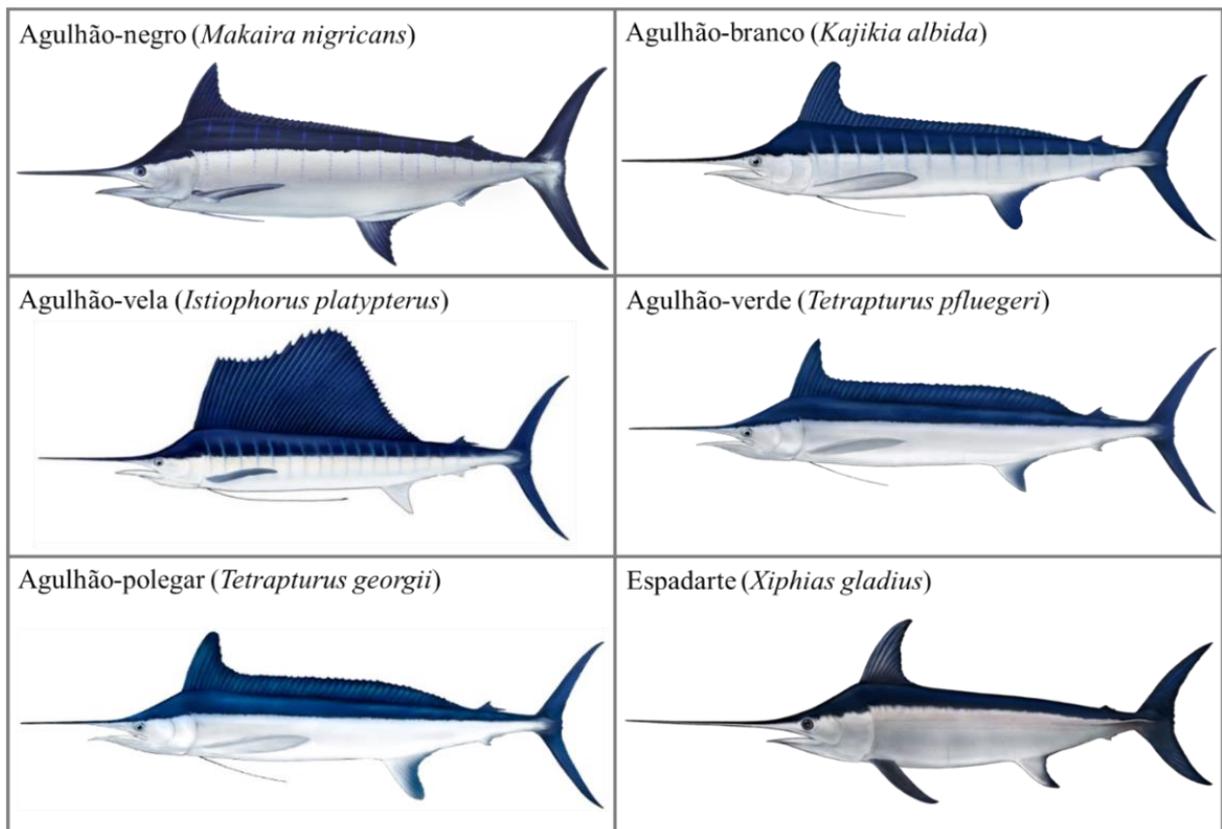
A origem evolutiva dos peixes-de-bico ainda permanece incerta, pois poucos fósseis foram registrados, indicando apenas que a origem do agulhão-vela, com base em um fóssil de fragmento de vértebra, ocorreu por volta de cinco a dois milhões de anos atrás, início do período Plioceno (GOTTFRIED, 1982). Já os representantes do gênero *Makaira* têm origem estimada a partir do fim do período Plioceno e meados do período Mioceno (FIERSTINE, 1990).

Esses peixes são distribuídos globalmente e podem ser encontrados desde próximo à superfície marinha até profundidades de mais de 500 metros. São definidos como espécies altamente migratórias, residindo tipicamente em águas tropicais e subtropicais, deslocando-se para regiões temperadas e de águas frias para se alimentar e reproduzir (HANNER et al., 2011). No oceano Atlântico, o grupo é representado por seis espécies: agulhão-branco, agulhão-verde, agulhão-polegar, agulhão-vela, agulhão-negro e espadarte (WILLIAMS et al., 2018) (**Figura 1.1**).

Como grandes predadores, os peixes-de-bico ocupam o ápice da cadeia alimentar marinha usando o bico alongado para golpear e atordoar cardumes de peixes. Dentre as presas mais comuns estão sardinhas (DOMENICI et al., 2014), atuns e lulas (ROSAS-ALAYOLA et al., 2002; LOOR-ANDRADE et al., 2017). Estas espécies se alimentam constantemente e

ingerem suas presas uma a uma (JÚNIOR et al., 2004), tanto inteiras como talhadas, quando são atingidas com o bico (DOMENICI et al., 2014). Estudos para análise de hábitos alimentares descrevem que os peixes-de-bico se alimentam preferencialmente de espécies epipelágicas, mas espécies mesopelágicas também fazem parte de sua dieta, demonstrando que esses peixes se deslocam até grandes profundidades em busca de suas presas (JÚNIOR et al., 2004; SHIMOSE et al., 2006; LOPES et al., 2009). Júnior et al. (2004), ao avaliarem o conteúdo estomacal de quatro agulhões do Atlântico verificaram que a chaputa (*Brama brama*) e a lula (*Ornithoteuthis antillarum*) foram os principais componentes de suas dietas. A chaputa é um peixe ósseo de tamanho médio que vive em pequenos cardumes e atingem até 70 cm na fase adulta (GENTNER, 2016) e a lula (*O. antillarum*) não excede 125 mm no Atlântico tropical onde pode ser encontrada tanto na zona epipelágica quanto mesopelágica (ARKHIPKIN et al., 1998).

Figura 1.1: Ilustrações das espécies de peixes-de-bico presentes no oceano Atlântico. Obs.: a ilustração não está representando tamanho real e proporcional de cada espécie. Fonte: modificado de ICCAT (2006-2016).



Os agulhões e o espadarte possuem corpos perfeitamente adaptados ao ambiente aquático. Suas características anatômicas favorecem a hidrodinâmica, conferindo a uma dessas espécies, o agulhão-vela, título de peixe mais rápido dos oceanos, podendo atingir até 120 km/h (ELLIS, 2013). Além disso, o peixe ósseo de maior peso já registrado no ranking de peixes esportivos pertence à espécie dos agulhões-negros, a qual possui registros de 1,26 a 3,68 metros de comprimento (HOOLIHAN et al., 2019).

Atualmente, sabe-se que as fêmeas possuem tamanhos significativamente maiores e têm vidas mais longas que os machos (DeMARTINI et al., 2007; KOPF et al., 2011; SHIMOSE et al., 2015; HOOLIHAN et al., 2019). DeMartini et al. (2007) avaliaram 1.336 espadartes capturados pela pesca pelágica na região do Hawaii e observaram que as fêmeas tinham entre 46 e 260 cm enquanto os machos estavam na faixa de 36 a 229 cm. Hoolihan et al. (2019) estimaram a idade de agulhões-negros do Atlântico por meio da contagem dos anéis de crescimento anual dos otólitos e raios da primeira nadadeira anal. Com isso, as maiores idades observadas pelos autores foram de 19,6 anos para machos e 31,3 anos para fêmeas. Sendo assim, o dimorfismo sexual nessas espécies se dá devido ao maior tamanho explícito das fêmeas (WILSON et al., 1991).

Dados sobre hábitos reprodutivos, áreas de reprodução e berçários naturais dos peixes-de-bico são ainda escassos. Sabe-se atualmente que o Golfo do México é reconhecido como uma área essencial para alimentação, desova e habitat para larvas e juvenis (SIMMS et al., 2010; CHEN, 2017). Além disso, Rooker et al. (2012) demonstraram que a concentração de larvas do agulhão-negro, agulhão-branco, agulhão-vela e espadarte depende de características físico-químicas das águas em que habitam. Os autores observaram que as larvas apresentavam maior abundância em águas costeiras com menor temperatura da superfície e maior salinidade, concluindo que a região Norte do Golfo do México é de grande valor para a reprodução dessas espécies.

A temperatura é um dos fatores que influencia a abundância, não só de larvas, mas também, de peixes adultos. O que foi demonstrado por Sedberry e Loefer (2001), em um estudo no qual exemplares de espadartes foram marcados com sensores de temperatura e profundidade. Os resultados indicaram movimentos diários para regiões com diferentes temperaturas, variando entre 10 a 27°C. Segundo os autores, esses dados mostram que para atingir regiões com temperaturas tão baixas quanto 10°C, os animais tem que mergulhar até profundidades entre 150 e 350 metros. Isso mostra um comportamento de migração vertical circadiana, na qual os animais costumam permanecer próximos à superfície, onde a temperatura é mais alta,

durante a noite, migrando para maiores profundidades durante o dia (SEDBERRY; LOEFER, 2001; CHANG et al., 2012; ELLIS, 2013).

A variação de temperatura ao longo das diferentes estações climáticas também é um importante fator para a reprodução dos peixes-de-bico. Muitos estudos procuraram identificar áreas usadas como berçários por meio da coleta e identificação de ovos e larvas em diferentes regiões e estações do ano (SERAFY et al., 2003; HYDE et al., 2006a, 2006b; RICHARDSON et al., 2009; ROOKER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017). Por exemplo, Rodrigues et al. (2017) identificaram agulhões-vela e agulhões-brancos, em estágios iniciais do desenvolvimento, na costa sudeste do Brasil durante o verão. Neste Estudo, os ovos e larvas foram verificados em águas superficiais onde a temperatura variou entre 23,07 e 26,2°C.

1.2 Importância econômica dos peixes-de-bico

Além de sua importância ecológica, devida ao fato de que mudanças na abundância de predadores podem influenciar o equilíbrio das redes tróficas, resultando em efeitos negativos para a produtividade, estabilidade e estrutura dos ecossistemas marinhos (ROOKER et al., 2012), os peixes-de-bico possuem grande importância econômica global. A pesca dos peixes-de-bico é uma prática antiga que começou com o uso de arpões até chegar nas práticas atuais de pesca esportiva e comercial com grandes frotas de pesca por espinhel (ELLIS, 2013). Segundo Holland et al. (1998), espécies como o agulhão-negro, agulhão-branco e agulhão-vela são uma grande atração turística, ao redor da qual existe considerável movimentação monetária. Por esses e outros motivos, muitas associações de pesca esportiva incentivam e auxiliam a conservação e a manutenção dos estoques pesqueiros, visando garantir as melhores experiências para os praticantes dessa atividade.

Com o objetivo de estabelecer regras na prática da pesca esportiva, foi fundada a IGFA (*International Game Fish Association*) em 1939, uma associação internacional de pesca esportiva sem fins lucrativos. Atualmente, a IGFA se dedica à conservação de peixes esportivos, promove a pesca responsável e registra os recordes dos maiores peixes pescados, contribuindo para o conhecimento científico (IGFA, 2018). Posteriormente em 1986, foi fundada a TBF (*The Billfish Foundation*), uma associação com foco em pesquisa que empreende um dos maiores programas de marcação e monitoramento de peixes-de-bico do mundo. Dentre as principais realizações da TBF, elenca-se o avanço e as melhorias para avaliações de estoques de peixes-

de-bico do Atlântico e do Pacífico; transição da pesca esportiva para atividades de marcação de peixes e a implementação de regulamentações para gestão e conservação que proíbem a retenção comercial e a venda de peixes-de-bico nos EUA (THE BILLFISH FOUNDATION, 2018).

Existe ainda uma terceira agência responsável por expandir o conhecimento a respeito das dinâmicas e condições dos estoques pesqueiros de grandes peixes pelágicos, a ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*), fundada em 1969. Entretanto, a partir de 2005, a ICCAT passou a ter como missão a conservação dos estoques de atuns e afins no Atlântico e oceanos adjacentes. Atualmente, aproximadamente 30 espécies são de interesse direto da ICCAT e entre elas estão inclusas o espadarte e todas as espécies de agulhões (ELLIS, 2013; GONÇALVES, 2019). A ICCAT estimou que nos anos de 2017 e 2018 a captura comercial de peixes-de-bico variou entre 350 e 20.559 toneladas. Além disso, ampliou seus objetivos para avaliar o uso do habitat pelos peixes adultos, estudar os padrões de propagação e a genética populacional (ICCAT, 2018).

1.3 Estoque pesqueiro e gestão de pesca

Para melhor entender as práticas de gestão pesqueira se faz necessário entender a definição de um estoque pesqueiro. Um estoque de peixes pode ser definido como todos os indivíduos pertencentes à mesma espécie vivendo na mesma área geográfica em um determinado tempo, ou seja, todos os indivíduos capazes de se reproduzir. Para fins de gestão, um estoque é, muitas vezes, definido por fronteiras políticas, isto é, a unidade de gerenciamento inclui os membros de um estoque biológico que estão sob gestão de uma única agência governamental. Com isso, quando os limites de estoque se estendem para além das jurisdições nacionais, apenas a cooperação internacional pode permitir o gerenciamento desses recursos biológicos (BOARD; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

Segundo Carvalho; Hauser (1995), o conceito de estoque abrange uma ampla gama de definições, dependendo do propósito. Em termos práticos (no manejo de recursos pesqueiros para fins comerciais) o estoque pode ser considerado como um grupo de peixes explorados em determinada área ou por um determinado método de captura. Outro conceito aplicado ao termo, citado pelos mesmos autores, é que estoque pesqueiro corresponde a um grupo de peixes da mesma espécie que habita uma mesma área e está dentro da faixa etária (ou tamanho) permitida para captura. Isso potencializa a exploração indiscriminada de um estoque e pode comprometer

populações distintas da mesma espécie. Já a definição proposta por Ihssen et al. (1981) descreve estoque como um grupo intraespecífico de indivíduos que se reproduz ao acaso com integridade espacial e temporal. Esta definição caracteriza um estoque modelo ou ideal.

Begg et al. (1999) determinaram que a sobreposição de todas as informações disponíveis, a respeito de estoque pesqueiro, permitiria o desenvolvimento de padrões consistentes e definitivos, relativos às necessidades de manejo de cada espécie. Ou seja, a necessidade de manejo, em escalas temporal e espacial, ditaria a escolha das técnicas para identificação dos estoques e o tipo de definição de estoque a ser adotada.

Neste contexto, os predadores de topo de cadeia são mais sensíveis às atividades pesqueiras, pois sua abundância é menor que a dos organismos em níveis intermediários e baixos da cadeia trófica. Além dos impactos causados pela pesca, esses peixes também são afetados quando há exploração e diminuição na abundância de suas presas (TREMBLAY-BOYER et al., 2011). Estudos prévios estimaram que aproximadamente 90% dos estoques de grandes peixes predadores foram perdidos em todos os oceanos devido à pesca predatória que ocorre em diversos ecossistemas marinhos (JACKSON et al., 2001; MYERS; WORM, 2003; MYERS et al., 2007; TREMBLAY-BOYER et al., 2011). Segundo Myers et al. (2007), a biomassa atual dos grandes predadores presentes nos oceanos representa somente 10% do que existia antes do advento da pesca industrial, levando à previsão de que tais níveis de declínio levarão a sérias consequências para muitas espécies. Contudo, atualmente ainda é aceito que estoques isolados sejam pescados com pequeno esforço de captura, o que acentua ainda mais as incertezas sobre o futuro dessas espécies.

Os dados mais recentes apresentados pelo ICCAT estimaram que os peixes-de-bico do Atlântico estão sobrexplorados (ICCAT, 2018) devido a seu alto valor econômico e distribuição cosmopolita, mostrando que esse grupo representa um recurso de grande importância para diferentes nações (DITTON; STOLL, 2003). Desde os anos 1950, a quantidade de peixes marinhos capturados para fins comerciais teve aumento gradual até o fim dos anos 1980 e início dos anos 1990. Essa atividade foi responsável pela pesca de pouco mais de 13 milhões de toneladas em 1965, atingiu o máximo de aproximadamente 72,9 milhões de toneladas em 1994, e se manteve entre aproximadamente 60 e 70 milhões de toneladas até 2018 (**Figura 1.2**) (FAO, 2020a). Os últimos dados estatísticos de produção pesqueira e aquicultura da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) mostraram que a captura marinha global atingiu 84 milhões de toneladas em 2018, onde a frota atuneira foi responsável pela captura de 7,9 milhões de toneladas, correspondente a 9,40 % da captura marinha total (FAO, 2020a).

Apesar do aumento crescente do volume capturado pela pesca atuneira, nos últimos anos os peixes-de-bico vêm apresentando uma discreta queda no volume de captura (**Figura 1.3**). O espadarte, por exemplo, teve aumento crescente de captura até 1992, quando atingiu um pico de 22,4 mil toneladas. A partir daí, a pesca desta espécie teve muitas oscilações e, em alguns anos, apresentou queda, atingindo aproximadamente 13,4 mil toneladas em 2004 e, até o ano de 2018 não voltou a alcançar o máximo registrado em 1992.

Para os agulhões do oceano Atlântico, a queda no volume de captura foi ainda mais expressiva (**Figura 1.3**). Até 1976, a captura do agulhão-vela, por exemplo, o agulhão mais capturado no Atlântico, apresentou aumento até atingir a marca de 5.896 toneladas, caiu para 1.787 toneladas em 1977 e se manteve oscilando entre aproximadamente 2,5 e 3,5 mil toneladas até 2018. O agulhão-branco, hoje em situação de vulnerabilidade (IUCN, 2020) e considerada sobreexplorada (ICCAT, 2018), teve diminuição considerável no volume de captura a partir de meados dos anos 1990. A pesca dessa espécie passou de um pico de captura de 1.169 toneladas, em 1983, para 349 toneladas em 2018, o que pode estar relacionado à proibição da pesca de agulhões em estado de vulnerabilidade, redução dos estoques naturais ou subnotificação.

Com esse cenário, práticas de gestão da pesca são necessárias para assegurar que os estoques pesqueiros possam continuar a ser explorados de forma sustentável e para auxiliar a recuperação de estoques já empobrecidos. Entretanto, essa não é uma tarefa fácil, pois as comunidades biológicas são altamente variáveis e os impactos adicionais das atividades pesqueiras ainda não são bem compreendidos (WARD, 2000).

O gerenciamento e a conservação dos organismos marinhos são tarefas desafiadoras por vários motivos, dentre os quais estão: a amplitude da distribuição das espécies; o manejo compartilhado por vários países; as dificuldades envolvidas na observação de determinadas espécies e na coleta de amostras para estudos (WAPLES, 1998). Além disso, a conservação de um recurso biológico aquático requer o conhecimento de variáveis fisiológicas, comportamentais e ecológicas, as quais são importantes na determinação de como uma dada população se mantém e se reproduz em diferentes ambientes (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006; SÁNCHEZ-MOLANO et al., 2013).

Figura 1.2: Volume, em toneladas, da captura global de peixes marinhos e peixes pelágicos para propósito comercial, recreacional e de subsistência, segundo dados disponibilizados pela FAO (2020b). Fonte: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>

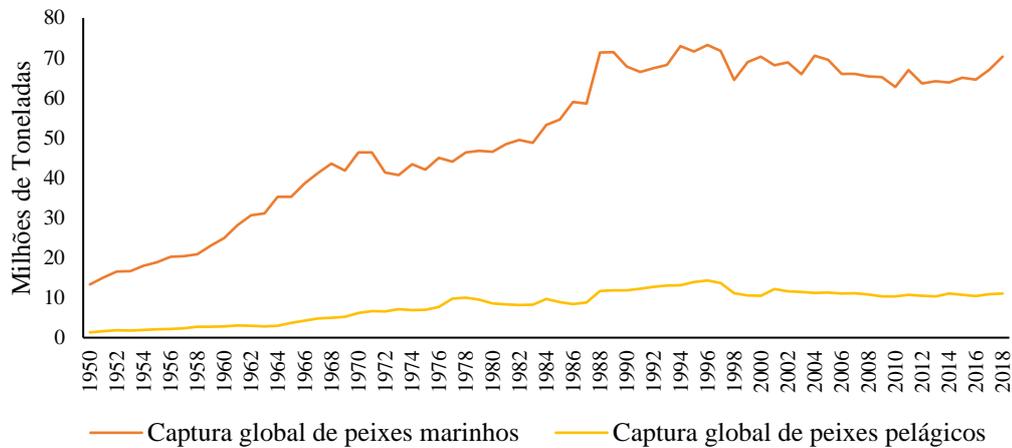
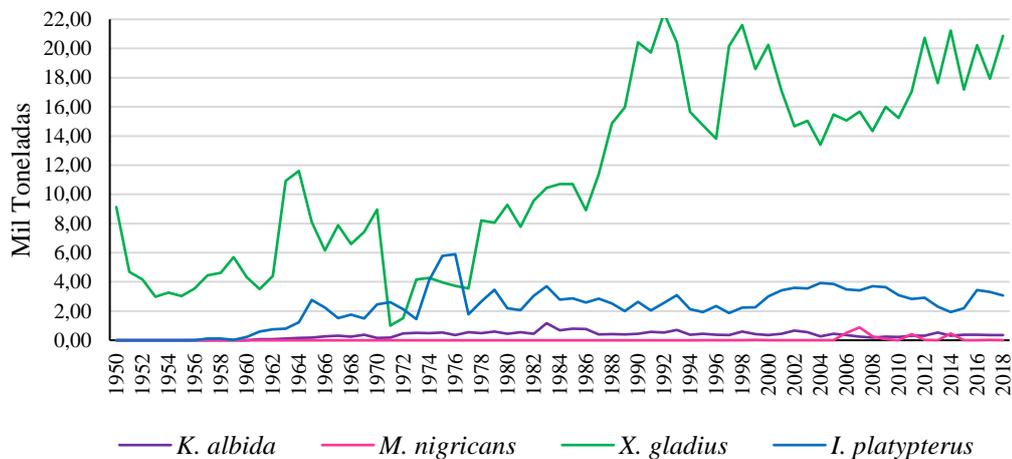


Figura 1.3: Volume da captura global das espécies *Kajikia albida* (agulhão-branco), *Makaira nigricans* (agulhão-azul); *Xiphias gladius* (espadarte) e *Istiophorus platypterus* (agulhão-vela) para propósito comercial, recreacional e de subsistência, segundo dados disponibilizados pela FAO (2020b). Fonte: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>



Dessa forma, os principais dados científicos necessários para uma gestão eficiente incluem: abundância e produtividade dos estoques e informações sobre a sua dinâmica, os quais podem ser obtidos por meio de marcações para monitoramento, dados morfométricos e dados genéticos (WARD, 2000). Nesse contexto, informações sobre a genética populacional possuem particular importância pois permitem entender a estrutura dos estoques, o fluxo gênico entre populações e a variabilidade genética de uma espécie (BEGG et al, 1999).

1.4 Uso de marcadores moleculares em estudos genéticos populacionais de peixes-de-bico

Uma gama de métodos já foi utilizada para avaliar aspectos populacionais de peixes marinhos, tais como: análise de parasitas (MARGOLIS; OTHERS, 1963); tamanho e forma corporal; idade e crescimento de estruturas calcificadas (CADRIN et al., 2014); composição química dos otólitos (KERR; CAMPANA, 2014) e marcações com recaptura (CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016). As dificuldades associadas a estes métodos são inúmeras. Por exemplo, no caso da marcação com recaptura, a marcação não pode interferir no comportamento e na taxa de mortalidade dos animais, um grande número de indivíduos devem ser marcados caso exista alta taxa de mortalidade na população e, além disso, os indivíduos marcados devem representar, da melhor forma possível, a população total. Levando em conta estas e outras limitações existentes nos métodos clássicos, os marcadores genéticos se tornaram cada vez mais populares por facilitar e aumentar a acurácia dos estudos populacionais (THORROLD et al., 2002).

A genética da conservação tem a genética populacional como seu principal componente, entretanto, ambas possuem interesses distintos. A genética de populações tem como foco central os processos e mecanismos envolvidos nas mudanças evolutivas. Em contrapartida, a genética da conservação trata dos efeitos da perda de diversidade genética e de alterações recentes na estrutura genética das populações, aspectos que podem afetar a sobrevivência, a longo prazo, de espécies ameaçadas (WAN et al., 2004). Assim, a diversidade genética e seus diferentes padrões podem fornecer pistas a respeito da história e do grau de isolamento evolutivo das populações, sendo que, populações pequenas apresentam consanguinidade e perda de diversidade genética, resultando em maiores riscos de extinção (OKUMUŞ; ÇIFTÇI, 2003; WAN et al., 2004).

Assim, os marcadores genéticos, ou marcadores moleculares, permitem observar e explorar variações genéticas, estejam elas, presentes no DNA mitocondrial (DNAm) ou no DNA nuclear (DNAn). Dentre as técnicas mais comuns usadas nos estudos com marcadores moleculares estão as análises por eletroforese de proteínas (alozimas); polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição (RFLP); polimorfismos no DNA amplificado aleatoriamente (RAPD); polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP); análises de microssatélite; polimorfismos de sítio único (SNP); e marcadores de sequência expressa (EST) (CHAUHAN; KUMAR, 2010; HILSDORF; HALLERMAN, 2017).

Durante os anos 1960, a eletroforese de proteínas era o método molecular disponível para estudar variações genéticas em *loci* codominantes com herança mendeliana (OKUMUŞ;

ÇIFTCI, 2003), a partir dos quais as diferenças alélicas de uma enzima refletem mudanças na sequência de DNA implícita. Com isso, as proteínas migram em ritmos diferentes quando passam através de um gel de eletroforese, dependendo das mudanças de aminoácidos decorrentes de sequências variáveis no gene codificante (CHAUHAN; KUMAR, 2010).

O uso de alozimas para avaliação de diversidade genética foi amplamente difundido em estudos com teleósteos, incluindo peixes marinhos de importância econômica (SMITH et al., 1990; WARD; GREWE, 1994; ALLEGRUCCI et al., 1997; LARSSON et al., 2007). Entretanto, esse marcador possui limitações importantes, como por exemplo, a impossibilidade de análise em pequenas quantidades de tecidos, impedindo sua aplicação em amostras pequenas. A maioria das enzimas são expressas em tecidos específicos e sua análise depende do tecido fresco, o que requer o sacrifício dos organismos devido a métodos invasivos de coleta e necessidade de armazenamento criogênico, visando preservar a atividade enzimática. Além disso, determinadas variações nucleotídicas não conferem variações nos aminoácidos resultantes ou, quando conferem, essas alterações não são passíveis de ser detectadas por eletroforese (OKUMUŞ; ÇIFTCI, 2003).

Sendo assim, para espécies e populações ameaçadas, ou para espécies com variabilidade enzimática limitada, a necessidade de métodos não invasivos e marcadores moleculares altamente polimórficos levou a buscas por marcadores mais eficientes (CARVALHO; HAUSER, 1998). Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987) surgiram novas possibilidades, como por exemplo examinar diretamente as variações na sequência de nucleotídeos em uma região genômica (SUNNUCKS, 2000; OKUMUŞ; ÇIFTCI, 2003). Para isso são necessárias amostras mínimas de tecidos que podem ser facilmente armazenadas em etanol (ou soluções que conferem estabilidade ao DNA), não havendo mais necessidade de sacrifício dos organismos estudados (CARVALHO; HAUSER, 1998). Justamente devido aos avanços que surgiram na área da biologia molecular no início dos anos 1990, as pesquisas sobre genética de peixes foram marcadas com o surgimento de estudos baseados nas variações em sequências de DNA, tanto nuclear quanto mitocondrial (CARVALHO; HAUSER, 1998).

O genoma mitocondrial é dotado de características responsáveis por permitir sua utilidade para traçar ancestralidade matrilinear e inferir histórias genealógicas diretas, fazendo dele uma valiosa ferramenta para estudos populacionais (PARKER et al., 1998; UNDERHILL; KIVISILD, 2007). Dentre essas características está o fato de ser composto por moléculas de DNA circular, de dupla fita, herdadas em um modelo não mendeliano, com transmissão uniparental (geralmente materna). Essas moléculas não sofrem recombinação e apresentam alta

taxa mutacional, especialmente na região controle (D-loop) (PARKER et al., 1998; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

Algumas das regiões do genoma mitocondrial evoluem em um ritmo mais dinâmico em comparação com outras regiões mitocondriais e nucleares, o que possibilita que sejam aplicadas para resolver diferentes escalas taxonômicas como identificação de espécies ou unidades populacionais dentro de espécies (CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016). Segundo Chauhan e Kumar (2010), o DNAm é a melhor ferramenta para resolver problemas taxonômicos.

Na década de 70, análises do DNAm foram estabelecidas como uma ferramenta poderosa para estudos evolutivos em animais (MORITZ et al., 1987). À medida que genomas mitocondriais completos foram sequenciados, variações foram identificadas e utilizadas como ferramentas efetivas para análises filogenéticas e populacionais (AVISE et al., 1987; SATOH et al., 2016). Avise et al. (1979) publicaram o primeiro estudo de filogeografia usando DNAm e demonstraram a existência de variações intra e interpopulacionais nas sequências de nucleotídeos em espécies de roedores. Os autores mostraram ainda que a variabilidade identificada foi eficiente para estimar relações entre indivíduos e populações (AVISE et al., 1979).

As regiões mitocondriais mais comumente aplicadas em estudos filogeográficos de peixes são: citocromo oxidase I e II; subunidades maior e menor do RNA ribossomal (RNAr); citocromo b (cit-b); e D-loop (CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016). Em estudo realizado por Satoh et al. (2016) foram encontradas informações precisas a respeito da estrutura e variação do genoma mitocondrial de peixes ósseos e cartilagosos. Este trabalho demonstrou que a região D-loop apresenta grande variação de comprimento (de 724 pb a 1.401 pb) entre diferentes espécies de teleosteos e que a posição relativa dos 4 domínios de sequência conservada (CSBs) é o mesmo reportado anteriormente para alguns vertebrados.

Trabalhos utilizando o DNAm em avaliações populacionais foram e continuam sendo publicados para um grande número de espécies de peixes marinhos (SMITH et al., 2001; ELY et al., 2005; NAKADATE et al., 2005; KUNAL et al., 2013; DOMINGUES et al., 2017; MORALES et al., 2018; GAO et al., 2019; GREEN et al., 2019; ZHANG et al., 2019a, 2019b), incluindo peixes-de-bico (FINNERTY; BLOCK, 1992; GRAVES; MCDOWELL, 1994b, 2006; GRIJALVA-CHON et al., 1994; ALVARADO BREMER et al., 1995; ROSEL; BLOCK, 1996; BUONACCORSI et al., 1999; BUONACCORSI et al., 2001; HOOLIHAN et al., 2004; ELY et al., 2005; MCDOWELL et al., 2007; PURCELL; EDMANDS, 2011; BERNARD et al., 2014; LU et al., 2014; RUBIO-CASTRO et al., 2016). Entretanto, o DNAm nos permite olhar por apenas uma das janelas evolutivas atuantes nos organismos. Sendo assim, a inferência

feita a respeito da história populacional de uma espécie pode ser altamente enviesada, tornando clara a necessidade de marcadores nucleares para sustentar e complementar análises populacionais (OKUMUS; CIFTCI, 2003).

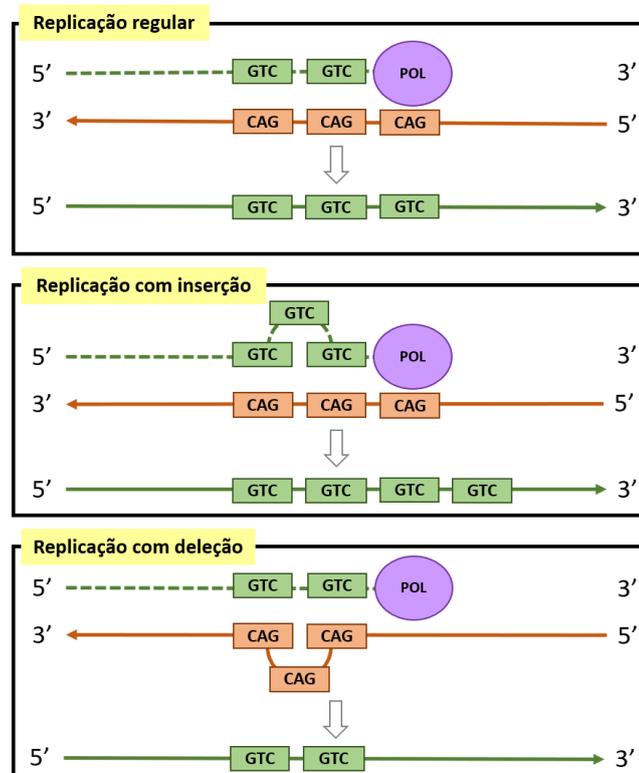
Desde meados dos anos 1990 (SCHLÖTTERER, 2004) até os dias de hoje os microssatélites estão entre os marcadores nucleares mais populares na literatura, pois são altamente informativos e podem ser isolados mesmo a partir de amostras com baixas concentrações e baixa qualidade de DNA (SCHLÖTTERER, 2004; DAWSON et al., 2013).

Também chamado de STRs (*short tandem repeats*) ou SSRs (*simple sequence repeats*), este marcador codominante possui herança mendeliana, é caracterizado por unidades de dois a oito nucleotídeos repetidos em tandem e está presente em todos os genomas eucarióticos (TAUTZ, 1989; OKUMUŞ; ÇIFTCI, 2003). Em um *locus* polimórfico, a variação no número de repetições entre indivíduos é decorrente do aumento ou diminuição no número de cópias de cada unidade formadora do microssatélite (*motif*) (**Figura 1.4**), o que é causado principalmente por eventos de *slippage*, ou deslize da DNA polimerase durante a replicação (TAUTZ, 1989; VARGAS, 2013).

Os microssatélites, geralmente, estão localizados em regiões não codificantes e, por isso, não estão sob pressão direta de seleção natural, o que permite a existência de alta variabilidade nessas regiões. Tais características fazem com que os microssatélites sejam eficientes para uma ampla gama de aplicações como, mapeamento genômico, genética forense, análise de parentesco, melhoramento genético, genética da conservação, estudos filogeográficos e genética populacional (LIU; CORDES, 2004; HODEL et al., 2016).

O primeiro *locus* microssatélite de peixe foi isolado da truta (*Salmo trutta*) (ESTOUP et al., 1993 apud CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016) e, imediatamente, aplicado na gestão de estoques da espécie (PRESA et al., 1994 apud CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016). A partir de então, microssatélites polimórficos vêm sendo amplamente identificados e aplicados em espécies de peixes com o objetivo de decifrar sua estrutura populacional (CUÉLLAR-PINZÓN et al., 2016; O'BRYHIM et al., 2015; CHABOT, 2015; GARCIA et al., 2019; ISMAIL et al., 2019; VAINI et al., 2019; LI-QIN et al., 2019; DAMMANNAGODA et al., 2011; NIKOLIC et al., 2015; KITANISHI et al., 2014; WILLIAMS et al., 2015; LU et al., 2014; BERNARD et al., 2012; BERNARD et al., 2014; KASAPIDIS et al., 2009; MUTHS et al., 2009 MUTHS et al., 2013), visando sua conservação e manejo adequados.

Figura 1.4: Inserção e deleção decorrentes do mau pareamento causado pelo evento de *slippage* ou deslizamento durante a replicação do DNA. O deslizamento da nova fita pode levar ao surgimento de novas unidades de repetição (inserção), já o deslizamento da fita molde pode levar à subtração de unidades repetitivas (deleção). Fonte: Jaser (2020).

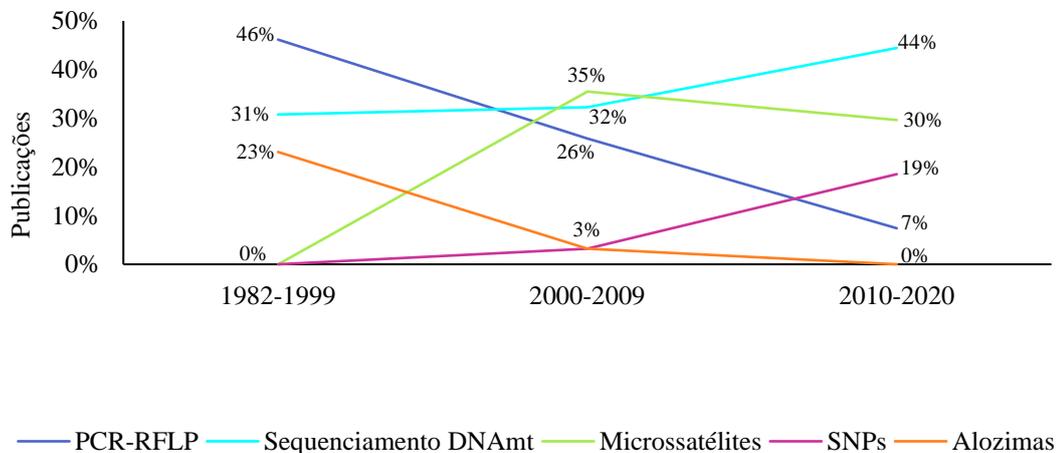


O primeiro estudo populacional para peixes-de-bico, por meio de marcadores moleculares, foi publicado em 1982 (SHAKLEE et al., 1983) e avaliou a diferenciação genética em agulhões-azuis, provenientes da região do Hawaii, utilizando alozimas. O próximo estudo nesta área foi publicado somente dez anos depois, para a mesma espécie (FINNERTY; BLOCK, 1992), utilizando sequenciamento de gene *cit-b*.

A partir de então os estudos genético-populacionais para os peixes-de-bico passaram a ser mais frequentes (**Apêndice D**). Por meio de uma extensa busca na literatura foi possível verificar que dentre as 13 avaliações populacionais de agulhões e espadarte conduzidas na década de 1990, 46% utilizaram PCR-RFLP (BUONACCORSI et al, 1999; CHOW et al., 1997; GRAVES; MCDOWELL, 1994a, 1994b) e 23% utilizaram alozimas (SHAKLEE et al., 1983; GRIJALVA-CHON; LA ROSA-VELEZ, 1996; BUONACCORSI et al., 1999). Ao longo do tempo, com o aprimoramento de técnicas no campo da biologia molecular e a descoberta de novos marcadores (SCHLÖTTERER, 2004), este cenário foi se modificando e, tanto a PCR-RFLP quanto as alozimas, passaram a ser cada vez menos empregadas.

Entre os anos de 2000 e 2009 os microssatélites e SNPs começaram a ser usados para avaliar diferenciação genética nos peixes-de-bico. Nesse período, os microssatélites foram aplicados em 35% dos estudos publicados, já os SNPs passaram a apresentar maior ascensão a partir de 2010, quando a porcentagem de estudos utilizando esse tipo de marcador chegou em 19% (SMITH et al., 2015; LU et al., 2016; MAMOOZADEH et al., 2019; WILLIAMS et al., 2020). Dentre os principais marcadores moleculares utilizados em avaliações populacionais desses grandes predadores pelágicos, o sequenciamento de regiões mitocondriais foi crescentemente empregado ao longo de todos os períodos. Esta abordagem já era bem conhecida nos anos 1990 e esteve presente em 31% dos estudos populacionais para agulhões e espadarte. Entre os anos de 2000 e 2009 esta proporção aumentou para 32%, a mesma dos microssatélites, atingindo 44% no período de 2010 a 2020 e ultrapassando a proporção de publicações que empregaram os demais marcadores (**Figura 1.5**)

Figura 1.5: Proporção de estudos sobre a genética populacional de peixes-de-bico utilizando diferentes marcadores moleculares publicados entre os anos 1982 a 1999, 2000 a 2009 e 2010 a 2020. Dados levantados no presente estudo por meio de pesquisa em periódicos científicos.



As estimativas feitas pelos estudos genético-populacionais em peixes-de-bico, algumas vezes, apresentam resultados variados, mesmo quando conduzidos com a mesma espécie e amostras provenientes das mesmas regiões. Por exemplo, a maior parte dos estudos populacionais realizados para *X. gladius* indica panmixia interoceânica e diferenciação genética entre oceanos (ALVARADO BREMER et al., 1995; ALVARADO BREMER et al., 2005; MUTHS et al., 2013). Entretanto, alguns autores detectaram diferenciação genética entre

populações pertencentes ao mesmo oceano, como Viñas et al. (2010), que identificou clara diferenciação genética entre populações do Mediterrâneo Ocidental e Mediterrâneo Oriental. Estruturação genética também foi verificada entre o Atlântico Norte e o Atlântico Sul (CHOW et al., 1997; CHOW et al., 2002; ALVARADO-BREMER et al., 2005), assim como entre regiões do oceano Pacífico, onde Lu et al. (2016) encontraram indícios da existência de dois estoques diferentes ($F_{CT} = 0.0022$, $p < 0.01$).

Tratando-se dos agulhões, o cenário é parecido, sendo que, uma espécie pode apresentar padrões populacionais diferentes dependendo da região avaliada ou do marcador utilizado. Por exemplo, em um estudo realizado com *K. albidus*, Graves e McDowell (2006) usaram sequenciamento do D-loop e estimaram que o fluxo gênico no oceano Atlântico é suficiente para impedir o acúmulo de diferenciação genética que cause estruturação populacional, porém, os autores relataram uma diferenciação pouco significativa, detectada entre duas sub-regiões 0,040 ($p = 0,045$), a qual merece análises mais profundas. A mesma espécie foi avaliada por Mamoozadeh et al. (2018), por meio do sequenciamento da região D-loop e 24 *loci* microsatélites, e estimou-se a existência de apenas um estoque distribuído por todo o oceano Atlântico. Os autores ainda destacaram que amplas amostragens e marcadores com maior poder estatístico resultaram em menores níveis de diferenciação genética, assim, quando o poder estatístico é baixo, existe maior chance de se detectar falsos sinais de estruturação populacional (MAMOOZADEH et al., 2018).

Dentre as espécies de agulhões que ocorrem no Atlântico, *Makaira nigricans* é a espécie para a qual existe maior número de estudos genético-populacionais. Resultados convergentes indicaram clara diferenciação genética entre os oceanos Pacífico e Atlântico (BUONACCORSI et al., 2001; BUONACCORSI et al., 1999; GRAVES; MCDOWELL, 1994b; SORENSON et al., 2013), além de panmixia intraoceânica em ambos os oceanos (MCDOWELL et al., 2007; WILLIAMS et al., 2020; GRAVES; MCDOWELL, 2001). Buonaccorsi et al. (1999) sugeriram que a divergência genética entre os oceanos, estimada por marcador mitocondrial, foi significativamente maior que a divergência estimada por *loci* nucleares. Segundo os autores, isso indica um período histórico de alopatria seguido de contato secundário recente.

Análises realizadas para *I. platypterus* têm demonstrado, por meio de distintos marcadores moleculares, que a espécie possui estruturação populacional no oceano Pacífico, (LU et al., 2015; RUBIO-CASTRO et al., 2016) e distribuição contínua no Atlântico (MCDOWELL; GRAVES, 2002). Além da diferenciação genética detectada entre os oceanos Pacífico e Atlântico (GRAVES; MCDOWELL, 1994b), Hoolihan et al. (2004) demonstraram

indícios de limitado fluxo gênico entre as regiões interna e externa do Golfo Pérsico, o que pode ter levado à estruturação populacional detectada no estudo.

Em vista deste breve panorama, é consenso nos estudos populacionais dos peixes-de-bico que os resultados até então obtidos não são conclusivos e existe necessidade de mais estudos com maior poder estatístico. Além disso, algumas espécies do Atlântico, como por exemplo *T. georgii* e *T. pfluegeri*, são carentes de estudos no âmbito da genética populacional. Sendo que para *T. georgii* existe apenas um estudo, no qual marcadores microssatélites e a região D-loop foram avaliados e revelaram resultados não conclusivos sobre a diferenciação genética em diferentes regiões do oceano Atlântico. Já para *T. pfluegeri*, tais estudos ainda não foram realizados.

1.5 Marcadores moleculares para identificação de espécies

Avaliações genético-populacionais em peixes selvagens ou de cativeiro são essenciais para interpretar, entender e manejar, de forma efetiva, as populações ou estoques pesqueiros (OKUMUŞ; ÇIFTCI, 2003). Segundo Ogden (2008), a importância em escala global da pesca comercial exige soluções que contribuam para a aplicação da lei e incentivem políticas de gerenciamento cada vez mais rigorosas. O autor ainda afirma que a identificação de espécies é o primeiro, e muitas vezes, o único procedimento a ser aplicado para garantir as conformidades com a lei.

Em casos nos quais a identificação morfológica não é possível, marcadores moleculares são ferramentas de grande eficiência e acurácia para sanar problemas relacionados à identificação de espécies (BINGPENG et al., 2018). Ao contrário das características morfológicas, o DNA pode ser extraído de produtos altamente processados e degradados (ALACS et al., 2010) como carne cozida ou seca (WONG et al., 2004), garras deixadas em peles curtidas (HEDMARK; ELLEGREN, 2005), nadadeiras de tubarões já secas (CHAPMAN et al., 2003), cascas de ovos (MOORE et al., 2003), pelos (BRANICKI et al., 2003), ossos (PRADO et al., 2002), marfim (WASSER et al., 2007), chifres (HSIEH et al., 2003), cascos (LO et al., 2006), penas (RUDNICK et al., 2007) e escamas (KUMAR et al., 2007).

Nos últimos anos, diferentes técnicas moleculares, baseadas nos polimorfismos dos genomas nuclear e mitocondrial, tem sido empregadas na identificação de espécies marinhas, entre as quais estão camarões (GUSMÃO et al., 2000), tubarões (SHIVJI et al., 2002), atuns

(BARTLETT; DAVIDSON, 1991), cefalópodes (CHAPELA et al., 2003; SANTA CLARA et al., 2007) e agulhões (HSIEH et al., 2007; DOMINGUES et al., 2015). Marcadores presentes no DNAm são, geralmente, favoritos devido à facilidade de identificação quando proveniente de amostras degradadas ou altamente processadas (ALACS et al., 2010). Além disso, o uso de DNAm se tornou um processo padrão na identificação de espécies, possibilitando comparações entre estudos conduzidos em diferentes laboratórios e permitindo um meio para padronizar metodologias (LINACRE; TOBE, 2011).

Existem muitas razões pelas quais o DNAm é o favorito nos estudos voltados à identificação específica, dentre as quais estão: (I) ausência de recombinações; (II) ausência de enzimas capazes de corrigir erros de incorporação de base durante a replicação, levando a um acúmulo de mutações de base única cinco vezes maior que no DNAn (TAYLOR; TURNBULL, 2005); (III) maior número de cópias por célula contra apenas duas cópias de DNAn, ou seja, cada mitocôndria possui várias cópias de DNA e cada célula possui várias mitocôndrias, o que varia dependendo do tipo celular (TOBE; LINACRE, 2008).

As regiões mitocondriais de escolha para a identificação forense são baseadas naquelas utilizadas em estudos taxonômicos e filogenéticos (SIMON et al., 2006). Algumas regiões do DNAm exibem baixa variabilidade entre indivíduos pertencentes à mesma espécie e maior variabilidade entre indivíduos de espécies diferentes, permitindo a estimativa do grau de parentesco e tempo de divergência entre espécies. Em outras palavras, são sequências de DNA consideradas “relógios moleculares calibrados” (OGDEN et al., 2009; LINACRE; TOBE, 2011).

Hebert et al. (2003) propuseram o uso do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) como núcleo de um sistema para identificação de espécies animais que possui duas principais vantagens. A primeira, é que o *primer* universal para esse gene é robusto e permite cobertura para a maioria dos filos animais. A segunda, é que o COI parece possuir maior região de sinal filogenético quando comparado aos demais genes mitocondriais.

Com isso, o uso do COI continuou aumentando até que, em 2007, foi adotado pelo Consórcio *BOLD* (*The Barcode of Life Data System*) (<http://www.boldsystems.org/>), um banco de dados online que permite a aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros de sequências do COI, usadas para identificação específica (RATNASINGHAM; HEBERT 2007). Apesar da eficácia e disseminação de seu uso, o sistema *BOLD* requer que o gene COI, ou parte dele, seja sequenciado para comparação com as sequências de diversas espécies, já existentes no banco de dados, tornando esse método mais custoso quando comparado a técnicas mais simples.

A distinção entre espécies taxonomicamente relacionadas pode ser averiguada por diferenças na sequência de um dado trecho de DNA que se localiza em sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição e pode ser alvo de aplicação da PCR-RFLP (OGDEN, 2008). A sigla RFLP significa ‘polimorfismo de comprimento em fragmentos de restrição’ (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e é uma técnica de baixo custo, de protocolos simples, robustos, de fácil reprodução e requer o uso de poucos equipamentos, o que confere vantagens sobre o sequenciamento (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2008). Esta técnica se baseia no fato de que os SNPs podem levar ao surgimento ou desaparecimento de sítios reconhecidos por determinada enzima de restrição, mudando o padrão de fragmentos gerados em amostras de DNA de diferentes indivíduos, os quais podem ser facilmente visualizados por meio de eletroforese (SCHLÖTTERER, 2004).

Ao aplicar a PCR-RFLP na análise de regiões específicas do DNAm, muitos autores passaram a usar tal abordagem para identificar espécies a partir de amostras forenses (CORDES et al., 2001; ZHANG et al., 2006), assim como para identificar uma gama de espécies marinhas em estudos sobre fraudes no comércio pesqueiro (INNES et al., 1998; MCDOWELL; GRAVES, 2002; HSIEH et al., 2007; DOMINGUES et al., 2015). Por exemplo, Lin e Hwang (2007), por meio dessa técnica, conseguiram identificar oito espécies em 18 amostras de atum enlatado, comercializados em Taiwan. Akasaki et al. (2006), desenvolveram uma metodologia baseada em PCR-RFLP que foi capaz de identificar se amostras de bacalhau importado para o Japão eram provenientes de espécies regulamentadas.

Recentemente, um método baseado em PCR-RFLP, desenvolvido por Anjali et al. (2019), foi capaz de diferenciar, com precisão, seis espécies de garoupa, do gênero *Epinephelus*, capturadas na costa da Índia. Segundo os autores, a técnica pode ser aplicada para monitorar fraudes envolvendo essas espécies em amostras frescas, congeladas, cozidas e, até mesmo, processadas. Similarmente, Matsumoto et al. (2019) descreveram a diferenciação de quatro espécies de truta, por meio de PCR-RFLP, visando sua aplicação no monitoramento de fraude comercial onde *Oncorhynchus masou rhodurus* é substituída por espécies aparentadas de menor valor comercial.

Chow (1994), inspirado em estudos que isolaram o gene mitocondrial *cit-b* e utilizaram sua sequência para diferenciar espécies de atum e bacalhau (BARTLETT; DAVIDSON, 1991; CARR; MARSHALL, 1991), desenvolveu, pela primeira vez, um protocolo para identificar espécies de peixes-de-bico por meio de PCR-RFLP, evitando, assim, o custoso e demorado sequenciamento. Para isso, o autor testou treze endonucleases de restrição em fragmentos amplificados do *cit-b* de Istiophoridae e identificou nove enzimas capazes de diferenciar dez

espécies pertencentes aos oceanos Atlântico e Pacífico. Além disso, um protocolo baseado na PCR-RFLP foi desenvolvido por INNES et al. (1998) para identificar seis espécies de agulhões encontrados na costa da Austrália utilizando quatro enzimas de restrição para digerir a região D-loop.

Hsieh et al. (2005) desenvolveram e utilizaram, de maneira aplicada (HSIEH et al., 2007), um protocolo de PCR-RFLP capaz de detectar o espadarte e quatro espécies de agulhões em produtos contendo carne crua, congelada ou cozida. Os autores amplificaram o cit-b, que foi digerido com três enzimas de restrição e detectaram duas (dentre dez) amostras comerciais fraudulentas, vendidas como peixe-de-bico, demonstrando a eficiência e rapidez do método em detectar produtos enganosos para os consumidores.

Devido à inexistência de um protocolo capaz de identificar as seis espécies de peixes-de-bico que ocorrem no oceano Atlântico e, à presença de duas espécies em estado de vulnerabilidade nessa região, Domingues et al. (2015) desenvolveram um método de PCR-RFLP da região COI. Esta abordagem foi capaz de diferenciar o espadarte e as cinco espécies de agulhões encontradas no Atlântico, incluindo *T. georgii*, espécie recém validada (COLLETTE et al., 2006; SHIVJI et al., 2006), utilizando apenas duas enzimas de restrição. Segundo os autores, esta abordagem foi capaz de identificar, com precisão, larvas e indivíduos adultos, podendo ser aplicada para fiscalizar o comércio ilegal de peixes-de-bico ao longo de todo o oceano Atlântico.

1.6 Objetivos

Devido à importância ecológica e valor econômico dos peixes-de-bico e à relativa escassez de estudos a seu respeito, os objetivos da presente tese foi testar a hipótese de panmixia da espécie *Tetrapturus pfluegeri* ao longo do oceano Atlântico ocidental Norte e Sul por meio de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais. Além disso, o presente estudo propôs escrutinar a composição de espécies de peixes-de-bico comercializadas na maior central de abastecimento e distribuição de produtos agrícolas da América Latina, a CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) usando identificação molecular por PCR-RFLP.

1.7 Justificativa e apresentação da tese

O ambiente marinho é regido por um delicado equilíbrio ecológico, no qual predadores que ocupam níveis tróficos superiores têm papel fundamental no controle demográfico de outras espécies por meio da predação direta e por induzir respostas comportamentais em suas presas (CREEL; CHRISTIANSON, 2008). Dentre os predadores de topo estão os mamíferos marinhos, tubarões e grandes peixes teleósteos (HEITHAUS et al., 2008), valendo ressaltar que algumas espécies de tubarões, atuns e peixes-de-bico, são peças-chave da cadeia trófica de ambientes pelágicos (BORNATOWSKI et al., 2018).

Alguns estudos vêm demonstrando que a pressão exercida pela pesca industrial tem reduzido a biomassa dos grandes predadores pelágicos em altas porcentagens (MYERS; WORM, 2003; HUTCHINGS; REYNOLDS, 2004; WORM et al., 2009; WORM et al., 2015), reforçando a necessidade de regulamentações para a exploração dessas espécies. Com esse intuito, duas grandes organizações internacionais, a IGFA (*International Game Fish Association*) e a ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*), têm como principais objetivos fazer o levantamento da estatística pesqueira, monitorar a pesca e manejar estoques, assim como, desenvolver e estabelecer regulamentações para a exploração de atuns e peixes-de-bico (ICCAT, 2018; IGFA, 2019).

A adoção de estratégias adequadas de manejo depende de um bom entendimento a respeito das dinâmicas populacionais e da demografia das espécies marinhas, principalmente aquelas que possuem grandes populações e habitam largas extensões geográficas (WRIGHT et al., 2015). Assim, estudos genéticos de espécies marinhas possuem um poderoso e único papel para o conhecimento de estratégias eficazes de conservação e manejo a longo prazo, visto que, o ecossistema marinho tem enfrentado impactos antropogênicos em níveis globais e sem precedentes (SELKOE et al., 2016; DOMINGUES et al., 2019).

Dentre os peixes-de-bico existentes no oceano Atlântico, o agulhão verde é o único para o qual ainda não existe estudo genético-populacional. Assim, o presente estudo buscou responder à hipótese de panmixia do agulhão-verde no oceano Atlântico ocidental para um melhor entendimento sobre o número de estoques existentes, visando subsidiar futuros planos de manejo para a espécie.

Além disso, a fiscalização e o manejo adequado para esses animais dependem de identificação precisa das espécies capturadas e comercializadas. Por esta razão e pelo fato de existir uma grande dificuldade na identificação por características morfológicas, o presente

estudo procurou verificar se espécies com captura comercial proibida, como os agulhões branco e azul, vêm sendo comercializadas no Sudeste Brasileiro.

Para responder a estas questões, a presente tese está apresentada em três capítulos, onde o Capítulo 1, descrito acima, ofereceu uma breve descrição a respeito do assunto aqui estudado; o Capítulo 2 apresentará o primeiro estudo genético-populacional do agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*), a única espécie de peixe-de-bico do oceano Atlântico para a qual não existem estudos sobre o tema; e o Capítulo 3 descreverá a aplicação de uma análise molecular forense para identificar e quantificar espécies de peixes-de-bico do Atlântico, comercializados na (CEAGESP), atualmente submetido para publicação na revista *Conservation Genetics Resources* (**Anexo B**). Como pode ser visto no fluxograma a seguir.

Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação

Capítulo 2: Avaliação populacional do agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*) no Atlântico Ocidental: implicações para manejo pesqueiro e conservação de seus estoques

Capítulo 3: Genética forense aplicada à identificação de peixes-de-bico do Atlântico comercializados no sudeste brasileiro.

Objetivos: avaliar aspectos populacionais do agulhão-verde do Atlântico Ocidental.

Objetivos: identificar espécies de peixes-de-bico comercializadas na terceira maior central de distribuição de produtos agrícolas do mundo, a CEAGESP.

Amplificação e sequenciamento parcial da região D-loop.

Amplificação e genotipagem de microssatélites.

Avaliações de diferenciação genética (Φ_{st}) entre as localidades CAR e BRA.

Avaliações de diferenciação genética (F_{ST}) entre as localidades CAR e BRA.

Análise bayesiana de estrutura populacional (BAPS) para inferência do número de *clusters*.

DAPC para inferência do número de *clusters* e agrupamentos genéticos.

Análise do Φ_{st} entre *clusters*.

Análise do F_{ST} entre agrupamentos genéticos.

Avaliação da história demográfica por testes de neutralidade e distribuição mismatch.

Estimativa da taxa de endogamia (F) e coeficiente de parentesco (R).

Amostragens periódicas de espadarte e agulhões comercializados na CEAGESP.

Amplificação da região COI.

Digestão com as enzimas *TaqI* e *HaeIII*.

Avaliação dos padrões de bandas e identificação das espécies.

Implicações dos resultados para novas abordagens de manejo pesqueiro e conservação.

REFERÊNCIAS

- AKASAKI, T.; YANAGIMOTO, T.; YAMAKAMI, K.; TOMONAGA, H.; SATO, S. Species Identification and PCR-RFLP Analysis of Cytochrome b Gene in Cod Fish (Order Gadiformes) Products. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C190–C195, 2006.
- ALACS, E. A.; GEORGES, A.; FITZSIMMONS, N. N.; ROBERTSON, J. DNA Detective: A Review of Molecular Approaches to Wildlife Forensics. **Forensic Science Medicine and Pathology**, v. 6, p. 180–194, 2010.
- ALLEGRUCCI, G.; FORTUNATO, C.; SBORDONI, V. Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*) in the Mediterranean Sea. **Marine Biology**, v. 128, p. 347–358, 1997.
- ALVARADO BREMER, J.; BAKER, A.; MEJUTO, J. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 52, p. 1720–1732, 1995.
- ALVARADO BREMER, J. R.; VIÑAS, J.; MEJUTO, J.; ELY, B.; PLA, C. Comparative Phylogeography of Atlantic Bluefin Tuna and Swordfish: The Combined Effects of Vicariance, Secondary Contact, Introgression, and Population Expansion on the Regional Phylogenies of Two Highly Migratory Pelagic Fishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 169–187, 2005.
- ANJALI, K.M.; MANDAL, A.; GUNALAN, B.; RUBAN, L.; ANANDAJOTHI, E.; THINESHSANTHAR, D.; MANOJKUMAR, T.G.; KANDAN, S. Identification of six grouper species under the genus *Epinephelus* (Bloch, 1793) from Indian waters using PCR-RFLP of cytochrome c oxidase I (COI) gene fragment. **Food Control**, v. 101, p. 39–44, 2019.
- ARKHIPKIN, A.I.; LAPTIKHOVSKY, V.V.; NIGMATULLIN, C.M.; BESPATYKH, A.V.; MURZOV, S.A. Growth, reproduction and feeding of the tropical squid *Ornithoteuthis antillarum* (Cephalopoda, Ommastrephidae) from the central-east Atlantic. **Scientia Marina**, v. 62, p. 273–288, 1998.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489–522, 1987.
- AVISE, J. C.; LANSMAN, R. A.; SHADE, R. O. The Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. I. Population Structure and Evolution in the Genus *Peromyscus*. **Genetics**, v. 92, p. 279–295, 1979.
- BARTLETT, S. E.; DAVIDSON, W. S. Identification of *Thunnus* Tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b Genes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 309–317, 1991.
- BEGG, G. A.; FRIEDLAND, K. D.; PEARCE, J. B. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. **Fisheries Research**, v. 43, p. 1–8, 1999.
- BERNARD, A.M.; SHIVJI, M.S.; PRINCE, E.D.; HAZIN, F.H.; AROCHA, F.; DOMINGO, A; FELDHEIM, K.A. Comparative population genetics and evolutionary history of two commonly misidentified billfishes of management and conservation concern. **BMC Genetics**, v. 15, p. 141, 2014.
- BINGPENG, X.; HESHAN, L.; ZHILAN, Z.; CHUNGUANG, W.; YANGUO, W.; JIANJUN, W. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. **PLOS ONE**, v. 13, p. 1–13, 2018.
- BORNATOWSKI, H.; ANGELINI, R.; COLL, M.; BARRETO, R.R; AMORIM, A.F. Ecological role and historical trends of large pelagic predators in a subtropical marine ecosystem of the South Atlantic. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28, p. 241–259, 2018.
- BRANICKI, W.; KUPIEC, T.; PAWLOWSKI, R. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. **Journal of Forensic Sciences**, v. 48, p. 83–87, 2003.

- BUONACCORSI, V. P.; MCDOWELL, J. R.; GRAVES, J. E. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1179–1196, 2001.
- BUONACCORSI, V.P.; REECE, K.S.; MORGAN, L.W; GRAVES, J.E. Geographic distribution of molecular variance within the blue marlin (*Makaira nigricans*): a hierarchical analysis of allozyme, single-copy nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. **Evolution**, v. 53, p. 568–579, 1999.
- CADRIN, S.X.; KARR, L.A; MARIANI, S. Stock identification methods: an overview. In Stock identification methods. **Academic Press**, p. 1-5, 2014.
- CARR, S. M.; MARSHALL, H. D. Detection of Intraspecific. DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Cytochrome b Gene of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) by the Polymerase Chain Reaction. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 48–52, 1991.
- CARVALHO, G. R.; LORENZ HAUSER. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In: **Molecular genetics in fisheries**. Springer, Dordrecht, p. 55-79, 1995.
- CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Advances in the molecular analysis of fish population structure. **Italian Journal of Zoology**, v. 65, p. 21–33, 1998.
- CHANG, Y.J.; SUN, C.L.; CHEN, Y.; YEH, S.Z.; DINARDO, G. Habitat suitability analysis and identification of potential fishing grounds for swordfish, *Xiphias gladius*, in the South Atlantic Ocean. **International Journal of Remote Sensing**, v. 33, p. 7523–7541, 2012.
- CHAPELA, M. J.; SOTELO, C. G.; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 524–529, 2003.
- CHAPMAN, D.D.; ABERCROMBIE, D.L.; DOUADY, C.J.; PIKITCH, E.K.; STANHOPEN, M.J; SHIVJI, M.S. A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 415–425, 2003.
- CHAUHAN, T.; KUMAR, R. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 281–291, 2010.
- CHEN, Y. **Fish Resources of the Gulf of Mexico BT - Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill**. Volume 2: Fish Resources, Fisheries, Sea Turtles, Avian Resources, Marine Mammals, Diseases and Mortalities. In: WARD, C. H. (Ed.). New York, NY: Springer New York, 2017. p. 869–1038.
- CHOW, S. **Identification of billfish species using mitochondrial cytochrome b gene fragment amplified by polymerase chain reaction**. In: Report of the 2nd ICCAT billfish workshop. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, Anais. 1994.
- CHOW, S.; OKAMOTO, H.; UOZUMI, Y.; TAKEUCHI, Y; TAKEYAMA, H. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. **Marine Biology**, v. 127, p. 359–367, 1997a.
- CHOW, S.; NOHARA, K.; TAKEUCHI, Y. Boundary between North and South Atlantic stocks of swordfish (*Xiphias gladius*): an implication from nuclear DNA analysis. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 54, p. 1544–1546, 2002.
- COLLETTE, B.; MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Phylogeny of Recent billfishes (Xiphioidae). **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 455–468, 2006.
- CORDES, J.F.; ARMKNECHT, S.L.; STARKEY, E.A; GRAVES, J.E. Forensic identification of sixteen species of Chesapeake Bay sportfishes using mitochondrial DNA restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis. **Estuaries**, v. 24, p. 49–58, 2001.

BOARD, O.S.; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Improving the collection, management, and use of marine fisheries data. **National Academies Press**. 2000. 9-19 p.

CREEL, S.; CHRISTIANSON, D. Relationships between direct predation and risk effects. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, p. 194–201, 2008.

CUÉLLAR-PINZÓN, J.; PRESA, P.; HAWKINS, S.J.; PITA, A. Genetic markers in marine fisheries: Types, tasks and trends. **Fisheries Research**, v. 173, p. 194–205, 2016.

DAWSON, D.A.; BALL, A.D.; SPURGIN, L.G.; MARTÍN-GÁLVEZ, D.; STEWART, I.R.; HORSBURGH, G.J.; POTTER, J.; MOLINA-MORALES, M.; BICKNELL, A.W.; PRESTON, S.A.; EKBLUM, R. High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. **BMC Genomics**, v. 14, p. 176, 2013.

DeMARTINI, E. E.; UCHIYAMA, J. H.; HUMPHREYS JR, R. L.; SAMPAGA, J. D.; WILLIAMS, H. A. Age and growth of swordfish (*Xiphias gladius*) caught by the Hawaii-based pelagic longline fishery. **Fishery Bulletin**, v. 105, p. 356-367, 2007.

DITTON, R. B.; STOLL, J. R. Social and economic perspective on recreational billfish fisheries. **Marine and Freshwater Research**, v. 54, p. 545–554, 2003.

DOMENICI, P.; WILSON, A.D.M.; KURVERS, R.H.J.M.; MARRAS, S.; HERBERT-READ, J.E.; STEFFENSEN, J.F.; KRAUSE, S.; VIBLANC, P.E.; COUILLAUD, P.; KRAUSE, J. How sailfish use their bills to capture schooling prey. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 20140444, 2014.

DOMINGUES, R.R.; OKUDA, G.; BERNARD, A.M.; AMORIM, A.F.; DE BIASI, J.; HILSDORF, A.W. A DNA tool for the identification of heavily exploited Atlantic billfishes. **Conservation Genetics Resources**, v. 7, 2015.

DOMINGUES, R. R.; HILSDORF, A. W.; SHIVJI, M. M.; HAZIN, F. V.; GADIG, O. B. Effects of the Pleistocene on the mitochondrial population genetic structure and demographic history of the silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the western Atlantic Ocean. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28, p. 213-227, 2017.

DOMINGUES, R.R.; BRUELS, C.C.; GADIG, O.B.; CHAPMAN, D.D.; HILSDORF, A.W.; SHIVJI, M.S. Genetic connectivity and phylogeography of the night shark (*Carcharhinus signatus*) in the western Atlantic Ocean: Implications for conservation management. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 29, p. 102–114, 2019.

ELLIS, R. **Swordfish: a biography of the ocean gladiator**. 1. ed. Chicago: University of Chicago Press, 2013.

ELY, B.; VIÑAS, J.; BREMER, J.R.A.; BLACK, D.; LUCAS, L.; COVELLO, K.; LABRIE, A.V.; THELEN, E. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: The yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 19, 2005.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Disponível em: <<http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>>. Acesso em: 30 set. 2020a.

FAO. **Global Capture Production 1950-2018**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>>. Acesso em: 16 jun. 2020b.

FIERSTINE, H. **A Paleontological Review of Three Billfish Families (Istiophoridae, Xiphiidae, and Xiphiorhynchidae)**. Planning the Future of Billfishes (Proceedings of the Second International Billfish Symposium in Kailua-Kona, Hawaii, August 1-5, 1988), 1990. Disponível em: <https://digitalcommons.calpoly.edu/bio_fac/11>. Acesso em: 22 out. 2019.

FINNERTY, J. R.; BLOCK, B. A. Direct Sequencing of Mitochondrial DNA Detects Highly Divergent Haplotypes in Blue Marlin (*Makaira nigricans*). **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, p. 206–214, 1992.

- GAO, T.X.; YANG, T.Y.; YANAGIMOTO, T.; XIAO, Y.S. Levels and patterns of genetic variation in Japanese whiting (*Sillago japonica*) based on mitochondrial DNA control region. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 30, p. 172–183, 2019.
- GARRIGAN, D.; HAMMER, M. F. Reconstructing Human Origins in the Genomic Era. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 669–680, 2006.
- GENTNER, B. **The value of billfish resources to both commercial and recreational sectors in the Caribbean**. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Bridgetown, Barbados, 2016. 42 p.
- GONÇALVES, L. R. The role of Brazil in the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT). **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 62, 2019.
- GOTTFRIED, M. D. A Pliocene sailfish *Istiophorus platypterus* (Shaw and Nodder, 1791) from southern California. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 2, p. 151–153, 1982.
- GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. GENETIC ANALYSIS OF BILLFISH POPULATION STRUCTURE. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 41, p. 505–515, 1994a.
- GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. Genetic Analysis of Striped Marlin (*Tetrapturus audax*) Population Structure in the Pacific Ocean. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, p. 1762–1768, 1994b.
- GRAVES, J.; MCDOWELL, J. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 469–482, 2006.
- GREEN, M.E.; APPELYARD, S.A.; WHITE, W.; TRACEY, S.; DEVLOO-DELVA, F.; OVENDEN, J.R. Novel multimarker comparisons address the genetic population structure of silvertip sharks (*Carcharhinus albimarginatus*). **Marine and Freshwater Research**, v. 70, p. 1007–1019, 2019.
- GRIJALVA-CHON, J.M.; NUMACHI, K.; SOSA-NISHIZAKI, O.; DE LA ROSA-VÉLEZ, J. Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xiphias gladius* population structure. Reconstructing Human Origins in the Genomic Era. **Nature reviews. Genetics**, v. 115, p. 15–19, 1994.
- GRIJALVA-CHON, J. M.; LA ROSA-VELEZ, J. Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius* L. **Fishery Bulletin**, v. 94, p. 589–594, 1996.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**, v. 137, p. 435–446, 2000.
- HANNER, R.; FLOYD, R.; BERNARD, A.; COLLETTE, B. B.; SHIVJI, M. DNA barcoding of billfishes. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 27–36, 2011.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. S96–S99, 2003.
- HEDMARK, E.; ELLEGREN, H. Microsatellite genotyping of DNA isolated from claws left on tanned carnivore hides. **International Journal of Legal Medicine**, v. 119, p. 370–373, 2005.
- HEITHAUS, M.R.; FRID, A.; WIRSING, A.J.; WORM, B. Predicting ecological consequences of marine top predator declines. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, p. 202–210, 2008.
- HILSDORF, A.W.; HALLERMAN, E.M. 2017. **Genetic resources of neotropical fishes**. Cham: Springer International Publishing.
- HODEL, R.G.; SEGOVIA-SALCEDO, M.C.; LANDIS, J.B.; CROWL, A.A.; SUN, M.; LIU, X.; GITZENDANNER, M.A.; DOUGLAS, N.A.; GERMAIN-AUBREY, C.C.; CHEN, S.; SOLTIS, D.E. The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences**, v. 4, p. 1600025, 2016.

HOLLAND, S. M.; DITTON, R. B.; GRAEFE, A. R. An Ecotourism Perspective on Billfish Fisheries. **Journal of Sustainable Tourism**, v. 6, p. 97–116, 1998.

HOOLIHAN, J.P.; PREMANANDH, J.; D'ALOIA-PALMIERI, M.A.; BENZIE, J.A.H. Intraspecific phylogeographic isolation of Arabian Gulf sailfish *Istiophorus platypterus* inferred from mitochondrial DNA. **Marine Biology**, v. 145, p. 465–475, 2004.

HOOLIHAN, J. P.; LUO, J.; AROCHA, F. Age and growth of blue marlin *Makaira nigricans* from the central western Atlantic Ocean. **Fisheries Research**, v. 220, p. 105346, 2019.

HSIEH, H.M.; HUANG, L.H.; TSAI, L.C.; KUO, Y.C.; MENG, H.H.; LINACRE, A.; LEE, J.C.I. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. **Forensic Science International**, v. 136, p. 1–11, 2003.

HSIEH, H.-S.; CHAI, T.-J.; HWANG, D.-F. Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of 5 Billfish Species. **Journal of Food Science**, v. 70, p. C246–C249, 2005.

HSIEH, H.-S.; CHAI, T.; HWANG, D.-F. Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. **Food Control**, v. 18, p. 369–374, 2007.

HUTCHINGS, J. A.; REYNOLDS, J. D. Marine Fish Population Collapses: Consequences for Recovery and Extinction Risk. **BioScience**, v. 54, p. 297, 2004.

HYDE, J.R.; LYNN, E.; HUMPHREYS JR, R.; MUSYL, M.; WEST, A.P.; VETTER, R. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish and wahoo. **Marine Ecology Progress Series**, p. 269–277, 2006a.

HYDE, J.R.; HUMPHREYS, R.; MUSYL, M.; LYNN, E.; VETTER, R. A Central north Pacific spawning ground for striped marlin, *Tetrapturus audax*. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 683-690, 2006b.

ICCAT. 2006-2016. **ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna**. In: ICCAT Publications. Disponível em: <<https://www.iccat.int/en/iccatmanual.html>>. Acesso em: 01 out. 2020.

ICCAT. **Report of the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS)**. ICCAT: Madrid, Espanha. 2018. Disponível em: <https://www.iccat.int/com2018/ENG/PLE_104_ENG.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

IGFA. **History of The International Game Fish Association**. Disponível em: <<https://igfa.org/history/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

IHSSEN, P.E.; BOOKE, H.E.; CASSELMAN, J.M.; MCGLADE, J.M.; PAYNE, N.R.; UTTER, F.M. Stock Identification: Materials and Methods. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, p. 1838–1855, 1981.

INNES, B. H.; GREWE, P. M.; WARD, R. D. PCR-based genetic identification of marlin and other billfish. **Marine and Freshwater Research**, v. 49, p. 383–388, 1998.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 28 fev. 2020.

JACKSON, J.B.; KIRBY, M.X.; BERGER, W.H.; BJORNDAL, K.A.; BOTSFORD, L.W.; BOURQUE, B.J.; BRADBURY, R.H.; COOKE, R.; ERLANDSON, J.; ESTES, J.A.; HUGHES, T.P. Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. **Science**, v. 293, p. 629–637, 2001.

JÚNIOR, T. V.; MARIA VOOREN, C.; PAULA LESSA, R. Feeding Habits of Four Species of Istiophoridae (Pisces: Perciformes) from Northeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 70, p. 293–304, 2004.

KERR, L. A.; CAMPANA, S. E. Chemical composition of fish hard parts as a natural marker of fish stocks. In: Stock identification methods. **Elsevier**, p. 205–234, 2014.

- KOPF, R.K.; DAVIE, P.S.; BROMHEAD, D.; PEPPERELL, J.G. Age and growth of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Southwest Pacific Ocean. **ICES Journal of Marine Science**, v. 68, p. 1884–1895, 2011.
- KUMAR, R.; SINGH, P.J.; NAGPURE, N.S.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K.; LAKRA, W.S. A Non-Invasive Technique for Rapid Extraction of DNA from Fish Scales. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 992–997, 2007.
- KUNAL, S.P.; KUMAR, G.; MENEZES, M.R.; MEENA, R.M. Mitochondrial DNA analysis reveals three stocks of yellowfin tuna *Thunnus albacares* (Bonnatere, 1788) in Indian waters. **Conservation Genetics**, v. 14, p. 205–213, 2013.
- LARSSON, L.C.; LAIKRE, L.; PALM, S.; ANDRÉ, C.; CARVALHO, G.R.; RYMAN, N. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1135–1147, 2007.
- LIN, W.-F.; HWANG, D.-F. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. **Food Control**, v. 18, p. 1050–1057, 2007.
- LINACRE, A.; TOBE, S. S. An Overview to the Investigative Approach to Species Testing in Wildlife Forensic Science. **Investigative genetics**, v. 2, p. 2, 2011.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p. 1–37, 2004.
- LO, C. F.; LIN, Y. R.; CHANG, H. C.; LIN, J. H. Identification of turtle shell and its preparations by PCR-DNA sequencing method. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 14, 2006.
- LOOR-ANDRADE, P.; PINCAY-ESPINOZA, J.; CARRERA-FERNÁNDEZ, M.; ROSAS-LUIS, R. Feeding habits of billfishes (Carangaria: Istiophoriformes) in the Ecuadorian Pacific Ocean. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, 2017.
- LOPES, T.D.S.; STREIT JR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J.R. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 728-735, 2009.
- LU, C. P.; BREMER, J. R. A.; MCKENZIE, J. L.; CHIANG, W. C. Analysis of Sailfish (*Istiophorus platypterus*) Population Structure in the North Pacific Ocean. **Fisheries Research**, v. 166, p. 33-38, 2014.
- LU, C. P.; BREMER, J. R. A.; MCKENZIE, J. L.; CHIANG, W. C. Analysis of sailfish (*Istiophorus platypterus*) population structure in the North Pacific Ocean. **Fisheries Research**, v. 166, p. 33–38, 2015.
- LU, C. P.; SMITH, B. L.; HINTON, M. G.; BREMER, J. R. A. Bayesian analyses of Pacific swordfish (*Xiphias gladius* L.) genetic differentiation using multilocus single nucleotide polymorphism (SNP) data. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 482, p. 1–17, 2016.
- MAMOOZADEH, N. R.; MCDOWELL, J. R.; ROOKER, J. R.; GRAVES, J. E. Genetic evaluation of population structure in white marlin (*Kajikia albida*): the importance of statistical power. **ICES Journal of Marine Science**, v. 75, p. 892–902, 2018.
- MAMOOZADEH, N. R.; GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. Genome-wide SNPs resolve spatiotemporal patterns of connectivity within striped marlin (*Kajikia audax*), a broadly distributed and highly migratory pelagic species. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 4, p. 677–698, 2019.
- MARGOLIS, L. Parasites as indicators of the geographical origin of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), occurring in the North Pacific Ocean and adjacent seas. **Bulletin. International North Pacific Fisheries Commission**, v. 1963, p.101-156, 1963.
- MATSUMOTO, C.; KYOTA, Y.; YAMANAKA, S.; MURAKAWA, N.; KIKUNAGA, R.; YAMADA, Y.; KAWACHI, H. Molecular Identification of Biwa Trout (*Oncorhynchus Masou Rhodurus*) Using PCR-RFLP Method. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 4705–4713, 2019.

- MCDOWELL, J.; CARLSSON, J.; GRAVES, J. Genetic Analysis of Blue Marlin (*Makaira nigricans*) Stock Structure in the Atlantic Ocean. **Gulf and Caribbean Research**, v. 19, p. 75–82, 2007.
- MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. **Fishery Bulletin**, v. 100, p. 537–544, 2002.
- MOORE, M.K.; BEMISS, J.A.; RICE, S.M.; QUATTRO, J.M.; WOODLEY, C.M. Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 95–103, 2003.
- MORALES, M.J.A.; MENDONÇA, F.F.; MAGALHÃES, C.O.; OLIVEIRA, C.; COELHO, R.; SANTOS, M.N.; CRUZ, V.P.; PIERCY, A.; BURGESS, G.; HAZIN, F.V.; FORESTI, F. Population genetics of the bigeye thresher shark *Alopias superciliosus* in the Atlantic and Indian Oceans: implications for conservation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28, p. 941–951, 2018.
- MORITZ, C.; DOWLING, T.; BROWN, W. Moritz C, Dowling TE, Brown WM. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 269-292. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 269–292, 1987.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.
- MUTHS, D.; LE COULS, S.; EVANO, H.; GREWE, P.; BOURJEA, J. Multi-Genetic Marker Approach and Spatio-Temporal Analysis Suggest There Is a Single Panmictic Population of Swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. **PLOS ONE**, v. 8, p. e63558, 2013.
- MYERS, R.A.; BAUM, J.K.; SHEPHERD, T.D.; POWERS, S.P.; PETERSON, C.H. Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. **Science**, 315, p.1846-1850, 2007.
- MYERS, R. A.; WORM, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. **Nature**, v. 423, p. 280–283, 2003.
- NAKADATE, M.; VIÑAS, J.; CORRIERO, A.; CLARKE, S.; SUZUKI, N.; CHOW, S. Genetic isolation between Atlantic and Mediterranean albacore populations inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 1545–1557, 2005.
- NAKAMURA, I. **An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date**. FAO species catalogue, Rome, 1985.
- OGDEN, R. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 462–472, 2008.
- OGDEN, R.; DAWNAY, N.; MCEWING, R. Wildlife DNA Forensics – Bridging the Gap Between Conservation Genetics and Law Enforcement. **Endangered Species Research**, v. 9, p. 179–195, 2009.
- OKUMUŞ, I.; ÇİFTÇİ, Y. Fish population genetics and molecular markers: II. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 3, p. 51–79, 2003.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. **Aspen Bibliography**, v. 79, p. 361-382, 1998.
- PRADO, M.; FRANCO, C.M.; FENTE, C.A.; CEPEDA, A.; VÁZQUEZ, B.I.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Comparison of Extraction Methods for the Recovery, Amplification and Species-Specific Analysis of DNA from Bone and Bone Meals. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1005–1012, 2002.
- PURCELL, C. M.; EDMANDS, S. Resolving the genetic structure of striped marlin, *Kajikia audax*, in the Pacific Ocean through spatial and temporal sampling of adult and immature fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 68, p. 1861–1875, 2011.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 280–295, 2008.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.

RICHARDSON, D.E.; COWEN, R.K.; PRINCE, E.D.; SPONAUGLE, S. Importance of the Straits of Florida spawning ground to Atlantic sailfish (*Istiophorus platypterus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*). **Fisheries Oceanography**, v. 18, p. 402–418, 2009.

RODRIGUES, T.; HILSDORF, A.W.S.; PIMENTA, E.G.; AMORIM, A.F. Ocurrence and identification of Istiophoridae larvae and Xiphiidae eggs off the southeastern Brazilian Coast. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 78–86, 2017.

ROOKER, J.R.; SIMMS, J.R.; WELLS, R.D.; HOLT, S.A.; HOLT, G.J.; GRAVES, J.E.; FUREY, N.B. Distribution and Habitat Associations of Billfish and Swordfish Larvae across Mesoscale Features in the Gulf of Mexico. **PloS One**, v. 7, p. e34180–e34180, 2012.

ROSAS-ALAYOLA, J.; HERNÁNDEZ-HERRERA, A.; GALVAN-MAGAÑA, F.; ABITIA-CÁRDENAS, L.A.; MUHLIA-MELO, A.F. Diet composition of sailfish (*Istiophorus platypterus*) from the southern Gulf of California, Mexico. **Fisheries Research**, v. 57, p. 185–195, 2002.

ROSEL, P. E.; BLOCK, B. A. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. **Marine Biology**, v. 125, p. 11–22, 1996.

RUBIO-CASTRO, G.; QUINONEZ, C.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfish *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific. **Fisheries Science**, v. 82, p. 241–249, 2016.

RUDNICK, J.A.; KATZNER, T.E.; BRAGIN, E.A.; DEWOODY, J.A. Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 757–762, 2007.

SÁNCHEZ-MOLANO, E.; CABALLERO, A.; FERNÁNDEZ, J. Efficiency of Conservation Management Methods for Subdivided Populations under Local Adaptation. **Journal of Heredity**, v. 104, p. 554–564, 2013.

SANTA CLARA, F. J.; ESPINEIRA, M.; VIEITES, J. M. Genetic Identification of Squids (Families Ommastrephidae and Loliginidae) by PCR-RFLP and FINS Methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9913–9920, 2007.

SATO, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. Structure and Variation of the Mitochondrial Genome of Fishes. **BMC genomics**, v. 17, p. 719, 2016.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 3–9, 2004.

SCHMIDT, R.F.; RODRIGUES, T.; PIMENTA, E.G.; HILSDORF, A.W.S.; AMORIM, A.F. Preliminary occurrence of istiophoridae larvae (perciformes, xiphioides) in southern brazil. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 71, p. 2256–2261, 2015.

SEDBERRY, G.; LOEFER, J. Satellite telemetry tracking of swordfish, *Xiphias gladius*, off the eastern United States. **Marine Biology**, v. 139, p. 355–360, 2001.

SELKOE, K.A.; ALOIA, C.C.; CRANDALL, E.D.; IACCHEI, M.; LIGGINS, L.; PURITZ, J.B.; VON DER HEYDEN, S.; TOONEN, R.J. A decade of seascape genetics: contributions to basic and applied marine connectivity. **Marine Ecology Progress Series**, v. 554, p. 1–19, 2016.

SERAFY, J. E.; COWEN, R. K.; PARIS, C. B.; CAPO, T. R.; LUTHY, S. A. Evidence of blue marlin, *Makaira nigricans*, spawning in the vicinity of Exuma Sound, Bahamas. **Marine and Freshwater Research**, v. 54, p. 299–306, 2003.

SHAKLEE, J. B.; BRILL, R. W.; ACERRA, R. Biochemical genetics of Pacific blue marlin, *Makaira nigricans*, from Hawaiian waters. **Fishery Bulletin**, v. 81, p. 85–90, 1983.

SHIMOSE, T.; SHONO, H.; YOKAWA, K.; SAITO, H.; TACHIHARA, K. Food and feeding habits of blue marlin, *Makaira nigricans*, around Yonaguni Island, southwestern Japan. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 761–775, 2006.

SHIMOSE, T.; YOKAWA, K.; TACHIHARA, K. Age determination and growth estimation from otolith micro-increments and fin spine sections of blue marlin (*Makaira nigricans*) in the western North Pacific. **Marine and Freshwater Research**, v. 66, p. 1116–1127, 2015.

SHIVJI, M. S.; MAGNUSSEN, J. E.; BEERKIRCHER, L. R.; HINTEREGGER, G.; LEE, D. W.; SERAFY, J. E.; PRINCE, E. D. Validity, identification, and distribution of the roundscale spearfish, *Tetrapturus georgii* (Teleostei: Istiophoridae): Morphological and molecular evidence. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 483–491, 2006.

SHIVJI, M.; CLARKE, S.; PANK, M.; NATANSON, L.; KOHLER, N.; STANHOPE, M. Genetic Identification of Pelagic Shark Body Parts for Conservation and Trade Monitoring. **Conservation Biology**, v. 16, p. 1036–1047, 2002.

SIMMS, J. R.; ROOKER, J. R.; HOLT, S. A.; HOLT, G. J.; BANGMA, J. Distribution, growth, and mortality of sailfish (*istiophorus platypterus*) larvae in the northern gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 108, p. 478–490, 2010.

SIMON, C.; BUCKLEY, T. R.; FRATI, F.; STEWART, J. B.; BECKENBACH, A. T. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, p. 545–579, 2006.

SMITH, B. L.; LU, C. P.; GARCÍA-CORTÉS, B.; VIÑAS, J.; YEH, S. Y.; ALVARADO BREMER, J. R. Multilocus Bayesian Estimates of Intra-Oceanic Genetic Differentiation, Connectivity, and Admixture in Atlantic Swordfish (*Xiphias gladius* L.). **PLOS ONE**, v. 10, p. 1–30, 2015.

SMITH, C. T.; NELSON, R. J.; WOOD, C. C.; KOOP, B. F. Glacial biogeography of North American coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2775–2785, 2001.

SMITH, P. J.; JAMIESON, A.; BIRLEY, A. J. Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. **ICES Journal of Marine Science**, v. 47, p. 231–245, 1990.

SORENSEN, L.; MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Assignment test method using hypervariable markers for blue marlin (*Makaira nigricans*) stock identification. **Conservation Genetics Resources**, v. 5, p. 293–297, 2013.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, p. 199–203, 2000.

TAUTZ, D. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463–6471, 1989.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 389–402, 2005.

THE BILLFISH FOUNDATION. **About Us: History and accomplishments**. Disponível em: <<https://billfish.org/who-we-are/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

THORROLD, S. R.; JONES, G. P.; HELLBERG, M. E.; BURTON, R. S.; SWEARER, S. E.; NEIGEL, J. E.; MORGAN, S.G; WARNER, R.R. Quantifying larval retention and connectivity in marine populations with artificial and natural markers. **Bulletin of Marine Science**, v. 70, p. 291–308, 2002.

TOBE, S. S.; LINACRE, A. M. T. A Technique for the Quantification of Human and Non-Human Mammalian Mitochondrial DNA Copy Number in Forensic and Other Mixtures. *Forensic science international*. **Genetics**, v. 2, p. 249–256, 2008.

TREMBLAY-BOYER, L.; GASCUEL, D.; WATSON, R.; CHRISTENSEN, V.; PAULY, D. Modelling the effects of fishing on the biomass of the world's oceans from 1950 to 2006. **Marine Ecology Progress Series**, v. 442, p. 169–185, 2011.

UNDERHILL, P. A.; KIVISILD, T. Use of y Chromosome and Mitochondrial DNA Population Structure in Tracing Human Migrations. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 539–564, 2007.

VIÑAS, J.; PÉREZ-SERRA, A.; VIDAL, O.; ALVARADO BREMER, J. R.; PLA, C. Genetic differentiation between eastern and western Mediterranean swordfish revealed by phylogeographic analysis of the mitochondrial DNA control region. **ICES Journal of Marine Science**, v. 67, p. 1222–1229, 2010.

WAN, Q. H.; WU, H.; FUJIHARA, T.; FANG, S. G. Which Genetic Marker for Which Conservation Genetics Issue? **Electrophoresis**, v. 25, p. 2165–2176, 2004.

WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 438–450, 1998.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What Is a Population? An Empirical Evaluation of Some Genetic Methods for Identifying the Number of Gene Pools and Their Degree of Connectivity. **Molecular ecology**, v. 15, n. 6, p. 1419–1439, 2006.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 191–201, 2000.

WARD, R. D.; GREWE, P. M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 300–325, 1994.

WASSER, S. K.; MAILAND, C.; BOOTH, R.; MUTAYOBA, B.; KISAMO, E.; CLARK, B.; STEPHENS, M. Using DNA to track the origin of the largest ivory seizure since the 1989 trade ban. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 4228–4233, 2007.

WILLIAMS, S. M., MCDOWELL, J. R., BENNETT, M., GRAVES, J. E., OVENDEN, J. R. Analysis of whole mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of istiophorid billfishes. **Bulletin of Marine Science**, v. 94, p. 73–84, 2018.

WILLIAMS, S. M.; WYATT, J.; OVENDEN, J. R. Investigating the genetic stock structure of blue marlin (*Makaira nigricans*) in the Pacific Ocean. **Fisheries Research**, v. 228, p. 105565, 2020.

WILSON, C. A.; DEAN, J. M.; PRINCE, E. D.; LEE, D. W. An examination of sexual dimorphism in Atlantic and Pacific blue marlin using body weight, sagittae weight, and age estimates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 151, p. 209–225, 1991.

WONG, K. L.; WANG, J.; BUT, P. P. H.; SHAW, P. C. Application of Cytochrome b DNA Sequences for the Authentication of Endangered Snake Species. **Forensic Science International**, v. 139, p. 49–55, 2004.

WORM, B.; HILBORN, R.; BAUM, J.K.; BRANCH, T.A.; COLLIE, J.S.; COSTELLO, C.; FOGARTY, M.J.; FULTON, E.A.; HUTCHINGS, J.A.; JENNINGS, S. Rebuilding Global Fisheries. **Science**, v. 325, p. 578–585, 2009.

WORM, D.; BISHOP, J. M.; MATTHEE, C. A.; VON DER HEYDEN, S. Genetic isolation by distance reveals restricted dispersal across a range of life histories: implications for biodiversity conservation planning across highly variable marine environments. **Diversity and Distributions**, v. 21, p. 698–710, 2015.

ZHANG, J.; HUANG, H.; CAI, Z.; HUANG, L. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. **Food Control**, v. 17, p. 557–563, 2006.

ZHANG, L.; ZHOU, Z.; LI, H.; QIAO, Y.; ZHANG, Y. The Mitochondrial COI Gene Reveals the Genetic Diversity of Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) in the Taiwan Strait and its Adjacent Waters. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, p. 935–943, 2019a.

ZHANG, X.; ZHANG, X.; SONG, N.; GAO, T.; ZHAO, L. Study on population genetics of *Sillago aeolus* (Perciformes: Sillaginidae) in the Coast of China. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 30, p. 825-834, 2019b.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO POPULACIONAL DO AGULHÃO-VERDE (*Tetrapturus pfluegeri*) NO ATLÂNTICO OCIDENTAL - IMPLICAÇÕES PARA O MANEJO PESQUEIRO E CONSERVAÇÃO DE ESTOQUES

CAPÍTULO 2: Avaliação populacional do agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*) no Atlântico ocidental - implicações para o manejo pesqueiro e conservação de estoques

RESUMO

O presente estudo buscou, pela primeira vez, avaliar aspectos populacionais do agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*) do oceano Atlântico ocidental. Para isso, foram realizados sequenciamento parcial da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e avaliação de diferenciação genética (Φ_{st}) entre as localidades CAR e BRA. Uma análise bayesiana de estrutura populacional (BAPS) foi conduzida para verificar o número de *clusters* existentes na amostragem e uma segunda análise de diferenciação genética foi realizada entre os *clusters* inferidos. Análises de neutralidade e da distribuição *mismatch* foram conduzidas para estimar a dinâmica populacional histórica. Marcadores microssatélites também foram usados para avaliar a taxa de diferenciação genética (F_{ST}) entre as duas localidades. O número de *clusters* e agrupamentos genéticos foi inferido por dois métodos de clusterização: análise Bayesiana no STRUCTURE e análise discriminante de componentes principais (DAPC). A diferenciação genética entre os *clusters* e agrupamentos foi verificada pelos índices F_{ST} e D_{EST} . Também foram estimados taxa de endogamia (F) e o coeficiente de parentesco (R) entre os agrupamentos genéticos. Os resultados mostraram não haver diferenciação genética entre as localidades CAR e BRA. Entretanto, as análises de clusterização, tanto por D-loop quanto por microssatélites, estimaram três grupos genéticos, para os quais foi verificado um Φ_{st} geral de 0,040 (D-loop) e um D_{EST} (microssatélites) que variou entre 0,176 e 0,092 (p -valor $< 0,05$). Além disso, maiores valores de coeficiente de parentesco foram verificados dentro dos agrupamentos. Os testes de neutralidade e a distribuição *mismatch* mostraram que a espécie pode ter passado por expansão populacional entre 112,7 e 281,7 mil anos atrás devido aos dois últimos períodos glaciais. Portanto, o presente estudo sugere que podem existir diferentes grupos genéticos do agulhão-verde no Atlântico ocidental, o que pode estar relacionado à fidelidade por locais de reprodução. Assim, novas hipóteses foram geradas, abrindo caminho para estudos futuros e alertando sobre a importância de programas de manejo que levem em conta os novos achados científicos e as particularidades da espécie.

Palavras-chave: peixes-de-bico, Istiophoridae, marcadores moleculares, pesca, manejo pesqueiro.

Population assessment of longbill spearfish (*Tetrapturus pfluegeri*) in the Western Atlantic - implications for fishing management and stocks conservation

ABSTRACT

For the first time, this study evaluated the population genetics of the longbill spearfish (*Tetrapturus pfluegeri*) from the Northwestern Atlantic Ocean using molecular markers. Partial sequences of the mitochondrial control region (D-loop) were used to calculate genetic differentiation (Φ_{st}) between CAR and BRA localities. A Bayesian analysis of population structure (BAPS) was carried out to assess the number of clusters in the general sample, followed by a second genetic differentiation analysis between the clusters estimated by BAPS. To assess demographic aspects, we performed neutrality and mismatch analysis. Microsatellite markers were also used to determine the genetic differentiation (F_{ST}) between the two sampling locals. The number of clusters and genetic groups was calculated by two clustering methods: Bayesian analysis in STRUCTURE and discriminant analysis of principal components (DAPC). The genetic differentiation between clusters and groups was assessed by F_{ST} and D_{EST} index. It was also estimated the inbreeding rate (F) and the relatedness coefficient (R) between genetic groups. As a result, the analysis showed no genetic difference between localities. However, the clustering analysis with D-loop and microsatellite showed three genetic groups for which a general Φ_{st} of 0.040 (D-loop) and a D_{EST} (microsatellite) of 0.176 - 0.092 (p -value < 0,05) were obtained. Moreover, a higher relatedness coefficient was observed between genetic groups than inside them. The neutrality and mismatch tests have shown that demographic expansion may have happened to longbill spearfish at about 112.7 and 281.7 thousand years before present, due to the last two glaciations. Thus, the present work suggests that the existence of different genetic groups of *T. pfluegeri* in the Atlantic Ocean is possible, what can be retained by the possible fidelity to spawning places, what have already been shown for some billfish species. The new hypothesis produced in this study are starting points to future studies about longbill spearfish population dynamics. It highlights the importance of fisheries management programs that consider the scientific data and peculiarities of the species.

Keywords: billfish, Istiophoridae, molecular markers, fisheries, fisheries management.

2.1 Introdução

Atualmente, é bem conhecido o fato de que os estoques dos grandes predadores marinhos estão sobrexplorados em nível global (COLLETTE et al., 2011; GRAVES; MCDOWELL, 2015). Por isso, é essencial que estes animais sejam adequadamente conservados e, para isso, é importante considerar que o nível de fluxo gênico entre diferentes populações pode influenciar sua tenacidade. Sendo assim, é fundamental entender as dinâmicas populacionais e a diversidade genética das populações (BERNARD et al., 2016).

O nível de isolamento e a extensão do fluxo gênico são parâmetros chave para modular dinâmicas populacionais, diversidade genética e processos evolutivos (BERNARD et al., 2016). Assim, a identificação de unidades de manejo e conservação depende de estudos genéticos populacionais acurados, o que se caracteriza como um desafio quando se trata de espécies migratórias pelágicas e epipelágicas. Isso se deve à grande extensão do ambiente marinho, à pequena quantidade de barreiras geográficas aparentes, ao grande número demográfico das populações e à existência de larvas com alta capacidade de dispersão. Essas características, quando associadas ao hábito migratório de longas distâncias apresentado pelos grandes predadores pelágicos, tendem a promover o fluxo gênico e evitar estruturação populacional (PALUMBI, 1994; WAPLES, 1998).

Considerando os avanços recentes nas técnicas de genética molecular, algumas exceções têm surgido para o paradigma de que populações marinhas migradoras são essencialmente homogêneas (HAUSER; CARVALHO, 2008). Estudos prévios já demonstraram estruturação populacional em algumas espécies marinhas de ampla distribuição geográfica. Carmo et al. (2019), por exemplo, detectaram uma forte estruturação populacional em tubarões-tigre (*Galeocerdo cuvier*) entre áreas do Oceano Atlântico quando analisaram a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial (mtDNA). Em outro estudo, Menezes et al. (2012) avaliaram a genética populacional do bonito (*Katsuwonus pelamis*) e os resultados sugeriram ocorrência de quatro grupos geneticamente diferenciados ao longo das águas costeiras da Índia.

Indícios de estruturação populacional também já foram detectados em peixes-de-bico por Rosel e Block (1996), em estudo no qual foi demonstrada estruturação, em nível global, em populações de espadarte (*Xiphias gladius*) usando a região D-loop do DNAm. Além disso, por meio da análise de microssatélites em regiões do DNA nuclear, Bernard et al. (2014a) encontraram uma baixa, porém significativa, diferenciação genética entre populações do agulhão-polegar (*Tetrapturus georgii*) provenientes do Atlântico ocidental Norte e do Atlântico ocidental Sul.

Esses como esses são fundamentais na elaboração de planos de manejo, principalmente para espécies consideradas sobreexploradas, como é o caso da maioria dos agulhões e do espadarte do oceano Atlântico, os quais são efetivamente importantes para o sistema ecológico marinho como predadores de topo de cadeia (ICCAT, 2018).

Neste contexto, o agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*) é o único peixe-de-bico do oceano Atlântico sobre o qual ainda não existem estudos populacionais na literatura. O agulhão-verde é uma espécie epipelágica, altamente migratória e endêmica do Atlântico, onde é amplamente distribuída (de 40°N a 40°S) (NAKAMURA, 1985). É considerada uma das espécies de pequeno porte quando comparada a algumas outras do grupo Istiophoridae, como por exemplo, agulhão-azul (*Makaira nigricans*) e agulhão-branco (*Kajikia albida*). Estima-se que sua desova ocorra em águas tropicais, em mais de uma ocasião durante a época reprodutiva, pois foram verificadas altas concentrações de larvas e fêmeas aptas à reprodução na região central do Atlântico Sul, de janeiro a março, e na costa da Venezuela, de junho a agosto (PONS et al., 2015).

Essa espécie é um produto da captura acessória das pescas artesanal, recreacional e comercial, sendo o peixe-de-bico menos comum na pesca industrial. Entretanto, não existem dados que expliquem sua baixa frequência de captura, existindo a possibilidade que seja devido a um pequeno tamanho populacional. A estatística de captura dos agulhões-verdes tem sido historicamente combinada com a de agulhões-vela (*Istiophorus platypterus*) nos relatórios da ICCAT (Comissão Internacional para a Conservação do Atum Atlântico). Assim, até o momento não há informações sobre seus estoques e dinâmicas populacionais (AROCHA et al., 2007; ICCAT, 2018). Bernard et al. (2014b) deram o primeiro passo para a mudança desse cenário ao desenvolverem o primeiro recurso para avaliação populacional do agulhão-verde. Os autores isolaram 13 microssatélites do genoma da espécie e demonstraram ser marcadores polimórficos, passíveis de uso em estudos de avaliação genética populacional, possibilitando o desenvolvimento do presente estudo.

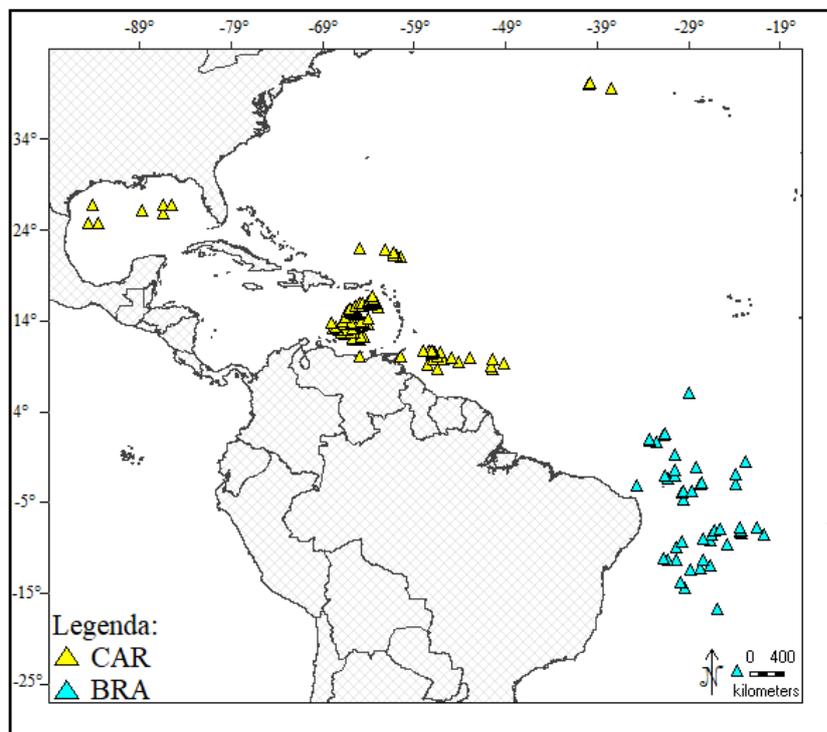
Face ao exposto acima e devido ao complexo ciclo de vida, comportamento migratório e distribuição ainda pouco conhecidos de *T. pfluegeri*, o presente estudo teve por objetivo avaliar a hipótese de panmixia da espécie no Atlântico ocidental Norte e Sul. Para isso, marcadores microssatélites e sequências parciais da região D-loop foram usadas para estimar a diversidade genética e inferir a história demográfica do agulhão-verde. Além disso, os resultados apresentados são discutidos no contexto da conservação da espécie como recurso pesqueiro.

2.2 Métodos

2.2.1 Amostragem e isolamento do DNA genômico

Um total de 177 amostras provenientes do oceano Atlântico ocidental, originalmente depositadas no banco de tecidos do *Conservation Biology & Genetics Laboratory*, Nova Southern University (Florida, EUA), onde já haviam sido analisadas geneticamente e confirmadas como *T. pfluegeri*, foram cedidas ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA). Todas as amostras, coletadas em amostragens oportunísticas, datadas de 1996 a 2007, possuíam registros de coleta indicando suas respectivas localizações geográficas. As amostras foram organizadas em dois grupos: (i) aquelas coletadas no Atlântico Norte, maior parte na região do Caribe (CAR), e aquelas coletadas no Atlântico Sul, principalmente frente à costa brasileira (BRA) (**Figura 2.1**).

Figura 1.2: Mapa demonstrando os pontos amostrais no Oceano Atlântico Ocidental onde foram coletadas amostras de *Tetrapturus pfluegeri*. CAR: região correspondente ao Caribe e Golfo do México. BRA: região amostral frente à costa brasileira.



O DNA genômico foi isolado com Chelex 100 (SINGER-SAM, 1989), com o qual um pequeno fragmento de cada amostra (equivalente à cabeça de um alfinete) foi isolado e reidratado com 500 µl de solução PBS 1X durante 15 min; após remoção do PBS a amostra foi incubada em 200 µl de suspensão de Chelex® 100 (Sigma Aldrich, Missouri, USA) na concentração de 5% a 65°C por 60 min e transferida para incubação a 95°C por 15 min; com uma centrifugação de 2 min a 14000 rpm todo o material em suspensão foi separado do sobrenadante contendo o material genético, o qual foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.

2.2.2 Análises populacionais por DNA mitocondrial

Para as análises populacionais e demográficas a partir do D-loop, todas as amostras foram amplificadas com os iniciadores Pro-5M13F (5'CACGACGTTGTAAAACGACCTACCYCYAACTCCCAAAGC3') (COLLETTE et al., 2006) e R-DLOOP-160 (5'TACCCACTGGAGATAGTGCT3'), desenvolvido no presente estudo com auxílio do programa Primer3 4.0 (UNTERGASSER et al., 2012), usando como base a sequência completa do DNAm de *T. pfluegeri*, (GenBank: 1025805034).

Cada PCR (reação em cadeia da polimerase) foi preparada para um volume final de 25 µl contendo tampão de Taq 1X; 2 mM de MgCl₂; 0,8 mM de dNTPs; 0,25 µM de cada iniciador; 1,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e 1 µl de DNA genômico. As amplificações foram executadas em termociclador C1000® (Bio-Rad, 21 Technology Dr, Irvine, California, USA) com desnaturação inicial de 95°C por 15 min, seguida de 35 ciclos constituídos por etapas de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 54°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; e por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 2 min. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% para verificar a qualidade da amplificação.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit High Pure PCR Template Preparation® (Hoffmann-La Roche, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen Korea (Geumcheon-gu, 10F, 254 Beotkkot-ro, Seoul, South Korea) que utiliza sequenciador automático ABI 3730® (Applied Biosystems, California, USA). As sequências foram analisadas e alinhadas por meio do programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Massachusetts, USA) e MEGAX (KUMAR et al., 2018).

A composição nucleotídica, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), número de haplótipos (H) e número de sítios polimórficos (S) foram calculados no programa Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2007).

A existência de estruturação populacional entre as diferentes localidades foi verificada por meio do índice de diferenciação Φ_{st} (WEIR; COCKERHAM, 1984), utilizando análises de variância molecular (AMOVA), executadas no Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2007), com 1.000 permutações, e o teste do vizinho mais próximo (S_{nn}) (HUDSON, 2000), implementado no programa DnaSP v6 (ROZAS et al., 2017).

Tendo em vista que o modelo estudado se trata de uma espécie marinha com hábitos migratórios, os pontos de coleta são pouco informativos para uma divisão populacional pressuposta. Por este motivo uma análise de agrupamento baseada em inferências bayesianas de estrutura genética foi conduzida no programa BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) v5.4 (CORANDER et al., 2008; CHENG et al., 2011), usando o modelo de agrupamento com *loci* vinculados e diferentes intervalos de K (número de agrupamentos), por múltiplas vezes, visando aumentar a probabilidade de encontrar a melhor divisão (número de *clusters*).

A relação genealógica entre os *clusters* foi verificada por meio da construção de uma rede de haplótipos Median-joining (MJ) (BANDELT et al., 1999) utilizando o programa Network 10.0 (fluxus-engineering.com).

Uma segunda AMOVA foi realizada no programa Arlequin para verificar a diferenciação genética (Φ_{st}) (EXCOFFIER et al., 1992) entre os *clusters*. Ainda utilizando o Arlequin, uma AMOVA hierarquizada foi conduzida para estimar a proporção de variabilidade genética existente entre *clusters* (Φ_{ST}), entre os *clusters* dentro dos grupos (Φ_{SC}) e entre grupos (Φ_{CT}).

Para verificar a ocorrência de desvio da neutralidade, ou seja, mudanças no tamanho populacional, foram utilizados os testes: R_2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) por simulações de coalescência com 1.000 réplicas, no programa DnaSP v6; F_s de Fu (FU, 1997) e D de Tajima (TAJIMA, 1989), para os quais a significância estatística foi estimada com 1.000 permutações no programa Arlequin 3.1.

A análise da distribuição de diferenças pareadas entre haplótipos (*mismatch*) (SCHNEIDER; EXCOFFIER, 1999) foi realizada no programa Arlequin v3.1 para avaliar parâmetros demográficos, onde o índice *raggedness* de Harpending (H_{ri}) (HARPENDING, 1994) foi usado para estima se a distribuição observada se ajusta bem ao modelo de expansão populacional.

O tempo desde a expansão populacional em gerações (τ), gerado pela distribuição *mismatch*, foi utilizado para inferir o tempo real desde a expansão populacional (t), por meio da fórmula $t = \tau/2\mu$, onde μ corresponde à taxa mutacional por locus por geração. Devido à ausência de estudos que determinem as taxas mutacionais específicas para linhagens de Istiophoridae, foram adotados os valores de 1,8% a 4,5% por locus por milhão de anos, previamente estimados para o DNAmT de peixes (DONALDSON; WILSON, 1999) e, também, adotados por Bernard et al. (2014a).

2.2.3 Análise populacional por microssatélites

Antes que o presente estudo fosse iniciado, uma biblioteca de microssatélites para *T. pfluegeri* já se encontrava disponível no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA/UMC). Para a sua produção, foi enviado um *pool* de DNA genômico de cinco indivíduos da espécie *T. pfluegeri* para a empresa Genoscreen (www.genoscreen.fr) onde a biblioteca de microssatélites foi produzida por meio de pirosequenciamento 454 GS-FLX Titanium (Roche Diagnostics); o isolamento dos *loci* foi realizado a partir de bibliotecas de DNA enriquecidas (MALAUSA et al., 2011) com oito sondas (TG, TC, AAC, AAG, AGG, ACG, ACAT, ACTC); o programa QDD (MEGLECZ et al., 2010) foi usado para determinar o conteúdo de microssatélites a partir das sequências brutas, gerando um total de 13.110 sequências; foram desenvolvidos pares de iniciadores, flanqueando os microssatélites, os quais ficaram disponíveis para seleção e potencial uso em estudos populacionais.

A partir da biblioteca descrita acima, Bernard et al. (2014b) desenvolveram um painel com 13 *loci* polimórficos, dos quais 11 foram utilizados nas análises populacionais do presente estudo (**Tabela 2.1**). Adicionalmente, 12 pares de iniciadores foram selecionados, a partir da biblioteca original, por meio de análises de qualidade realizadas com a ferramenta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages>).

Todos os iniciadores *forward* foram sintetizados com adição de cauda M13 (5'TGTAACGACGGCCAGT3') (SCHUELKE, 2000) e os iniciadores *reverse* com adição de *pigtail* (5'GTTTCTT3') (BROWNSTEIN et al., 1996), ambos na extremidade 5'. A cauda M13 tem como finalidade o anelamento de fluorescência durante a amplificação dos alelos para que os mesmos possam ser captados e genotipados (SCHUELKE, 2000). Já a *pigtail* impede a poliadenilação da extremidade 3' dos fragmentos amplificados, aumentando a acurácia da genotipagem (BROWNSTEIN et al., 1996).

Os 12 iniciadores adicionais foram testados quanto às melhores condições de amplificação e presença de polimorfismo nos *loci* correspondentes, entretanto apenas um *locus* foi eficiente, o qual foi acrescentado às análises populacionais (Tpf23). A amplificação dos *loci* foi realizada por meio de reações com volume final de 25µl, contendo: tampão de Taq DNA polimerase 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,4 µM de cada iniciador; 4 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 1 µl de DNA genômico. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento dos iniciadores (temperaturas na **Tabela 2.1**) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; finalizando com um ciclo de extensão final a 72°C por 20 min.

Tabela 2.1 - Primers utilizados para amplificação dos 12 loci microssatélites utilizados nas análises populacionais de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico Ocidental.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Unidade de repetição	Temperatura de anelamento	Referência
Tpf10	F: TCGAGGACACATACTGGGTG R: TGCTGTGGTGTTCACCTCA	(ATGT)7	64,4°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf12	F: GAAATGAATATTTTGCATTATTGAAC R: GCTTCTCTATATGAAAAGTCC	(CAATT)9	58°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf14	F: ACAGGCAAAGGATTTACTGGT R: CTGCGGTTGAGCAGAGGT	(TTG)10	58°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf17	F: ATCCATGCCCTCGACATTTA R: TTATTTAGGGGAAGGCTCGG	(AAC)10	66,4°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf18	F: AACTTTATTGTTTATGCAGTTCCTC R: GGTTCACACGCTATTCGTGT	(TCT)12	62°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf19	F: GGTTCACACGCTATTCGTGT R: GATGAGTCAACGCATCACAA	(TGT)8	62°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf20	F: GTTAATGGTGGAGGAACTGGA R: TTTGATACAAACGCGTGAATTT	(GAG)10	62°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf26	F: ACGGACAGCACGTTCAAAT R: AAATCTGTCATTTCTCTATCTT	(GT)9	64,4°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf35	F: CCAGGAGGGGTCCATCATTT R: CCATACAGTTGTCCATCCATCA	(ATGG)6	60°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf39	F: CCAGATGGTGGCGGTAAT R: CGTCGGCTTTGATTGTTTCA	(AGA)6	66,4°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf43	F: ACCTTTTAGATCTGATCAGGAAATGAT R: CTCCTTCTGGTGCATTTGT	(AGC)6	63°C	Bernard, Hilsdorf, et al. (2014)
Tpf23	F: GGTGAAATTATGATGAAGGG R: TCTCTATGTTTGTCTATCCATTATCCA	(GATA)5	57°C	Presente estudo

A eletroforese e a genotipagem dos *loci* foram executadas em gel de poliacrilamida (Matrix Plus denaturing[®]) 6,5% em equipamento Li-Cor 4300 DNA Analyzer, usando marcador por fluorescência IRDye[®]800 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) com sequência complementar à cauda M13 (5' TGTAACGACGGCCAGT3'). O tamanho dos alelos foi estimado por interpolação de sua posição em relação ao marcador de peso molecular (50 - 350 pb) DNA Sizing Standard IRDye[®] 800 (LI-COR Biosciences) utilizando o programa SagaGT (LI-COR Biosciences). Possíveis erros de genotipagem foram minimizados por meio de genotipagem semiautomatizada (POMPANON et al., 2005).

A presença de alelos nulos foi verificada para cada *locus* com o programa Micro-Checker v2.2.3 (The University of Hull, Cottingham Road, Hull, UK). O índice de conteúdo polimórfico foi estimado no programa Cervus v3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007) e o desequilíbrio de ligação (DL) entre os loci foi avaliado no Arlequin v3.1. Parâmetros descritivos como número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), número de alelos privados ($Priv.$), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e déficit de heterozigotos (F_{IS}) foram calculados nos programas MSA v4.05 (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003) e Arlequin v3.1. O índice de diferenciação genética F_{st} (WRIGHT, 1949) entre as localidades CAR e BRA foi estimado no Arlequin v3.1, com 1.000 permutações.

Dois abordagens foram usadas para avaliar a existência de estruturação genética entre populações de *T. pfluegeri* no oceano Atlântico. O programa STRUCTURE v. 2.3 (PRITCHARD et al., 2000) foi usado para conduzir uma rotina Bayesiana, por meio do modelo *admixture*, sem informação de populações a priori, com *burn-in* de 10.000, seguido de 1.000.000 ciclos MCMC (método de Monte Carlo baseado em Cadeias de Markov) e 20 iterações para cada valor de K (número de *clusters*). Procurando corroborar os resultados gerados pelo STRUCTURE, uma análise de componentes principais (DAPC) foi realizada por meio do pacote ADEgenet v2.0 (JOMBART, 2008), implementado no programa R (R CORE TEAM, 2013). Para isso, o melhor número de *clusters* (K) foi determinado usando a função *find.clusters*, a partir da qual foi estimado o critério de informação Bayesiano (BIC) para verificar o melhor modelo suportado (número e composição dos *clusters*). Os melhores modelos foram, então, avaliados pela DAPC com retenção dos 50 primeiros componentes principais (PCs) e quatro funções discriminantes.

Tanto para os *clusters* gerados pelo STRUCTURE, quanto para os *clusters* gerados pela DAPC, a diferenciação genética foi inferida por meio do índice D_{EST} de Jost (2008), usando o pacote DEMETics (JUETERBOCK et al., 2011), implementado no R, onde o nível de

significância foi estimado usando 1.000 iterações *bootstrap* e intervalo de confiança de 95%. No Arlequin, foi conduzida uma AMOVA, onde a estatística F (WEIR; COCKERHAM, 1984) foi usada para estimar a proporção de variabilidade genética existente entre os *clusters* (F_{ST}), entre *clusters* dentro de grupos (F_{SC}) e entre grupos (F_{CT}).

Uma análise para verificar o coeficiente de parentesco (R) e a taxa de endogamia (F) dos indivíduos foi conduzida no programa Coancestry v1.0.1.9 (WANG, 2011).

A correção de Bonferroni não foi usada devido a evidências, apresentadas na literatura, demonstrando que o método não é adequado para avaliações genéticas populacionais que utilizam múltiplos *loci* e são baseados em dados empíricos (MORAN, 2003; GARCÍA, 2004; ARMSTRONG, 2014; YE; WANG, 2020). Segundo Armstrong (2014), o ajuste de Bonferroni pode ser usado apenas quando: todos os testes de hipótese não forem significantes; for crucial evitar erro do tipo I; e quando muitos testes forem realizados, sem uma hipótese prévia, para verificar qualquer resultado significativo. Como tais pressupostos não se enquadram no presente estudo, o ajuste não foi aplicado.

2.3 Resultados

2.3.1 Análises populacionais por DNA mitocondrial

Das 177 amostras disponíveis, 27 foram removidas das análises pois seu DNA genômico apresentou alto grau de degradação, impossibilitando sua amplificação, ou por apresentarem muitos erros de sequenciamento, impossibilitando o alinhamento com as demais sequências.

As 150 amostras restantes foram divididas em dois grupos, de acordo com seu local de coleta. O grupo CAR, com 118 amostras, correspondente à região do Caribe e algumas amostras coletadas mais a Norte do oceano Atlântico ocidental, o que vai da latitude 9°N até 40,5°N. O grupo BRA, contendo 32 amostras, foi composto pelas amostras coletadas a partir da latitude 6,4°N até 24,1°S (**Figura 2.1**).

Após alinhamento e edição, todas as sequências ficaram com 416 pb e apresentaram 16,58% de citosina, 32,65% de timina, 36,15% de adenina e 14,61% de guanina. No geral, foram identificados 96 haplótipos e 108 sítios polimórficos. A diversidade haplotípica variou entre 0,989 ($\pm 0,003$), na região CAR e 0,990 ($\pm 0,010$), na região BRA, já a diversidade nucleotídica variou entre 0,025 ($\pm 0,013$) e 0,027 ($\pm 0,014$), nas duas regiões respectivamente (**Tabela 2.2**). Para a região CAR foram verificados 69 haplótipos privados, onde o haplótipo 41 teve maior frequência ($n = 8$), enquanto que, para a localidade BRA foram verificados apenas 16 haplótipos privados, todos com baixa frequência (**Apêndice A**).

Não houve diferenciação genética significativa entre as duas localidades ($\Phi_{ST} = 0,00091$; p -valor = 0,335). Porém, o modelo de agrupamento de indivíduos por análise Bayesiana (BAPS) indicou que, considerando o menor valor de log (-2488,8), a melhor divisão foi de três *clusters* ($K = 3$) (Mt1, Mt2 e Mt3) (**Figura 2.2a**), os quais se encontravam distribuídos em ambas as localidades (**Figura 2.2b**), todos apresentando haplótipos privados (**Apêndice B**). A MOVA indicou diferenciação genética entre todos os pares de *clusters* (**Tabela 2.3**). Na AMOVA hierarquizada o índice de fixação entre grupos (Φ_{CT}) mostrou valores baixos e não significantes (p -valor $> 0,05$), enquanto os índices de fixação entre *clusters* (Φ_{ST}) e entre *clusters* dentro de grupos (Φ_{SC}) foram altos e significativos (p -valor $< 0,001$) (**Tabela 2.4**).

A rede de haplótipos (**Figura 2.2c**), apresentou um padrão estrelado, caracterizado pela presença de poucos haplótipos de maior frequência ao centro da distribuição, possivelmente haplótipos ancestrais, dos quais se ramificam muitos haplótipos pouco prevalentes mediante poucos passos mutacionais. Os três *clusters* estimados pelo BAPS se organizaram em três possíveis linhagens distintas na rede de haplótipos (cada *clusters* correspondendo a uma

linhagem), sendo que, a ramificação correspondente ao Mt1 se separou da ramificação Mt2 por 10 passos mutacionais, a qual, por sua vez, se separou da ramificação Mt3 por sete passos mutacionais.

Tabela 2.2 - Índices de diversidade genética para *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental. n : número de indivíduos; S : número de sítios polimórficos; H : número de haplótipos; h : diversidade haplotípicas e desvio padrão; π : diversidade nucleotídica e desvio padrão. Localidades de coleta.

Localidades	n	S	H	h	π
CAR	118	101	80	$0,989 \pm 0,003$	$0,025 \pm 0,013$
BRA	32	56	27	$0,990 \pm 0,010$	$0,027 \pm 0,014$
Geral	150	108	96	$0,989 \pm 0,003$	$0,025 \pm 0,013$

Figura 2.2: a) *Clusters* de indivíduos da espécie *Tetrapturus pfluegeri* estimados pelo BAPS v5.4 com base em genótipos de múltiplos loci (416 pb da região controle do DNAm). Melhor divisão encontrada para $k = 3$. Cada barra vertical representa um genótipo individual. Indivíduos representados por mais de uma cor possuem genótipos de origem proporcionalmente mista. b) Proporção de cada *cluster* nas localidades amostrais do oceano Atlântico ocidental. Os gráficos em pizza representam a proporção de indivíduos pertencentes aos *clusters* estimados pela análise Bayesiana em cada localidade. c) Rede de haplótipos demonstrando as relações genealógicas entre *clusters*, onde cada haplótipo é representado por um círculo cuja área é proporcional à frequência do haplótipo.

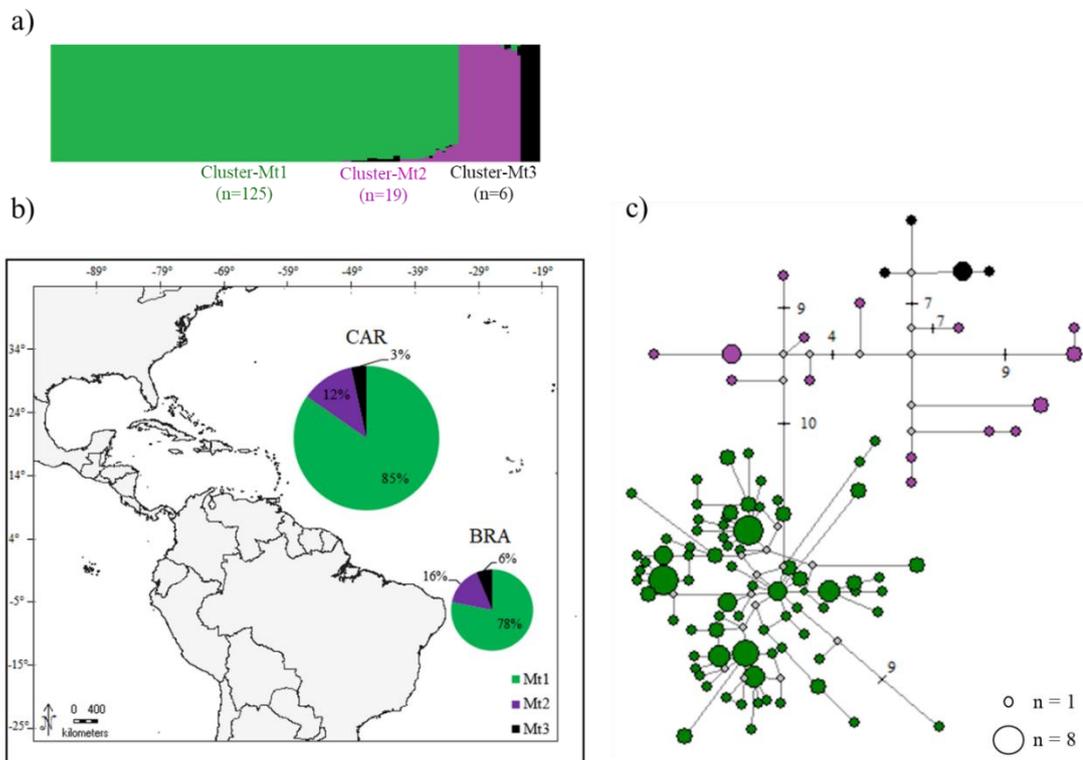


Tabela 2.3 - Diferenciação genética (Φ_{ST}) para cada par de *clusters* estimados pelo BAPS (abaixo da diagonal) e seus respectivos *p*-valores (acima da diagonal).

Clusters	Mt1	Mt2	Mt3
mt1	-	0,009	0,000
mt2	0,021	-	0,000
mt3	0,086	0,101	-

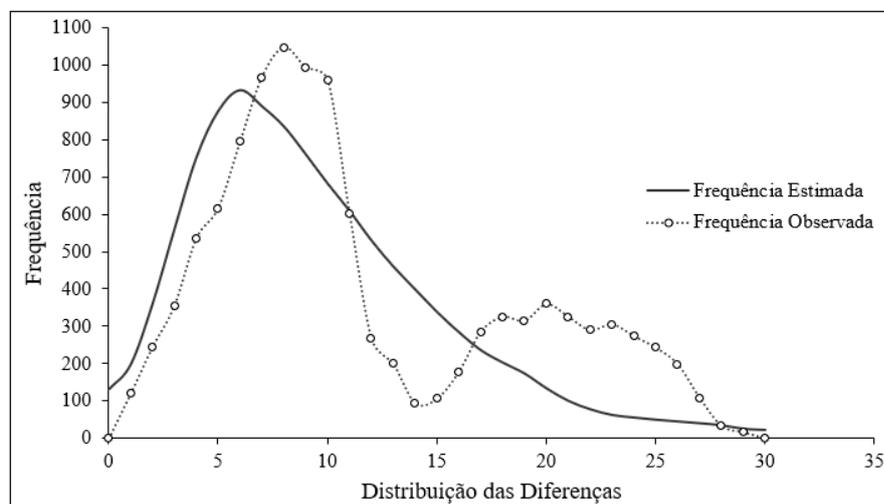
Tabela 2.4: AMOVA hierarquizada para dados de sequenciamento da região D-loop de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental, considerando a divisão dos indivíduos por *clusters*, sugerida pelo BAPS. Φ : índice de diferenciação genética entre *clusters* dentro de grupos (Φ_{SC}), dentro dos *clusters* (Φ_{ST}) e entre grupos (Φ_{CT}). V: taxa de variação entre grupos (a), entre *clusters* dentro dos grupos (b) e dentro dos *clusters* (c).

Grupos	Φ_{SC}	Vb (%)	Φ_{ST}	Vc (%)	Φ_{CT}	Va (%)
mt1 (mt2+mt3)	0,556*	45,640	0,635*	36,460	0,179	17,900
mt2 (mt1+mt3)	0,723*	105,960	0,594*	40,650	-0,466	-46,610
mt3 (mt1+mt2)	0,595*	42,890	0,708*	29,170	0,279	27,940

**p*-valor < 0,001

A distribuição *mismatch* mostrou um padrão bimodal, para a amostragem geral (**Figura 2.3**), um indicativo de tamanho populacional constante segundo o modelo de expansão demográfica de Rogers e Harpending (1992). Entretanto, alguns autores sugerem que curvas bimodais podem ser decorrentes do agrupamento de dois *pools* genéticos com histórias demográficas diferentes (PÉREZ-PORTELA et al., 2010; JENKINS et al., 2018), parecendo ser o caso do agulhão-verde.

Figura 2.3: Distribuição *mismatch* gerada por seqüências da região D-loop do DNAm_t de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental.



A soma dos desvios quadrados (SSD) e o índice raggedness (Hri) apresentaram valores baixos e não significantes, demonstrando um bom ajuste à distribuição *mismatch* e à hipótese de expansão populacional. A hipótese de expansão populacional também foi sustentada pelos testes F_s de Fu (-24,248; p -valor = 0,001) e R_2 (0,085; p -valor = 0,000), o oposto do estimado pelo teste D de Tajima (-1,336; p -valor = 0,068) (**Tabela 2.5**). É importante destacar que os testes R_2 e F_s são os mais consistentes para detectar um cenário de expansão populacional e o comportamento do teste R_2 é ainda superior para pequenos tamanhos amostrais (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002).

O tempo desde a expansão populacional em gerações (τ), estimado pelo *mismatch*, foi de 4,219 unidades de tempo mutacional. Dessa forma, com uma taxa mutacional por locus por geração (μ) de 1,8% - 4,5%, foi estimado que o início da expansão populacional pode ter ocorrido entre 112,7 e 281,7 mil anos atrás.

Tabela 2.5: Parâmetros da distribuição *mismatch* e testes de neutralidade estimados a partir da região D-loop do DNAm de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental. θ_0 (theta no tempo zero), θ_1 (theta no tempo atual), SSD (soma dos desvios quadrados), *Hri* (índice *raggedness* de Harpending), R_2 (teste de neutralidade de Ramos-Onsins e Rozas), F_s (teste de neutralidade de Fu), D (teste de neutralidade de Tajima).

Localidades	Modelo de Expansão Populacional						Testes de Neutralidade					
	θ_0	θ_1	SSD	p -valor	<i>Hri</i>	p -valor	R_2	p -valor	F_s	p -valor	D	p -valor
CAR	5,563	81,250	0,007	0,280	0,004	0,620	0,089	0,000	-24,354	0,000	-1,327	0,069
BRA	10,842	99999,0	0,008	0,580	0,008	0,560	0,116	0,000	-11,933	0,001	-0,768	0,229
Geral	6,792	100,469	0,006	0,380	0,003	0,660	0,085	0,000	-24,248	0,001	-1,336	0,068

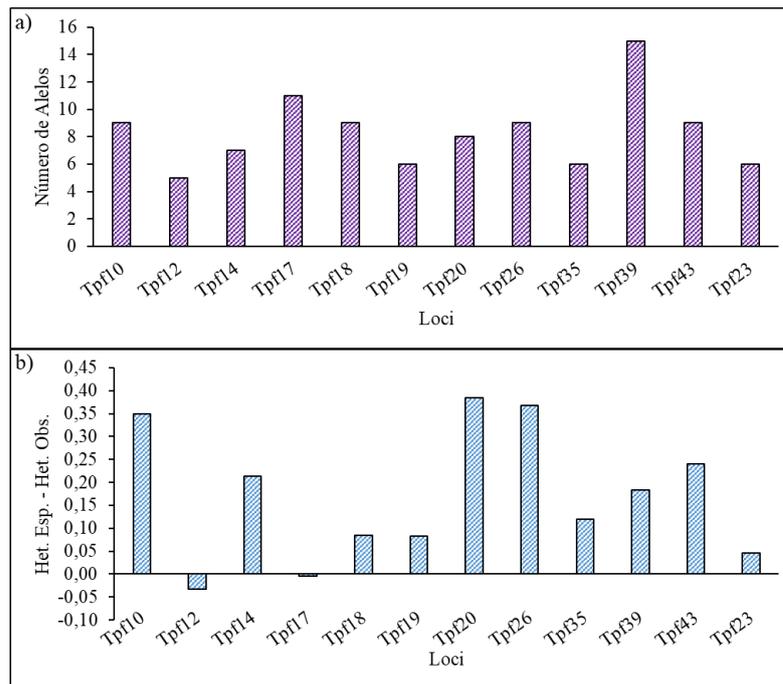
2.3.2 Análises populacionais por microsatélites

Foi avaliado um total de 12 *loci* e 177 indivíduos, sendo que, 33 indivíduos foram excluídos das análises por apresentarem excesso de dados faltantes. Portanto, restaram 144 indivíduos, sendo 116 da localidade CAR e 28 da localidade BRA.

As análises exploratórias demonstraram que apenas os *loci* Tpf12, Tpf17 e Tpf19 não apresentaram alelos nulos. O *locus* Tpf39 apresentou maior riqueza alélica ($A_r = 13,019$) e maior índice de conteúdo polimórfico ($PIC = 0,815$). Para a maioria dos *loci*, a heterozigosidade esperada (H_e) foi maior que a heterozigosidade observada (H_o) (**Figura 2.4**). A população geral demonstrou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor $< 0,05$), exceto para os *loci* Tpf17 e Tpf19. As maiores deficiências de heterozigosidade foram verificadas nos *loci* Tpf20 ($F_{IS} = 0,622$) e Tpf26 ($F_{IS} = 0,663$). Na localidade CAR todos os *loci* tiveram alelos

privativos e apenas o *locus* Tpf26 apresentou alelos privativos na localidade BRA (**Tabela 2.6**). Apenas dois pares de *loci* (Tpf10/Tpf17 e Tpf20/Tpf26) apresentaram valores significantes para desequilíbrio de ligação (**Tabela 2.7**).

Figura 2.4: Número de alelos por *locus* (a) e diferença entre heterozigosidade esperada e observada por *locus* (b) para os 12 *loci* microssatélites utilizados no estudo populacional de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental.



Não houve diferenciação genética significativa entre as localidades CAR e BRA ($F_{ST} = 0,003$; p -valor = 0,489). Entretanto, a análise Bayesiana realizada no STRUCTURE estimou separação dos indivíduos em três *clusters* ($K = 3$) (St1, St2, St3) (**Figura 2.5a**). Já a DAPC estimou um $K = 5$, o qual apresentou o menor valor de BIC (204,533) com a variância explicando 98% dos dados. No *scatter plot* (**Figura 2.6a**) é possível verificar que os *clusters* 2/5 e 3/4 estão sobrepostos, mostrando que os indivíduos se dividiram em três agrupamentos geneticamente distintos: Ag1 {1}; Ag2 {2/5} e Ag3 {3/4}. Entretanto, a composição de indivíduos dos *clusters* estimados pelo STRUCTURE não foi a mesma dos agrupamentos estimados pela DAPC (**Apêndice C**).

No cenário estimado pelo STRUCTURE, todos os *clusters* tiveram distribuição em ambas as localidades, com o *cluster* St1 mais frequente na localidade BRA, correspondendo a 52% dos indivíduos, e menos frequente na localidade CAR, com 27% dos indivíduos (**Figura 2.5b**). Já no cenário obtido pela DAPC, um dos agrupamentos (Ag1) ficou restrito à localidade

CAR, correspondendo a 22% dos indivíduos. Os agrupamentos Ag2 e Ag3 se distribuíram por ambas as localidades, com o Ag3 sendo o mais frequente nas duas localidades, representando 68% dos indivíduos na localidade BRA e 43% dos indivíduos na localidade CAR (**Figura 2.6b**).

Tabela 2.6: Diversidade genética referente aos 12 *loci* microssatélites utilizados para análise populacional de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental. n: número de indivíduos. A: número de alelos. Ar: riqueza alélica; Ho: heterozigosidade observada. He: heterozigosidade esperada. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg. F_{IS} : déficit de heterozigosidade. PIC: índice de conteúdo polimórfico. Null: frequência de alelos nulos. Priv.: número de alelos privativos.

	<i>Loci</i>											
	Tpf10	Tpf12	Tpf14	Tpf17	Tpf18	Tpf19	Tpf20	Tpf26	Tpf35	Tpf39	Tpf43	Tpf23
BRA	n	28	28	28	27	28	27	28	28	28	28	26
	A	7	3	5	6	5	4	6	7	3	13	5
	Ar	7,000	3,000	5,000	7,000	5,000	5,000	6,000	7,000	3,000	13,000	5,000
	Ho	0,429	0,286	0,393	0,778	0,607	0,593	0,286	0,179	0,357	0,786	0,571
	He	0,788	0,257	0,401	0,754	0,683	0,642	0,729	0,557	0,425	0,877	0,724
	EHW	0,000	1,000	0,265	0,957	0,239	0,603	0,000	0,000	0,538	0,017	0,103
	F_{IS}	0,454	-0,122	0,012	0,018	0,104	0,136	0,606	0,679	0,154	0,096	0,205
	PIC	0,740	0,234	0,375	0,703	0,611	0,555	0,667	0,485	0,344	0,849	0,658
	Priv.	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	CAR	n	104	116	113	107	116	108	103	114	111	108
A		9	5	7	11	9	6	8	7	6	15	9
Ar		8,545	4,238	5,880	9,617	5,795	5,898	7,153	5,474	4,802	12,939	7,304
Ho		0,452	0,414	0,292	0,804	0,569	0,611	0,311	0,202	0,315	0,611	0,469
He		0,796	0,379	0,547	0,807	0,657	0,699	0,679	0,568	0,450	0,817	0,732
EHW		0,000	0,039	0,000	0,060	0,095	0,203	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F_{IS}		0,509	-0,094	0,500	0,106	0,133	0,224	0,624	0,659	0,389	0,319	0,386
PIC		0,765	0,345	0,485	0,78	0,594	0,635	0,633	0,486	0,385	0,799	0,683
Priv.		2	2	2	5	4	2	2	2	3	2	4
Geral		n	132	144	141	134	144	135	131	142	139	136
	A	9	5	7	11	9	6	8	9	6	15	9
	Ar	8,430	4,051	5,724	9,228	5,654	5,705	7,065	5,757	4,589	13,019	7,071
	Ho	0,447	0,389	0,312	0,799	0,576	0,607	0,305	0,197	0,324	0,647	0,489
	He	0,797	0,356	0,525	0,795	0,661	0,690	0,690	0,565	0,444	0,830	0,729
	EHW	0,000	0,028	0,000	0,055	0,046	0,207	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	F_{IS}	0,502	-0,094	0,438	0,091	0,126	0,212	0,622	0,663	0,349	0,277	0,351
	PIC	0,767	0,325	0,473	0,767	0,598	0,625	0,643	0,487	0,377	0,815	0,679
	Null	0,218	-0,039	0,192	-0,001	0,064	0,058	0,265	0,296	0,121	0,113	0,160

Caracteres em negrito: valores significantes para desvio do EHW; presença de alelos nulos.

Tabela 2.7: Valores de desequilíbrio de ligação (abaixo da diagonal) e seus respectivos p -valores (acima da diagonal) para os 12 *loci* utilizados na análise populacional de *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental.

	Tpf10	Tpf12	Tpf14	Tpf17	Tpf 18	Tpf19	Tpf20	Tpf26	Tpf35	Tpf39	Tpf43	Tpf23
Tpf10		0,053	0,954	0,005	0,159	0,293	0,058	0,203	0,154	0,962	0,945	0,298
Tpf12	-96		0,420	0,172	0,628	0,909	0,222	0,579	0,148	0,901	0,145	0,794
Tpf14	-115	-58		0,341	0,355	0,529	0,333	0,709	0,692	0,487	0,362	0,410
Tpf17	-133	-90	-104		0,081	0,562	0,205	0,389	0,653	0,666	0,393	0,776
Tpf18	-128	-77	-90	-119		0,316	0,136	0,633	0,413	0,203	0,487	0,193
Tpf19	-127	-76	-89	-121	-106		0,593	0,827	0,363	0,885	0,323	0,509
Tpf20	-138	-89	-102	-133	-120	-121		0,009	0,106	0,607	0,158	0,439
Tpf26	-125	-74	-88	-119	-107	-106	-112		0,229	0,851	0,326	1,000
Tpf35	-106	-49	-67	-101	-85	-82	-97	-80		0,933	0,749	0,699
Tpf39	-170	-125	-133	-158	-146	-150	-160	-149	-134		0,392	0,147
Tpf43	-139	-80	-95	-127	-115	-112	-125	-111	-92	-152		0,654
Tpf23	-96	-39	-54	-90	-72	-72	-88	-73	-48	-119	-80	

Caracteres em negrito: p -valor significativo para desequilíbrio de ligação ($p < 0,05$).

Figura 2.5: a) Estrutura populacional estimada pelo STRUCTURE para *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental, com base em 12 *loci* microsatélites. O modelo com $K = 3$ apresentou melhor ajuste no valor de delta K . Cada cor representa um *cluster* onde estão inseridos os indivíduos com maior similaridade genética. b) Proporção de indivíduos pertencentes a cada agrupamento nas localidades CAR e BRA.

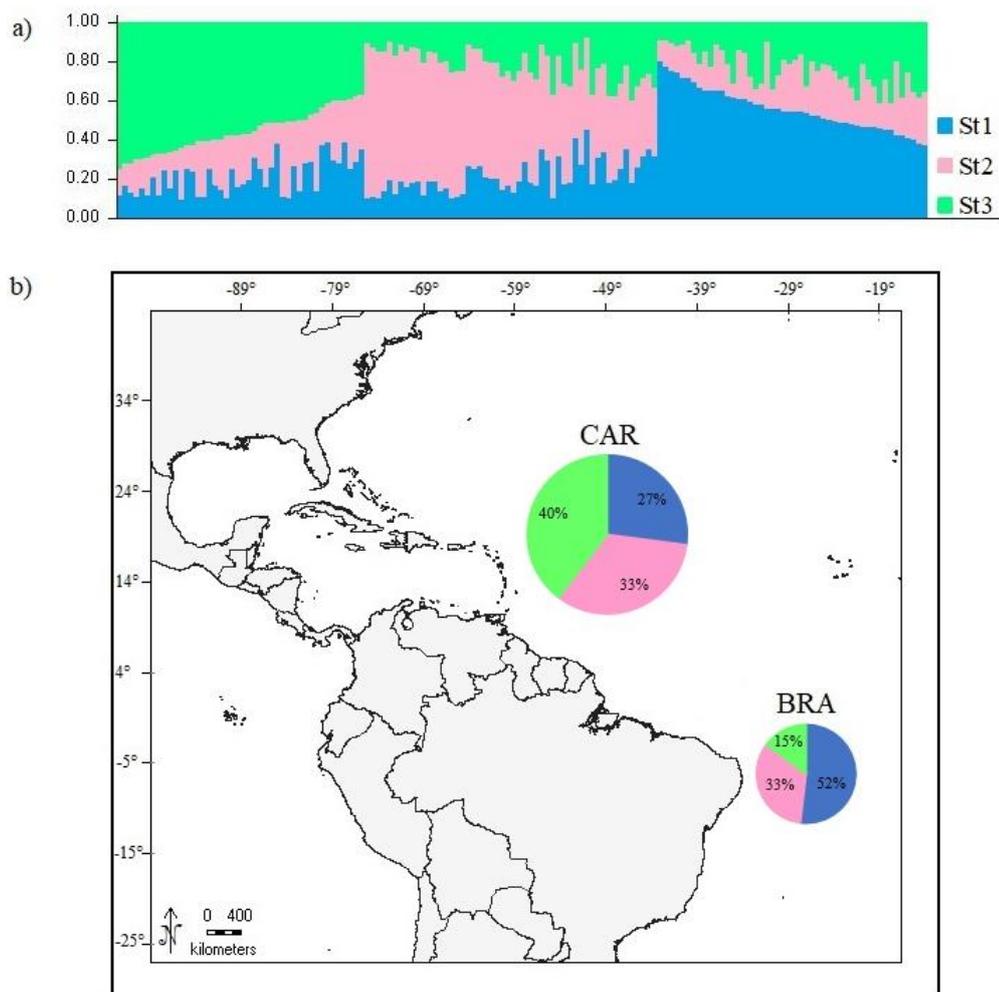
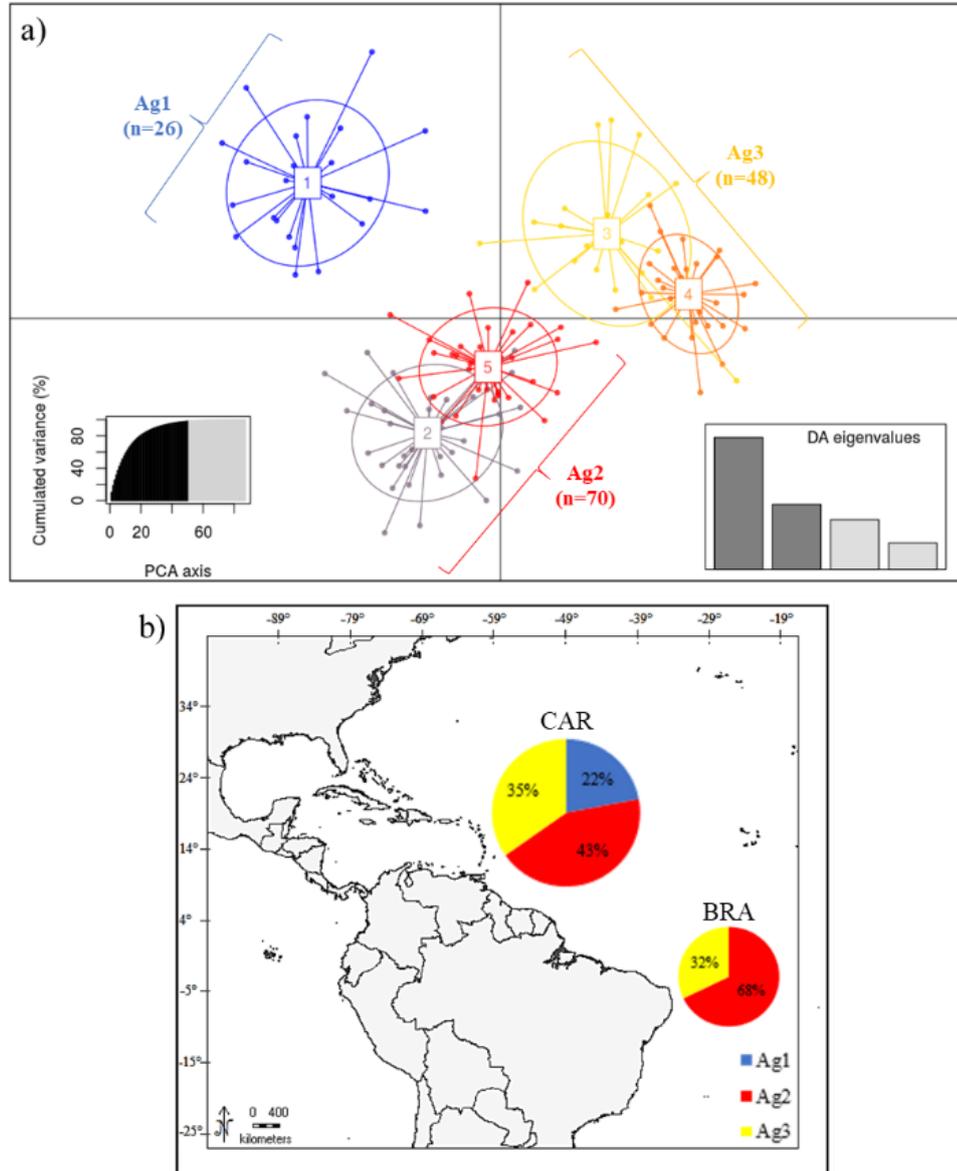


Figura 2.6: a) Análise discriminante de componentes principais (DAPC) para *Tetrapturus pflurgeri* do Atlântico ocidental, com base em 12 *loci* microssatélites. O modelo com $K = 5$ apresentou melhor ajuste, com menor valor de log (204,8), 50 PCs retidas, 99% de variância acumulada (gráfico à esquerda) e 4 funções discriminantes (gráfico à direita). Cada cor representa um *cluster* e as cores predominantes representam os agrupamentos (Ag). b) Proporção de indivíduos pertencentes a cada agrupamento nas localidades CAR e BRA.



A AMOVA para os *clusters* St1, St2 e St3 estimou um F_{ST} de 0,075 (p -valor = 0,000), com 7,47% de variação entre os *clusters* e 92,53% de variação dentro dos *clusters*. A diferenciação genética entre pares de *clusters* variou entre 0,062 e 0,084 (p -valor < 0,05), sendo que o valor mais alto foi verificado entre os *clusters* St2 e St3 e o menor valor, entre St3 e St1 (Tabela 2.8).

Para os agrupamentos da DAPC (Ag1, Ag2 e Ag3), o F_{ST} geral foi de 0,198 (p -valor = 0,000), com 19,84% de variação entre os agrupamentos e 80,16% de variação dentro dos

agrupamentos. A diferenciação genética entre os pares de agrupamentos variou de 0,164 a 0,240 (p -valor $< 0,05$), onde a maior diferenciação foi verificada entre Ag1 e Ag3 e a menor diferenciação, entre Ag2 e Ag1 (**Tabela 2.8**).

A AMOVA hierarquizada para os clusters gerados pelo STRUCTURE mostrou que não houve diferenciação entre os grupos (F_{CT}), mas houve diferenciação entre os *clusters* (F_{ST}) e entre *clusters* dentro de grupos (F_{SC}). O mesmo foi verificado para os agrupamentos gerados pela DAPC (**Tabela 2.9**).

Os valores de D_{EST} foram significantes para todos os pares de *clusters* e agrupamentos, variando entre 0,123 e 0,152 para os pares de *clusters* inferidos pelo STRUCTURE e, entre 0,092 e 0,176 para os pares de agrupamentos inferidos pela DAPC (**Tabela 2.10**).

Tabela 2.8: Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e seus respectivos p -valores (acima da diagonal) entre os *clusters* e agrupamentos estimados para *T. pfluegeri* do Atlântico ocidental.

STRUCTURE			
	St1	St2	St3
St1	-	0,000	0,000
St2	0,078	-	0,000
St3	0,062	0,084	-
DAPC			
	Ag1	Ag2	Ag3
Ag1	-	0,000	0,000
Ag2	0,164	-	0,000
Ag3	0,240	0,199	-

Caracteres em negrito: p -valor significante para desequilíbrio de ligação ($p < 0,05$).

Tabela 2.9: Análise de variância molecular (AMOVA) hierarquizada para dados de microssatélites de *T. pfluegeri* do Atlântico Ocidental, considerando a divisão dos indivíduos por *clusters* e agrupamentos estimados pelo STRUCTURE e pela DAPC. F : índice de diferenciação genética entre *clusters*/agrupamentos ($_{ST}$); entre *clusters*/agrupamentos dentro de grupos ($_{SC}$), e entre grupos ($_{CT}$). V : taxa de variação entre grupos (a), entre *clusters*/agrupamentos dentro dos grupos (b) e dentro dos *clusters*/agrupamentos (c).

STRUCTURE									
Grupo	F_{SC}	p -valor	Vb (%)	F_{ST}	p -valor	Vc (%)	F_{CT}	p -valor	Va (%)
St1 (St2+St3)	0,085	0,000	8,67	0,069	0,000	93,12	-0,018	1,000	-1,78
St2 (St1+St3)	0,065	0,000	6,45	0,079	0,000	92,10	0,014	0,333	1,45
St3 (St1+St2)	0,072	0,000	7,18	0,076	0,000	92,41	0,004	0,680	0,41
DAPC									
Ag1 (Ag2+Ag3)	0,196	0,000	19,54	0,200	0,000	79,94	0,005	0,662	0,52
Ag2 (Ag1+Ag3)	0,258	0,000	28,37	0,183	0,000	81,73	-0,101	1,000	-10,10
Ag3 (Ag1+Ag2)	0,156	0,000	14,54	0,214	0,000	78,60	0,068	0,322	6,86

Caracteres em negrito: valores significantes de diferenciação genética ($p < 0,05$).

Tabela 2.10: Índice de fixação D_{EST} (Jost, 2008) mostrando a diferenciação genética entre os *clusters* e agrupamentos para *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental. Valores de D_{EST} abaixo da diagonal e seus respectivos p -valores acima da diagonal.

D_{EST}			
STRUCTURE			
<i>Clusters</i>	St1	St2	St3
St1	-	0,001	0,001
St2	0,152	-	0,001
St3	0,123	0,151	-
DAPC			
Agrupamentos	Ag1	Ag2	Ag3
Ag1	-	0,001	0,001
Ag2	0,142	-	0,001
Ag3	0,176	0,092	-

As análises realizadas no Coancestry mostraram que os três *clusters* do STRUCTURE tiveram baixa taxa de endogamia (0,224 - 0,258), assim como ocorreu com os três agrupamentos da DAPC (0,249 - 0,282). O coeficiente de parentesco entre os *clusters* variou entre 0,084 e 0,099, já dentro do mesmo *cluster*, variou de 0,122 a 0,194. Nos agrupamentos da DAPC, o coeficiente de endogamia foi de 0,029 a 0,047 entre agrupamentos diferentes e de 0,117 a 0,173 dentro do mesmo agrupamento. Logo, indivíduos agrupados no mesmo *cluster*/agrupamento tiveram, em média, maior coeficiente de parentesco do que indivíduos de *clusters*/agrupamentos distintos (**Tabela 2.11**), sustentando as estimativas de diferenciação genética.

Tabela 2.11 - Coeficiente de parentesco (R) médio e taxa de endogamia (F) média estimados para os *clusters* e agrupamentos de indivíduos da espécie *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental.

STRUCTURE				
		St1	St2	St3
Número de Indivíduos		45	50	49
	F	0,238	0,224	0,258
R	St1	0,158	-	-
	St2	0,099	0,194	-
	St3	0,084	0,085	0,122
DAPC				
		St1	St2	St3
Número de Indivíduos		26	70	48
	F	0,254	0,282	0,249
R	St1	0,173	-	-
	St2	0,035	0,117	-
	St3	0,029	0,047	0,151

2.4 Discussão

O objetivo principal deste estudo foi testar a hipótese de panmixia para o agulhão-verde no Atlântico ocidental por se tratar de um predador pelágico, raramente encontrado, listado na captura acessória da pesca industrial e extremamente carente de informações na literatura. Para isso, foram usadas sequências da região D-loop, do DNAm_t, e 12 *loci* microssatélites, a partir dos quais foi estimada a diferenciação genética da espécie.

2.4.1 Diversidade genética

No presente estudo, os valores de diversidade haplotípica ($h = 0,989 \pm 0,003$) e nucleotídica ($\pi = 0,025 \pm 0,013$) da região D-loop de *T. pfluegeri* foram consistentes com valores reportados para outros istioforídeos (GRAVES; MCDOWELL, 2006; MCDOWELL; GRAVES, 2008; BERNARD et al., 2014a; LU et al., 2015; CHEN et al., 2016; MAMOOZADEH et al., 2018).

O fato de que parâmetros de diversidade podem estar associados à história demográfica das espécies marinhas é bem conhecido pela comunidade científica (GRANT; BOWEN, 1998; NIELSEN et al., 2009; XU et al., 2012; FRANKOWSKI et al., 2020), o que auxilia na interpretação de dados genéticos em estudos populacionais. Em um estudo realizado por Rubio-Castro et al. (2016), foi verificado que a diversidade nucleotídica de *Istiophorus platypterus* no oceano Pacífico foi drasticamente menor do que a literatura mostra para as populações do Atlântico, o que pode ser um indicativo de redução populacional em decorrência de eventos históricos ou pressões ambientais. Segundo os autores, a redução na diversidade genética pode ter ocorrido em períodos de instabilidade climática, quando águas frias circularam pelo Equador, reduzindo a fauna tropical e restringindo algumas espécies ao Sudoeste do Pacífico e ao oceano Índico.

Mudanças marinhas históricas, como variação de temperatura da superfície, variações nas correntes marítimas, intensidade de ressurgência e outros fatores, são frequentemente associados a alterações do tamanho populacional e a processos de extinção (GRANT; BOWEN, 1998). Segundo Grant e Bowen (1998), diferentes combinações entre baixa e alta diversidade nucleotídica e haplotípica do DNAm_t permitem que espécies marinhas sejam separadas em quatro categorias relacionadas a eventos populacionais, como por exemplo, expansão populacional e efeito fundador.

A diversidade genética também pode funcionar como indicativo de sobreexploração. Visto que a diversidade nucleotídica pode ter uma relação positiva com o tamanho populacional, populações sobreexploradas mostram redução de diversidade genética em várias espécies marinhas, o que, a longo prazo, pode levar a sérios impactos no potencial evolutivo e manutenção dos estoques (PINSKY; PALUMBI, 2014). Righi et al. (2020a) detectaram redução temporal das diversidades haplotípica e nucleotídica no DNAm de *X. gladius* do Mediterrâneo. Esse estudo verificou uma diversidade haplotípica de 0,861 a 0,946 e diversidade nucleotídica de 0,006 a 0,160 no ano de 2010. Já em 2020, os valores estimados foram de 0,418 a 0,844 e 0,003 a 0,130, respectivamente. Além disso, o estudo de Righi et al. (2020a) também mostrou redução no tamanho efetivo populacional de fêmeas, o que somado à perda de diversidade genética, foi relacionado às atividades de pesca comercial da região.

Redução na diversidade genética de microssatélites, assim como no tamanho efetivo populacional, também foram verificados em *Pagrus auratus* da Nova Zelândia ao longo de décadas de exploração comercial, podendo resultar em perda de adaptabilidade e redução nos estoques pesqueiros (HAUSER et al., 2002). Considerando que a perda de diversidade genética pode ser causada tanto por exploração pesqueira quanto por aspectos populacionais históricos, como deriva genética, definir limites de referência para ações de monitoramento e conservação continuam sendo um grande desafio (KENCHINGTON et al., 2003) .

O fato de a diversidade genética verificada no presente estudo ter sido muito próxima a valores estimados em diversos estudos prévios com peixes-de-bico, não é suficiente para concluir que a espécie não tem sofrido algum tipo de pressão de captura. Isso porque, os valores de diversidade genética que constam na literatura para peixes-de-bico considerados vulneráveis (*K. albida* e *M. nigricans*) e com captura proibida, são muitas vezes, bem próximos, ou até mais elevados que para espécies não vulneráveis. Por exemplo, Buonaccorsi et al., (2001) verificaram diversidade genética de $h = 0,76 - 0,93$ e $\pi = 0,016 - 0,052$ avaliando a região D-loop de *M. nigricans* (espécie considerada vulnerável) dos oceanos Atlântico e Pacífico; Mamoozadeh et al., (2018) estimaram diversidade de $h = 0,99$ e $\pi = 0,031$ para *K. albida* (vulnerável) no oceano Atlântico, enquanto Rubio-Castro et al., (2016) verificaram diversidade genética de $h = 0,902 - 1,000$ e $\pi = 0,0062 - 0,0082$ para *I. platypterus* do ceano Pacífico (Apêndice D).

Isso mostra a escassez de informações para que se possa relacionar a diversidade genética dos peixes-de-bico com a pressão pesqueira sofrida por cada espécie e seu grau de vulnerabilidade, reforçando a grande necessidade de estudos genéticos populacionais para esse

grupo de peixes. Principalmente para que se possa realizar comparações a fim de verificar se a diversidade genética diminui ou se mantém estável a longo prazo.

Levando em consideração estudos populacionais usando apenas marcadores microsatélites, o número de *loci* e de alelos é extremamente variável entre diferentes estudos (SORENSEN et al., 2013; BERNARD et al., 2014a; WILLIAMS et al., 2015; MAMOOZADEH et al., 2017; MAMOOZADEH et al., 2018; WILLIAMS et al., 2020). Além disso, a quantidade de regiões avaliadas mostra uma tendência de crescimento ao longo dos anos. Por exemplo, entre os anos de 2002 a 2008, muitos trabalhos foram realizados com três a cinco *loci* (MCDOWELL; GRAVES, 2002, 2008; GRAVES; MCDOWELL, 2006; KASAPIDIS et al., 2007a, 2007b; KOTOULAS et al., 2007), enquanto que, a partir de 2011 observa-se um aumento dessa quantidade, como nos estudos de Purcell e Edmands (2011), Muths et al. (2013) e Mamoozadeh et al. (2018) com 12, 19 e 24 *loci*, respectivamente.

Estudos prévios demonstraram que a representatividade da diversidade genética depende de diversos parâmetros além do número de *loci*, como por exemplo, número de amostras, nível de diferenciação genética e taxa de polimorfismo dos marcadores (MORIN et al., 2012; ARTHOFER et al., 2018). Morin et al. (2012) mostraram que, usando 20, 10 e 5 *loci* microsatélites e 40 amostras por população, as análises populacionais de baleias da Groenlândia tiveram a mesma performance. Com isso é possível afirmar que o número de regiões e amostras avaliados no presente estudo estão dentro do que é comumente apresentado e considerado estatisticamente aceitável na literatura.

2.4.2 História demográfica de *Tetrapturus pfluegeri*

Os testes de neutralidade, assim como a distribuição *mismatch* para *T. pfluegeri* do oceano Atlântico ocidental mostraram resultados compatíveis com o modelo de expansão populacional. Confirmando assim, o que foi observado na diversidade genética inferida no presente estudo, por dados mitocondriais, onde a diversidade haplotípica (h) foi alta (0,989-0,990) e a diversidade nucleotídica (π), baixa (0,025-0,027) para ambas as localidades. Este padrão de diversidade condiz com eventos de expansão demográfica após um período de pequeno tamanho efetivo populacional, onde o rápido crescimento leva à retenção de novas mutações na população (GRANT; BOWEN, 1998).

Além disso, a configuração geral da rede de haplótipos apresenta muitos haplótipos raros, derivados de poucos haplótipos mais frequentes, dos quais, são separados por poucos passos mutacionais, formando um padrão estrelado. Isso sugere que os haplótipos derivados sejam resultado de eventos mutacionais mais recentes (ROGERS; HARPENDING, 1992; ROGERS, 1996; JENKINS et al., 2018). Segundo Hauser e Ward (1998), o excesso de alelos raros e filogenia em padrão estrelado são características esperadas de populações que passaram por processo de expansão, o que já foi empiricamente demonstrado para algumas espécies de peixes marinhos pelágicos (DÍAZ-JAIMES et al., 2010; SACCO et al., 2015; OKAZAKI et al., 2020), incluindo os peixes-de-bico (ALVARADO-BREMER et al., 2005b; RUBIO-CASTRO et al., 2016; MAMOOZADEH et al., 2018).

Os padrões gerados pela distribuições *mismatch* também funcionam como indicativos de eventos demográficos, onde curvas multimodais representam estabilidade demográfica e tamanho populacional constante, enquanto curvas unimodais representam expansão populacional (ROGERS; HARPENDING, 1992; HARPENDING, 1994). Entretanto, estudos prévios demonstraram que uma distribuição bimodal, somada à observação de linhagens distintas na rede de haplótipos, pode ser interpretada como um indício de vicariância. Segundo Pérez-Portela et al. (2010), uma distribuição bimodal pode ocorrer devido ao agrupamento de dois *pools* genéticos com diferentes histórias demográficas. Por exemplo, Alvarado-Bremer et al. (2005a) observaram a ocorrência de duas linhagens mitocondriais para *X. gladius* do Mediterrâneo e uma curva bimodal na distribuição *mismatch*. Com isso, os autores sugeriram que a melhor interpretação seria alopatria seguida de contato secundário. O mesmo cenário foi observado no presente estudo, gerando fortes indícios de que *T. pfluegeri*, possivelmente, não é caracterizada por uma única população no oceano Atlântico.

O tempo estimado desde a expansão demográfica para *T. pfluegeri* foi entre 112,7 e 281,7 mil anos atrás, sugerindo que tal evento esteja relacionado a períodos glaciais mais recentes. Segundo Rubio-Castro et al. (2016), considerando que os dois últimos períodos glaciais ocorreram entre aproximadamente 70 e 200 mil anos atrás, é possível dizer que este período teve impacto importante nos peixes-de-bico e outras espécies de grandes migradores pelágicos. Sendo que, um período glacial seria responsável por um efeito gargalo nas populações que ficaram restritas à região tropical e se expandiram nos períodos interglaciais devido ao degelo e aumento das áreas de distribuição.

2.4.3 Diferenciação genética

No presente estudo, não foi verificada diferenciação genética entre amostras das localidades BRA e CAR. Todavia, tanto as análises Bayesianas (para as sequências do D-loop e para os microssatélites) quanto a DAPC (para microssatélites) dividiram os indivíduos em três agrupamentos com alta diferenciação genética. Fato este, corroborado pelo menor parentesco estimado entre os agrupamentos. Neste caso, os resultados divergentes, gerados pelos diferentes métodos de agrupamento (por localidade e por cluster), pode ser decorrente do fato de que o comportamento de locomoção por longas distâncias, característico dos peixes-de-bico, pode levar à mistura de indivíduos de múltiplas origens em determinadas áreas (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006; JOMBART et al., 2010; MAIRMANS, 2015), gerando um falso sinal de panmixia quando a análise de diferenciação genética é feita por meio da comparação entre locais de coleta.

É importante ressaltar que, até o momento, não existe consenso a respeito da existência de estruturação populacional em peixes-de-bico. Os resultados variam muito na literatura, dependendo da espécie, da região, do tipo de marcador molecular e das abordagens adotadas em diferentes estudos. Para o espadarte, por exemplo, existe grande divergência quanto à estruturação genética dentro do mesmo oceano ou entre oceanos diferentes. Entretanto, os resultados vêm se aproximando de um consenso em estudos mais recentes.

Grijalva-Chon et al., (1994) e Alvarado-Bremer et al. (1995) não encontraram estruturação genética em espadartes de diferentes regiões do Oceano Pacífico, assim como entre o Pacífico, Atlântico e Mediterrâneo. O primeiro indício de diferenciação para a espécie foi verificado por Kotoulas et al. (1995) entre o oceano Atlântico e o mar Mediterrâneo, o qual foi corroborado por Alvarado-Bremer et al. (1996) ao encontrar diferenciação genética entre os oceanos Atlântico, Pacífico e mar Mediterrâneo. Mais recentemente, estudos vêm detectando estruturação entre populações de *X. gladius* do Atlântico Norte e Atlântico Sul (ALVARADO-BREMER et al., 2005a; SMITH et al., 2015). Ademais, Lu et al. (2016) verificaram diferenciação genética entre espadartes da zona temperada e da zona tropical do oceano Pacífico.

A respeito dos agulhões, McDowell e Graves (2008) verificaram haver estruturação populacional discreta em *K. audax* de diferentes localidades do oceano Pacífico. Para isso, os autores utilizaram sequências da região D-loop de 373 indivíduos e cinco *loci* microssatélites. Ao avaliar 245 indivíduos da mesma espécie usando SNPs isolados por NGS (sequenciamento

de próxima geração), Mamoozadeh et al. (2019) verificaram a existência de seis populações diferentes ao longo de toda a sua área de distribuição no Oceano Pacífico.

Para *M. nigricans* e *K. albida*, duas espécies consideradas vulneráveis, a divergência de resultados acontece mesmo em estudos da mesma região geográfica, usando os mesmos marcadores moleculares (GRAVES; MCDOWELL, 2006; MCDOWELL et al., 2007; CHEN et al., 2016; MAMOOZADEH et al., 2018; WILLIAMS et al., 2020). Graves e McDowell (2006) identificaram diferenciação genética para *K. albida* entre localidades do Atlântico ocidental, tanto por meio de sequências mitocondriais, quanto por meio de cinco regiões microsatélites. Contudo, Mamoozadeh et al. (2017), em estudo de maior poder estatístico, verificaram haver um único estoque genético dessa espécie no oceano Atlântico. Segundo os autores, maiores tamanhos amostrais, ampla representação geográfica e maior número de marcadores moleculares resultam em menores níveis de heterogeneidade genética, evitando observação equivocadas de estruturação populacional. Assim, é preciso que mais estudos genéticos populacionais sejam conduzidos para *T. pfluegeri*, visando corroborar a existência de estruturação populacional no Atlântico, pois os resultados apresentados no presente estudo não são conclusivos.

Com relação às análises realizadas por meio de marcadores microsatélites, dois métodos foram usados para verificar a existência de estruturação populacional em *T. pfluegeri* do oceano Atlântico. O primeiro método se baseia em análise Bayesiana e foi realizado no STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000), já o outro, consiste em uma análise multivariada, a DAPC, desenvolvida por Jombart et al. (2010). Os resultados obtidos pelos dois métodos mostram que ambos estimaram a presença de três *clusters*/agrupamentos, nos quais a composição de indivíduos e os valores de F_{ST} e D_{EST} foram claramente diferentes.

A divergência nos resultados gerados pelo STRUCTURE e pela DAPC se deve a características dos próprios métodos. O STRUCTURE foi amplamente disseminado em estudos populacionais de diversos organismos (MORGAN et al., 2007; ACHARYA et al., 2019; CHEN et al., 2019; ISLAM et al., 2019; WANG et al., 2020; NINWICHIAN; KLINBUNGA, 2020; RIGHI et al., 2020b; SRITHAWONG et al., 2020), sendo o programa mais usado para detectar estruturação populacional a partir de dados genéticos até o início dos anos 2000 (KAEUFFER et al., 2007). Esse programa usa o algoritmo desenvolvido por Pritchard et al. (2000), o qual assume que os *loci* estão em completo equilíbrio de ligação na população e que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os autores afirmam, ainda, que em situações nas quais tais pressupostos não são possíveis, deve-se buscar modelos alternativos (PRITCHARD et al., 2000).

No presente estudo, pelo fato de alguns *loci* terem apresentado desequilíbrio de ligação e outros *loci* não estarem em EHW, foi necessário utilizar um modelo alternativo, no qual estes fatores não levassem a um enviesamento da análise. Como o número de *loci* disponíveis para o andamento do presente estudo foi limitado, a melhor alternativa foi usar a DAPC. Segundo Jombart et al. (2010), por ser um método altamente versátil e estar livre de pressupostos sobre o modelo genético subjacente, desequilíbrio de ligação e equilíbrio de Hardy-Weinberg, a DAPC é o método mais adequado para estimar a estruturação populacional em modelos genéticos populacionais mais complexos.

Devido às vantagens acima citadas e por consumir um tempo computacional muito menor que o STRUCTURE, nos últimos tempos, o uso da DAPC em estudos populacionais de diversas espécies cresceu rapidamente. Entretanto, uma questão ainda não está bem elucidada: quando se deve especificar grupos a priori ou usar o método de clusterização (MILLER et al., 2020)?

Estudos prévios demonstraram a eficiência de métodos que agrupam indivíduos a partir da similaridade genética para detectar o verdadeiro número de populações em espécies com alta dispersão. Segundo Waples e Gaggiotti (2006), “quando não é possível repartir as amostras a priori (ou quando a base para fazê-lo é de validade incerta), é necessário usar uma abordagem que agrupa indivíduos sem referência às informações de amostragem.”

Segundo Miller et al. (2020), muitos estudos não deixam claro como a presença de grupos pré-definidos foi estabelecida e qual a validade desses pressupostos, o que diminui sua confiabilidade e impossibilita a replicação dos resultados. Além disso, já foi demonstrado o encontro de diferentes populações em regiões de forrageamento e reprodução, principalmente se tratando de espécies altamente migratórias (ALVARADO-BREMER et al., 2005a; RIGHI et al., 2020b). Estes fatores, associados à escassez de estudos sobre hábitos migratórios, reprodutivos e populacionais de *Tetrapturus pfluegeri*, levaram à decisão de adotar métodos de *clusterização* e considerar seus resultados mais robustos em comparação com métodos que usam a designação de populações a priori.

Tal decisão também teve como base estudos prévios, como o de Mamoozadeh et al. (2020), no qual foi utilizada análise Bayesiana e DAPC para estimar o número de populações geneticamente distintas da espécie *K. audax* ao longo do oceano Pacífico. Os autores utilizaram mais de 4.000 SNPs e avaliaram um total de 245 amostras, garantindo a robustez estatística do estudo. Com isso, demonstraram que uma espécie capaz de dispersão por longas distâncias, mesmo em um ambiente sem aparentes barreiras geográficas, pode apresentar substancial divisão populacional. Também utilizando DAPC sem definição de grupos a priori, Righi et al.

(2020b), usando o comando *find.cluster*, demonstraram a presença de três grupos genéticos de *X. gladius* no mar Mediterrâneo.

No presente estudo, a diferenciação genética entre os três agrupamentos gerados pela DAPC mostrou valores elevados de F_{ST} (0,183 a 0,200) quando comparados com valores obtidos em estudos prévios (**Apêndice D**). Por exemplo, Williams et al. (2020) obtiveram F_{ST} de -0,0038 a 0,0008 ($p > 0,05$) para *M. nigricans* do oceano Pacífico. Também foi verificado F_{ST} de 0,010 ($p < 0,05$) para *I. indica* dos oceanos Índico e Pacífico (WILLIAMS et al., 2015), assim como F_{ST} de 0,032 ($p < 0,001$) entre populações de *I. platypterus* do Pacífico ocidental e Pacífico oriental (LU et al., 2015). Em contrapartida, Buonaccorsi et al. (2001) obtiveram um valor próximo dos obtidos no presente estudo entre populações de *M. nigricans* dos oceanos Atlântico e Pacífico ($F_{ST} = 0,146$; $p < 0,047$) por meio de marcadores microssatélites. Altos valores de F_{ST} também foram verificados por Righi et al. (2020b) entre populações de *X. gladius* do Atlântico e do Mediterrâneo ($F_{ST} = 0,09$ a $0,13$; $p < 0,05$).

Contudo, é importante destacar que o índice de fixação F_{ST} desenvolvido por Wright (1949), foi descrito com base na heterozigosidade dos marcadores moleculares disponíveis na época, as alozimas, os quais apresentavam baixa diversidade e, dessa forma, as estimativas podiam ser feitas com maior acurácia para descrever subdivisões populacionais.

Atualmente, o desenvolvimento de novas tecnologias permitiu o isolamento de marcadores moleculares altamente diversos, como microssatélites e SNPs, fazendo com que interpretações a respeito de aspectos populacionais sejam equivocados quando baseados em abordagens antiquadas (JOST, 2008). Com isso, Jost (2008) identificou os paradoxos presentes em alguns índices de fixação mais disseminados, como F_{ST} e G_{ST} , e desenvolveu o índice D_{EST} , uma medida matematicamente mais consistente para estruturação populacional, a qual se baseia no efetivo número de alelos ao invés de se basear na heterozigosidade. Para testar a eficácia do método de Jost (2008), Gerlach et al. (2010) compararam duas populações artificiais com divergência genética conhecida e demonstraram que os valores de G_{ST} não foram consistentes com a real diferenciação dessas populações, enquanto o índice D_{EST} estimou com sucesso a divergência esperada.

Levando em conta que os valores de D_{EST} estimados no presente estudo para os agrupamentos Ag1, Ag2 e Ag3 variaram entre 0,092 e 0,176, até o momento, poucos estudos populacionais para peixes-de-bico estimaram a diferenciação genética usando o mesmo índice e aqueles que usaram obtiveram valores baixos. Um deles foi realizado por Bernard et al. (2014a), no qual foi avaliada, pela primeira vez, a estrutura populacional de *T. georgii*. Os

autores detectaram um D_{EST} extremamente baixo, porém, estatisticamente significante (0,021; $p = 0,005$), em concordância com as estimativas de F_{ST} (0,0037; $p = 0,05$).

Muths et al. (2013) também utilizaram o índice D_{EST} para estimar a diferenciação populacional de *X. gladius* dos oceanos Índico, Atlântico e Pacífico. Usando sequências mitocondriais, os autores verificaram significância no Φ_{st} geral (0,006; $p = 0,001$) e altos valores de D_{EST} ($D > 0,25$). Entretanto, nas avaliações feitas com microssatélites, os autores detectaram valores muito baixos de F_{ST} (0,0028 e 0,0026; $p < 0,001$) e D_{EST} ($D < 0,03$) entre os três oceanos, indicando a existência de apenas um estoque e divergindo dos resultados obtidos pelas sequências mitocondriais.

Achados que demonstraram estruturação populacional em espécies de grandes migradores pelágicos vão contra o pressuposto de que tais organismos devem ser panmíticos, pois, não há impedimentos aparentes para uma reprodução totalmente aleatória e homogênea. Porém, alguns estudos vêm encontrando evidências que sugerem filopatria reprodutiva em espécies pelágicas (DOMEIER; SPEARE, 2012; BOERDER et al., 2019) como, por exemplo, tubarões (HUETER et al., 2004; DOMINGUES et al., 2017) e peixes-de-bico (PRINCE et al., 2005; MOURATO et al., 2018).

Segundo Williams et al. (2015), informações geradas por meio de marcadores moleculares, combinadas a dados sobre movimentos migratórios e reprodução, sugerem que a filopatria desempenha um importante papel na manutenção da estruturação populacional identificada em *Istiompax indica* do Indo-Pacífico. Domeier e Speare (2012) também evidenciaram a fidelidade de *I. indica* à Grande Barreira de Corais, situada na costa da Austrália, como local de desova.

Prince et al. (2005), por meio do uso de localizadores, coleta e avaliação de ovários e identificação de larvas, levantaram a hipótese de que os padrões de dispersão de adultos das espécies *T. albidus* e *M. nigricans* podem estar ligados a atividades de reprodução no Caribe. Fêmeas adultas da espécie *T. albidus*, com alto grau de maturação das gônadas, foram detectadas desovando entre abril e junho nas costas nordeste da República Dominicana e Porto Rico, o que demonstra existir sazonalidade de reprodução em áreas específicas (AROCHA; BÁRRIOS, 2009).

Também foi demonstrado que em diferentes locais de reprodução do Atlântico, as estações de desova de *I. platypterus* apresentam uma separação temporal. Enquanto no litoral sudeste brasileiro o pico de desova ocorre entre dezembro e fevereiro, na região costeira do Caribe este evento acontece entre março e abril Mourato et al. (2018). No sudeste da costa brasileira, a alta densidade de adultos no verão coincide com uma mudança drástica da direção

do vento, o que impulsiona fortes ressurgências e leva águas ricas em nutrientes para áreas costeiras, tornando a região uma importante fonte de alimento para as larvas (MOURATO et al., 2014).

Mesmo que a diferenciação genética encontrada no presente trabalho ainda não seja conclusiva, é importante evidenciar que os resultados aqui gerados apresentam alguns indícios de que haja preferência e fidelidade por determinados locais de reprodução em *T. pfluegeri*. Fato este, que pode estar contribuindo para a manutenção de uma suposta estruturação populacional, assim como estudos prévios demonstraram para outros peixes-de-bico.

2.4.4 Conservação e manejo pesqueiro

Devido à escassez de estudos na literatura, muitos aspectos a respeito da biologia do agulhão-verde permanecem desconhecidos. Da mesma forma, seu nível de exploração como recurso pesqueiro, sua taxa de captura incidental pela pesca comercial e o índice de mortalidade devido a tais atividades ainda são obscuros devido à falta de dados precisos sobre estatística de captura.

Visto que: (i) o presente estudo sugere a existência de diferentes estoques da espécie *T. pfluegeri* no oceano Atlântico ocidental sem relação com distribuição geográfica; (ii) a diferenciação genética pode ser devida à fidelidade dos indivíduos a diferentes locais de reprodução e (iii) a manutenção da diversidade genética é essencial para a conservação da espécie (KENCHINGTON et al., 2003; PINSKY; PALUMBI, 2014), é de fundamental importância que medidas de gerenciamento pesqueiro sejam aplicadas.

Segundo Pinsky e Palumbi (2014), conservar a diversidade genética garante a adaptabilidade das populações naturais, manutenção das dinâmicas populacionais e o fluxo de energia dos ecossistemas, além de garantir a disponibilidade dos recursos naturais para fins econômicos. Todavia, formular ações de gerenciamento para a conservação e uso sustentável dos recursos marinhos ainda é um desafio. Ademais, é importante destacar que pesquisas sobre a genética da conservação de peixes deveriam ser consideradas em um contexto mais aplicado para sustentar ações de manejo e preservar recursos genéticos (PINSKY; PALUMBI, 2014).

Segundo o ICES (*The International Council for the Exploration of the Sea*), evidências a respeito da diversidade genética, número de populações e distribuição das espécies são de extrema importância para aprimorar o entendimento sobre a vida marinha e os impactos socioeconômicos por ela sofridos. Com esse intuito, o ICES é um importante conselho

intergovernamental dedicados à produção e emprego do conhecimento científico no o uso sustentável de recursos marinhos. Fazem parte desse órgão 700 institutos e organizações de 20 países membros, onde o Brasil não está incluso.

No Oceano Atlântico, a ELAW (*Environmental Law Alliance Worldwide*) impõe legislações para proibição da pesca em diversas áreas do Caribe (ELAW, 2020), como também é feito pela NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) nos Estados Unidos, a qual, inclusive, possui legislação específica voltada a peixes-de-bico (NOAA FISHERIES, 2020). No Brasil existe uma legislação específica voltada a peixes-de-bico, a qual diz respeito ao defeso das espécies *M. nigricans* e *T. albidus* por tempo indeterminado, imposto pela instrução normativa SEAP/PR n° 12, de 14 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), já que ambas as espécies são classificadas como vulneráveis pela IUCN (IUCN, 2020).

A existência de diferentes grupos genéticos sem padrão geográfico, como demonstrado no presente estudo, dificulta que áreas de conservação específicas para cada espécie sejam delimitadas. Além disso, a inconsistência entre unidades biológicas e unidades de manejo levam à depressão da diversidade genética, afetando principalmente as subpopulações mais vulneráveis e levando ao declínio de estoques pesqueiros (REISS et al., 2009; RIGHI et al., 2020b). Por esse motivo, e à luz dos resultados obtidos no presente estudo, estabelecer áreas específicas de proteção para *T. pfluegeri* não seria a melhor alternativa, ao menos, até que seus aspectos populacionais e hábitos reprodutivos sejam melhor elucidados. Até que isso ocorra, a melhor forma para conservar a espécie seria evitando a pesca comercial, já que se trata de um peixe raramente encontrado e que, quando capturado, pode ser confundido com outras espécies como *T. albidus* e *T. georgii* devido à grande similaridade morfológica (SHIVJI et al., 2006).

Tendo em vista o exposto acima, os resultados gerados nesta tese são inéditos e abrem caminho para o entendimento de aspectos genético-populacionais de *T. pfluegeri*. Entretanto, ainda existe a necessidade de estudos futuros com o intuito de avaliar a rota migratória de indivíduos dessa espécie, por meio de *tags* de localização via satélite; identificar e delimitar locais de reprodução, onde exista aglomeração sazonal com grande número de larvas e ovos e delimitar o período em que ocorrem os evento de reprodução. Somado a isso, estudos que conduzam avaliações genéticas populacionais com amostragens mais amplas, tanto em quantidade de indivíduos quanto em área geográfica serão fundamentais para um melhor entendimento das dinâmicas populacionais de *Tetrapturus pfluegeri*.

2.5 Conclusões

O presente estudo verificou, pela primeira vez, que a espécie *Tetrapturus pfluegeri* do Atlântico ocidental pode ser composta por diferentes subpopulações, sugerindo que a mesma pode apresentar fidelidade por locais de reprodução. Contudo, devido à inexistência de estudos prévios, os resultados aqui gerados precisam ser confirmados por estudos futuros que tenham acesso a um maior número de amostras, amostragens que sejam de localidades mais abrangentes e que utilizem maior número de *loci*, ou até mesmo, outros tipos de marcadores moleculares, como, por exemplo, SNPs. Assim, seria possível garantir maior poder estatístico às análises e reforçar os resultados aqui descritos.

Portanto, este estudo abre caminho para que trabalhos futuros possam avaliar a hipótese de que os agulhão-verde sejam representados por diferentes estoques genéticos e que tal variabilidade seja mantida por uma possível preferência dos indivíduos por locais específicos para a desova. Além disso, há ainda o desafio de definir unidades de manejo apropriadas para a espécie, considerando suas particularidades junto a outros peixes-de-bico que habitam o oceano Atlântico.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A.P.; PAVAN-KUMAR, A.; GIREESH-BABU, P.; JOSHI, C.G.; CHAUDHARI, A.; KRISHNA, G. Population genetics of Indian giant river-catfish, *Sperata seenghala* (Sykes, 1839) using microsatellite markers. **Aquatic Living Resources**, v. 32, p. 4, 2019.
- ALVARADO-BREMER, J.R.; MEJUTO, J.; GREIG, T.W.; ELY, B. Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 197, p. 295–310, 1996.
- ALVARADO-BREMER, J.; BAKER, A.; MEJUTO, J. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 52, p. 1720–1732, 1995.
- ALVARADO-BREMER, J.; MEJUTO, J.; GÓMEZ-MÁRQUEZ, J.; BOÁN, F.; CARPINTERO, P.; RODRÍGUEZ, J.M.; VIÑAS, J.; GREIG, T.W.; ELY, B. Hierarchical analyses of genetic variation of samples from breeding and feeding grounds confirm the genetic partitioning of northwest Atlantic and South Atlantic populations of swordfish (*Xiphias gladius* L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 327, p. 167–182, 2005a.
- ALVARADO-BREMER, J.R.; VIÑAS, J.; MEJUTO, J.; ELY, B.; PLA, C. Comparative Phylogeography of Atlantic Bluefin Tuna and Swordfish: The Combined Effects of Vicariance, Secondary Contact, Introgression, and Population Expansion on the Regional Phylogenies of Two Highly Migratory Pelagic Fishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 169–187, 2005b.
- ARMSTRONG, R. A. When to use the Bonferroni correction. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 34, p. 502–508, 2014.
- AROCHA, F.; BÁRRIOS, A. Sex ratios, spawning seasonality, sexual maturity, and fecundity of white marlin (*Tetrapturus albidus*) from the western central Atlantic. **Fisheries Research**, v. 95, p. 98–111, 2009.
- AROCHA, F.; BÁRRIOS, A.; LEE, W. D. Spatial-temporal distribution, sex ratio at size and gonad index of white marlin (*Tetrapturus albidus*) and longbill spearfish (*Tetrapturus pfluegeri*) in the Western Central Atlantic during the period of 2002–2005. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 60, p. 1746–1756, 2007.
- ARTHOFER, W.; HEUSSLER, C.; KRAPP, P.; SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M. Identifying the Minimum Number of Microsatellite Loci Needed to Assess Population Genetic Structure: A Case Study in Fly Culturing. **Fly**, v. 12, p. 13–22, 2018.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37–48, 1999.
- BERNARD, A.M.; SHIVJI, M.S.; PRINCE, E.D.; HAZIN, F.H.; AROCHA, F.; DOMINGO, A.; FELDHEIM, K.A. Comparative population genetics and evolutionary history of two commonly misidentified billfishes of management and conservation concern. **BMC Genetics**, v. 15, p. 141, 2014a.
- BERNARD, A.M.; HILSDORF, A.W.S.; AMORIM, A.F.; DOMINGUES, R.R.; SHIVJI, M.S. Development and characterization of thirteen microsatellite markers for the longbill spearfish (*Tetrapturus pfluegeri*). **Conservation Genetics Resources**, v. 6, p. 169–171, mar. 2014b.
- BERNARD, A.M.; FELDHEIM, K.A.; HEITHAUS, M.R.; WINTNER, S.P.; WETHERBEE, B.M.; SHIVJI, M.S. Global population genetic dynamics of a highly migratory, apex predator shark. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 5312–5329, 2016.
- BOERDER, K.; SCHILLER, L.; WORM, B. Not all who wander are lost: Improving spatial protection for large pelagic fishes. **Marine Policy**, v. 105, p. 80–90, 2019.
- BRASIL. **Instrução normativa SEAP/PR N° 12, de 14 de julho de 2005**. Secretaria de Pesca e Aquicultura.

- BROWNSTEIN, M. J.; CARPTEN, J. D.; SMITH, J. R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. **Biotechniques**, v. 20, p.1004-1010, 1996.
- BUONACCORSI, V. P.; MCDOWELL, J. R.; GRAVES, J. E. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1179–1196, 2001.
- CARMO, C.B.; FERRETTE, B.L.; CAMARGO, S.M.; ROXO, F.F.; COELHO, R.; GARLA, R.C.; OLIVEIRA, C.; PIERCY, A.N.; BORNATOWSKI, H.; FORESTI, F.; BURGESS, G.H. A new map of the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) genetic population structure in the western Atlantic Ocean: Hypothesis of an equatorial convergence centre. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 29, p. 760-772, 2019.
- CHEN, H.; CHANG, C.H.; SUN, C.L.; SHAO, K.T.; YEH, S.Z.; DiNardo, G. Population Structure of Blue Marlin, *Makaira nigricans*, in the Pacific and Eastern Indian Oceans. **Zoological Studies**, v. 55, 2016.
- CHEN, J.Y.; CHANG, Y.W.; TANG, X.T.; ZHENG, S.Z.; DU, Y.Z. Population genetics of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) and comparison with four *Liriomyza* species in China based on COI, EF-1a and microsatellites loci. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, 2019.
- CHENG, L.; CONNOR, T.R., Aanensen, D.M., Spratt, B.G. and Corander, J. Bayesian Semi-Supervised Classification of Bacterial Samples Using MLST Databases. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 302, 2011.
- COLLETTE, B.B.; CARPENTER, K.E.; POLIDORO, B.A.; JUAN-JORDÁ, M.J.; BOUSTANY, A.; DIE, D.J.; ELFES, C.; FOX, W.; GRAVES, J.; HARRISON, L.R.; MCMANUS, R. High Value and Long Life—Double Jeopardy for Tunas and Billfishes. **Science**, v. 333, p. 291-292, 2011.
- COLLETTE, B.; MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Phylogeny of Recent billfishes (Xiphioidae). **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 455–468, 2006.
- CORANDER, J.; SIREN, J.; ARJAS, E. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. **Computational Statistics**, v. 23, p. 111–129, 2008.
- DÍAZ-JAIMES, P.; URIBE-ALCOCER, M.; ROCHA-OLIVARES, A.; GARCÍA-DE-LEÓN, F.J.; NORTMOON, P.; DURAND, J.D. Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): The influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, p. 1209–1218, 2010.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. MICROSATELLITE ANALYSER: a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 167–169, 2003.
- DOMEIER, M. L.; SPEARE, P. Dispersal of Adult Black Marlin (*Istiompax indica*) from a Great Barrier Reef Spawning Aggregation. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1–9, 2012.
- DOMINGUES, R.R.; HILSDORF, A.W.; SHIVJI, M.M.; HAZIN, F.V.; GADIG, O.B. Effects of the Pleistocene on the mitochondrial population genetic structure and demographic history of the silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the western Atlantic Ocean. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28, p. 213-227, 2017.
- DONALDSON, K. A.; WILSON, R. R. J. Amphipanamic Geminates of Snook (Percoidei: Centropomidae) Provide a Calibration of the Divergence Rate in the Mitochondrial DNA Control Region of Fishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, p. 208–213, 1999.
- ELAW. Caribbean Environmental Law. **Special Fishery conservation Area Regulations 2012**. Disponível em: <https://www.elaw.org/caribbean/laws?order=field_law_date&sort=asc>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (Version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, 2007.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491, 1992.

- FRANKOWSKI, J.; LÜBKE, K.; COKE, M.; WEYL, O.L. Genetic variability and demographic history of *Anguilla mossambica* (Peters, 1852) from continental Africa and Madagascar. **Journal of Fish Biology**, v. 96, p. 1251–1259, 2020.
- FU, Y. X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.
- GARCÍA, L. V. Escaping the Bonferroni iron claw in ecological studies. **Oikos**, v. 105, p. 657–663, 2004.
- GERLACH, G.; JUETERBOCK, A.; KRAEMER, P.; DEPPEMANN, J.; HARMAND, P. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3845–3852, 2010.
- GRANT, W. A. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 415–426, 1998.
- GRAVES, J.; MCDOWELL, J. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 469–482, 2006.
- GRAVES, J.; MCDOWELL, J. **Population structure of istiophorid billfishes**. **Fisheries Research**, v. 166, p. 21–28, 2015.
- GRIJALVA-CHON, J.M.; NUMACHI, K.; SOSA-NISHIZAKI, O.; DE LA ROSA-VÉLEZ, J. Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xiphias gladius* population structure. **Marine Ecology Progress Series**, v. 115, p. 15–19, 1994.
- HARPENDING, H. C. Signature of Ancient Population Growth in a Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. **Human biology**, v. 66, p. 591–600, 1994.
- HAUSER, L.; ADCOCK, G.J.; SMITH, P.J.; RAMÍREZ, J.H.B.; CARVALHO, G.R. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 11742–11747, 2002.
- HAUSER, L.; CARVALHO, G. R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 333–362, 2008.
- HAUSER, L.; WARD, R. Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. In: **Advances in Molecular Ecology**, v. 306, p. 191–224, 1998.
- HUDSON, R. R. A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. **Genetics**, v. 155, p. 2011–2014, 2000.
- HUETER, R.E.; HEUPEL, M.R.; HEIST, E.J.; KEENEY, D.B. Evidence of Philopatry in Sharks and Implications for the Management of Shark Fisheries. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 37, p. 239–247, 2004.
- ICCAT. **Report of the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS)**. ICCAT: Madrid, Espanha. 2018. Disponível em: <https://www.iccat.int/com2018/ENG/PLE_104_ENG.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- ISLAM, M.R.; LI, Z.Z.; GICHIRA, A.W.; ALAM, M.N.; FU, P.C.; HU, G.W.; WANG, Q.F.; CHEN, L.Y. Population Genetics of *Calotropis gigantea*, a Medicinal and Fiber Resource Plant, as Inferred from Microsatellite Marker Variation in two Native Countries. **Biochemical Genetics**, v. 57, p.522-539, 2019.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 28 fev. 2020.
- JENKINS, T. L.; CASTILHO, R.; STEVENS, J. R. Meta-Analysis of Northeast Atlantic Marine Taxa Shows Contrasting Phylogeographic Patterns Following Post-LGM Expansions. **PeerJ**, v. 6, p. e5684, 2018.
- JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1403–1405, 2008.

- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, p. 94, 2010.
- JOST, L. GST and Its Relatives Do Not Measure Differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4015–4026, 2008.
- JUETERBOCK, A.; KRAEMER, P.; GERLACH, G.; DEPPERMANN, J. **DEMEtics: evaluating the genetic differentiation between populations based on Gst and D values. R package, version 0.8-2**, 2011. 13 p.
- KAEUFFER, R.; RÉALE, D.; COLTMAN, D.W.; PONTIER, D. Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. **Heredity**, v. 99, p. 374–380, 2007.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.
- KASAPIDIS, P.; MEJUTO, J.; TSERPES, G.; ANTONIOU, A.; Garcia-Cortes, B.; Peristeraki, P.; Oikonomaki, K.; Kotoulas, G.; Magoulas, A. Genetic structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) stocks in the Atlantic using microsatellite DNA analysis. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 61, p.89-98, 2007a.
- KASAPIDIS, P.; VALEIRAS, X.; GARCIA-CORTES, B.; MEJUTO, J. Genetic and growth profiles of three specimens of swordfish (*Xiphias gladius*) tagged and recaptured in the North Atlantic. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 60, p. 1964–1973, 2007b.
- KENCHINGTON, E.; HEINO, M.; EG NIELSEN, E. Managing marine genetic diversity : time for action? **ICES Journal of Marine Science**, v. 60, p. 1172–1176, 2003.
- KOTOULAS, G.; MAGOULAS, A.; TSIMENIDES, N.; ZOUROS, E. Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 473–482, 1995.
- KOTOULAS, G.; MEJUTO, J.; ANTONIOU, A.; KASAPIDIS, P.; TSERPES, G.; PICCINETTI, C.; PERISTERAKI, P.; GARCIA-CORTES, B., OIKONOMAKI, K., DE LA SERNA, J.M. AND MAGOULAS, A. Global genetic structure of swordfish (*Xiphias gladius*) as revealed by microsatellite DNA markers. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 61, p. 79-88, 2007.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018.
- LU, C.P.; BREMER, J.R.A.; MCKENZIE, J.L.; CHIANG, W.C. Analysis of sailfish (*Istiophorus platypterus*) population structure in the North Pacific Ocean. **Fisheries Research**, v. 166, p. 33–38, 2015.
- LU, C.P.; SMITH, B.L.; HINTON, M.G.; BREMER, J.R.A. Bayesian analyses of Pacific swordfish (*Xiphias gladius* L.) genetic differentiation using multilocus single nucleotide polymorphism (SNP) data. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 482, p. 1–17, 2016.
- MEIRMANS, P.G. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 3223-3231, 2015.
- MALAUSA, T.; GILLES, A.; MEGLÉCZ, E.; BLANQUART, H.; DUTHOY, S.; COSTEDOAT, C.; DUBUT, V.; PECH, N.; CASTAGNONE-SERENO, P. DÉLYE, C.; FEAU, N. High-Throughput Microsatellite Isolation through 454 GS-FLX Titanium Pyrosequencing of Enriched DNA Libraries. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 638–644, 2011.
- MAMOOZADEH, N.R.; MCDOWELL, J.R.; GRAVES, J.E. **Preliminary results from an assessment of genetic population structure for striped marlin (*Tetrapturus audax*) in the Pacific and Indian oceans**. 2017.
- MAMOOZADEH, N.R.; MCDOWELL, J.R.; ROOKER, J.R.; Graves, J.E. Genetic evaluation of population structure in white marlin (*Kajikia albida*): the importance of statistical power. **ICES Journal of Marine Science**, v. 75, p. 892–902, 2018.

MAMOOZADEH, N. R.; GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. Genome-wide SNPs resolve spatiotemporal patterns of connectivity within striped marlin (*Kajikia audax*), a broadly distributed and highly migratory pelagic species. **Evolutionary Applications**, v. 13, p. 677–698, 2019.

MAMOOZADEH, N. R.; GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. Genome-wide SNPs resolve spatiotemporal patterns of connectivity within striped marlin (*Kajikia audax*), a broadly distributed and highly migratory pelagic species. **Evolutionary Applications**, v. 13, p. 677–698, 2020.

MCDOWELL, J.; CARLSSON, J.; GRAVES, J. Genetic Analysis of Blue Marlin (*Makaira nigricans*) Stock Structure in the Atlantic Ocean. **Gulf and Caribbean Research**, v. 19, p. 75–82, 2007.

MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. **Fishery Bulletin**, v. 100, p. 537–544, 2002.

MCDOWELL, J. R.; GRAVES, J. E. Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 65, p. 1307–1320, 2008.

MEGLECZ, E.; COSTEDOAT, C.; DUBUT, V.; GILLES, A.; MALAUSA, T.; PECH, N.; MARTIN, J.F. QDD: A User-Friendly Program to Select Microsatellite Markers and Design Primers from Large Sequencing Projects. **Bioinformatics**, v. 26, p. 403–404, 2010.

MENEZES, M. R.; KUMAR, G.; KUNAL, S. P. Population Genetic Structure of Skipjack Tuna *Katsuwonus Pelamis* from the Indian Coast Using Sequence Analysis of the Mitochondrial DNA D-Loop Region. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 2198–2212, 2012.

MILLER, J. M.; CULLINGHAM, C. I.; PEERY, R. M. The influence of a priori grouping on inference of genetic clusters: simulation study and literature review of the DAPC method. **Heredity**, p. 1–12, 2020.

MORAN, M. D. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. **Oikos**, v. 100, p. 403–405, 2003.

MORGAN, J.A.; VREDENBURG, V.T.; RACHOWICZ, L.J.; KNAPP, R.A.; STICE, M.J.; TUNSTALL, T.; BINGHAM, R.E.; PARKER, J.M.; LONGCORE, J.E.; MORITZ, C.; BRIGGS, C.J. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 13845–13850, 2007.

MORIN, P.A.; ARCHER, F.I.; PEASE, V.L.; HANCOCK-HANSER, B.L.; ROBERTSON, K.M.; HUEBINGER, R.M.; MARTIEN, K.K.; BICKHAM, J.W.; GEORGE, J.C.; POSTMA, L.D.; TAYLOR, B.L. Empirical comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites for population and demographic analyses of bowhead whales. **Endangered Species Research**, v. 19, p. 129–147, 2012.

MOURATO, B.L.; HAZIN, F.; BIGELOW, K.; MUSYL, M.; CARVALHO, F.; HAZIN, H. Spatio-temporal trends of sailfish, *Istiophorus platypterus* catch rates in relation to spawning ground and environmental factors in the equatorial and southwestern Atlantic Ocean. **Fisheries Oceanography**, v. 23, p. 32–44, 2014.

MOURATO, B.L.; NARVAEZ, M.; AMORIM, A.F.D.; HAZIN, H.; CARVALHO, F.; HAZIN, F.; AROCHA, F. Reproductive biology and space–time modelling of spawning for sailfish *Istiophorus platypterus* in the western Atlantic Ocean. **Marine Biology Research**, v. 14(3), p. 269–286, 2018.

MUTHS, D.; LE COULS, S.; EVANO, H.; GREWE, P.; BOURJEA, J. Multi-Genetic Marker Approach and Spatio-Temporal Analysis Suggest There Is a Single Panmictic Population of Swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. **PLOS ONE**, v. 8, p. e63558, 2013.

NAKAMURA, I. **BILLFISHES OF THE WORLD**: an annotated and illustrated catalogue of marine sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 1985.

NIELSEN, E.E.; HEMMER-HANSEN, J.A.K.O.B.; LARSEN, P.F.; BEKKEVOLD, D. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3128–3150, 2009.

NINWICHIAN, P.; KLINBUNGA, S. Population genetics of sandfish (*Holothuria scabra*) in the Andaman Sea, Thailand inferred from 12S rDNA and microsatellite polymorphism. **Regional Studies in Marine Science**, v. 35, p. 101189, 2020.

NOAA FISHERIES. **About Us: Our Mission**. Disponível em: <<https://www.fisheries.noaa.gov/about-us>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

OKAZAKI, T.; STEVENSON, D.E.; KAI, Y.; UEDA, Y.; HAMATSU, T.; YAMASHITA, Y. Genetic population structure and demographic history of a pelagic lump sucker, *Aptocyclus ventricosus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 103, p. 283-289, 2020.

PALUMBI, S. R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, p. 547-572, 1994.

PÉREZ-PORTELA, R.; VILLAMOR, A.; ALMADA, V. Phylogeography of the sea star *Marthasterias glacialis* (Asteroidea, Echinodermata): deep genetic divergence between mitochondrial lineages in the north-western mediterranean. **Marine Biology**, v. 157, p. 2015-2028, 2010.

PINSKY, M. L.; PALUMBI, S. R. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 29-39, 2014.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping Errors: Causes, Consequences and Solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 847-859, 2005.

PONS, M.; AROCHA, F.; DOMINGO, A.; DIE, D.J.; BRAZEIRO, A.; HAZIN, F. Estimation of age and growth of the longbill spearfish (*Tetrapturus pfluegeri*) in the western atlantic ocean. **Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT**, v. 71, p. 2262-2276, 2015.

PRINCE, E.D.; COWEN, R.K.; ORBESEN, E.S.; LUTHY, S.A.; LLOPIZ, J.K.; RICHARDSON, D.E.; SERAFY, J.E. Movements and spawning of white marlin (*Tetrapturus albidus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*) off Punta Cana, Dominican Republic. **Fishery Bulletin- National Oceanic and Atmospheric Administration**, v. 103, p. 659-669, 2005.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PURCELL, C. M.; EDMANDS, S. Resolving the genetic structure of striped marlin, *Kajikia audax*, in the Pacific Ocean through spatial and temporal sampling of adult and immature fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 68, p. 1861-1875, 2011.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. 2013.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical Properties of New Neutrality Tests against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 2092-2100, 2002.

REISS, H.; HOARAU, G.; DICKEY-COLLAS, M.; WOLFF, W.J. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. **Fish and Fisheries**, v. 10, p. 361-395, 2009.

RIGHI, T.; SPLENDIANI, A.; FIORAVANTI, T.; CASONI, E.; GIOACCHINI, G.; CARNEVALI, O.; CAPUTO BARUCCHI, V. Loss of Mitochondrial Genetic Diversity in Overexploited Mediterranean Swordfish (*Xiphias gladius*, 1759) **Population. Diversity**, v. 12, p. 170, 2020a.

RIGHI, T.; SPLENDIANI, A.; FIORAVANTI, T.; PETETTA, A.; CANDELMA, M.; GIOACCHINI, G.; GILLESPIE, K.; HANKE, A.; CARNEVALI, O.; BARUCCHI, V.C. Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* Linnaeus, 1758) population structure revealed by microsatellite DNA: genetic diversity masked by population mixing in shared areas. **PeerJ**, v. 8, p. e9518, 2020b.

ROGERS, A.; HARPENDING, H. Rogers AR, Harpending HC. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 552-569, 1992.

- ROGERS, A. R. Genetic evidence for a pleistocene population explosion. *Evolution*, v. 49, p. 608–615, 1995.
- ROSEL, P. E.; BLOCK, B. A. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. **Marine Biology**, v. 125, p. 11–22, 1996.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S.E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299–3302, 2017.
- RUBIO-CASTRO, G.; QUINONEZ, C.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfish *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific. **Fisheries Science**, v. 82(2), p.241-249, 2016.
- SACCO, F.; MARRONE, F.; BRUTTO, S.; BESBES, A.; NFATI, A.; GATT, M.; FIORENTINO, F.; ARCULEO, M. Molecular diversity of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) shows the merging of endemic and widespread haplotypes in the mediterranean sea. **Congresso della Società Italiana di Biologia Marina**, v. 10, p. 12, 2015.
- SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 152, p. 1079–1089, 1999.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233, 2000.
- SHIVJI, M.S.; MAGNUSSEN, J.E.; BEERKIRCHER, L.R.; HINTEREGGER, G.; LEE, D.W.; SERAFY, J.E.; PRINCE, E.D. Validity, identification, and distribution of the roundscale spearfish, *Tetrapturus georgii* (Teleostei: Istiophoridae): Morphological and molecular evidence. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 483–491, 2006.
- SINGER-SAM, J. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. **Amplifications**, v. 3, p. 11, 1989.
- SMITH, B.L.; LU, C.P.; GARCÍA-CORTÉS, B.; VIÑAS, J.; YEH, S.Y.; ALVARADO BREMER, J.R. Multilocus Bayesian Estimates of Intra-Oceanic Genetic Differentiation, Connectivity, and Admixture in Atlantic Swordfish (*Xiphias gladius* L.). **PLOS ONE**, v. 10, p. 1–30, 2015.
- SORENSEN, L.; MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Assignment test method using hypervariable markers for blue marlin (*Makaira nigricans*) stock identification. **Conservation Genetics Resources**, v. 5, p. 293–297, 2013.
- SRITHAWONG, S.; MUISUK, K.; SRIKUMMOOL, M.; MAHASIRIKUL, N.; TRIYARACH, S.; SRIPRASERT, K.; KUTANAN, W. Genetic structure of the ethnic Lao groups from mainland Southeast Asia revealed by forensic microsatellites. **Annals of Human Genetics**, v. 84, p. 357-369, 2020.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3-New Capabilities and Interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. e115, 2012.
- WANG, J. coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 141–145, 2011.
- WANG, Y.; ZHOU, T.; LI, D.; ZHANG, X.; YU, W.; CAI, J.; WANG, G.; GUO, Q.; YANG, X.; CAO, F. The genetic diversity and population structure of *Sophora alopecuroides* (Fabaceae) as determined by microsatellite markers developed from transcriptome. **PLOS ONE**, v. 14, p. 1–17, 2020.
- WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 438–450, 1998.
- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What Is a Population? An Empirical Evaluation of Some Genetic Methods for Identifying the Number of Gene Pools and Their Degree of Connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1419–1439, 2006.

WEIR, B.; COCKERHAM, C. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* 38: 1358-1370. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

WILLIAMS, S.M.; PEPPERELL, J.G.; CORLEY, S.W.; OVENDEN, J.R. Isolation and characterisation of 18 polymorphic microsatellite loci for black marlin (*Istiompax indica*) and their utility for Pacific billfish species. **Fisheries Research**, v. 166, p. 29–32, 2015.

WILLIAMS, S. M.; WYATT, J.; OVENDEN, J. R. Investigating the genetic stock structure of blue marlin (*Makaira nigricans*) in the Pacific Ocean. **Fisheries Research**, v. 228, p. 105565, 2020.

WRIGHT, S. The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, p. 323–354, 1949.

XU, D.; LOU, B.; SHI, H.; GENG, Z.; LI, S.; ZHANG, Y. Genetic diversity and population structure of *Nibea albiflora* in the China Sea revealed by mitochondrial COI sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 158–165, 2012.

YE, Z.; WANG, Z. Does Bonferroni correction “rescue” the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium? *Forensic Science International: Genetics*, v. 46, p. 102254, 2020.

CAPÍTULO 3

GENÉTICA FORENSE APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES-DE-BICO DO ATLÂNTICO COMERCIALIZADOS NO SUDESTE BRASILEIRO

CAPÍTULO 3 Genética forense aplicada à identificação de peixes-de-bico do Atlântico comercializados no sudeste brasileiro

RESUMO

Devido à alta similaridade entre algumas espécies de peixes-de-bico, a ICCAI (Comissão Internacional para a Conservação de Atuns do Atlântico) recomenda o uso de ferramentas moleculares para identificação espécie-específica para este grupo de grande importância ecológica e comercial. Assim, o presente estudo utilizou o método de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase associada ao polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição), com as enzimas TaqI e HaeIII, na região COI (citocromo c oxidase I) do DNA mitocondrial de peixes-de-bico para identificar espécies comercializadas na maior central de distribuição de produtos agrícolas da América latina, a CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). No total, foram coletadas 432 amostras e três espécies foram identificadas: *Xiphias gladius* (n = 315), *I. platypterus* (n = 90) e *T. georgii* (n = 1). As 22 amostras restantes mostraram padrão de bandas desconhecido para a enzima *HaeIII* e, por isso, foram sequenciadas. Os indivíduos sequenciados foram identificados como *X. gladius*, apresentando duas mutações pontuais no COI, o que provocou o surgimento de mais dois sítios de reconhecimento para a *HaeIII*. As espécies *T. pfluegeri*, *K. albida* e *M. nigricans* não foram verificadas em comercialização na CEAGESP. Entretanto, dados estatísticos e estudos científicos vêm identificando captura destas três espécies frente à costa brasileira, incluindo *K. albida* e *M. nigricans*, duas espécies sobreexploradas e vulneráveis. Com isso, é importante destacar a importância do monitoramento contínuo em embarcações de pesca e no desembarque usando as ferramentas moleculares aqui apresentadas e de acordo com as recomendações da ICCAT. Portanto, o presente estudo fornece evidências irrefutáveis que suportam a ideia de que métodos moleculares são altamente eficientes para superar a dificuldade de identificação dos peixes-de-bico e a captura ilegal de espécies sobreexploradas no Oceano Atlântico, servindo de suporte para a implementação de novos métodos nos levantamentos estatísticos das atividades pesqueiras.

Palavras-chave: genética forense, manejo pesqueiro, marlin, Istiophoridae; PCR-RFLP

ABSTRACT

Due to the natural morphological similarity between some Atlantic billfish species, the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT) has recommended using diagnostic molecular tools to identify billfish at the species-level to manage this imperiled fish group properly. Therefore, in this study, COI (cytochrome c oxidase I) polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were used, with TaqI and HaeIII restriction enzymes, for swordfish and billfish species-specific identification in the General Warehouse Company of São Paulo (CEAGESP), the largest wholesale food center throughout the Latin America. A total of 432 individual tissue samples were collected, and from these, three species were detected: *Xiphias gladius* (n = 315), *I. platypterus* (n = 90), and *T. georgii* (n = 1). The remaining samples presented an unknown pattern after restriction with HaeIII, and these were then sequenced and identified as belonging to *X. gladius* (n = 22) with two single nucleotide mutation sites, which generate two additional restriction sites for HaeIII. *Tetrapturus pfluegeri*, *K. albida*, and *M. nigricans* were not detected being trading in the CEAGESP by the present study. However, fisheries and scientific data have registered the capture of these three species in Brazilian waters, including *K. albida* and *M. nigricans*, which are considered overfished and vulnerable. Thereby, once Brazil is an ICCAT signatory country, we advocate for continuous onboard and landings monitoring, using the presented molecular identification tools following ICCAT recommendations. Thus, the present work provides substantial evidence that DNA-based methods are powerfully efficient in overcoming the effects of billfish misidentification on the Atlantic population assessment, working as a base for implementing new practices in the statistical surveys of fishing activities.

Key-words: forensic genetics, fisheries management, marlin, Istiophoridae, PCR-RFLP.

3.1 Introdução

Os peixes-de-bico do Atlântico são representados pelo espadarte (*Xiphias gladius*) e cinco espécies de agulhões: *Kajikia albida* (agulhão-branco), *Makaira nigricans* (agulhão-azul), *Tetrapturus georgii* (agulhão-polegar), *Tetrapturus pfluegeri* (agulhã-verde) e *Istiophorus platypterus* (agulhão-vela). Os animais deste grupo são grandes predadores habitantes da zona pelágica e possuem fundamental importância ecológica. Algumas destas espécies têm alto valor econômico, onde o espadarte é um dos principais alvos da pesca atuneira com espinhel. Já os agulhões, constituem uma comum captura acessória na pesca comercial (AROCHA; et al., 2002; ELLIS, 2013; PONS et al., 2017).

Segundo Myers e Worm (2003), a pesca industrial foi responsável por reduzir 80% da biomassa de peixes em 15 anos de exploração, onde a biomassa atual dos grandes peixes predadores marinhos é de apenas 10%, comparada aos níveis globais pré-industriais. Adicionalmente, valores comerciais elevados têm aumentados o risco de colapso dos estoques e aumentado a exploração dos atuns e dos peixes-de-bico muito além do nível de biomassa estabelecido para um rendimento máximo sustentável (COLLETTE et al., 2011).

A literatura a respeito do comércio global dos peixes-de-bico é escassa, com alguns documentos provenientes dos Estados Unidos e Havaí. No ano de 2006, o Havaí capturou 2.550 mt (toneladas métricas) de peixes-de-bico, a um valor de 2,7 milhões de dólares. No mesmo ano, os EUA importaram 1.335 mt ao valor de 5,2 milhões de dólares (GENTNER, 2007). Além disso, os peixes-de-bico movimentam um importante setor econômico nesses países, a economia recreacional, que atrai turistas para destinos de pesca esportiva e ecoturismo. No Panamá, foi estimado que a pesca esportiva de peixes-de-bico gerou um total de 170,4 milhões de dólares em vendas e deu suporte a 9.503 empregos em 2011 (GENTNER, 2016)

Devido ao alto valor de sua carne, o espadarte e algumas espécies de agulhões estão entre as espécies mais exploradas pelas indústrias pesqueiras multinacionais, o que torna sua regulamentação, fiscalização e gestão seriamente difíceis e ineficazes (COLLETTE et al., 2011). Ademais, a identificação adequada das espécies é essencial para avaliações estatísticas precisas, algo problemático no oceano Atlântico devido à alta similaridade morfológica entre três espécies (*Kajikia albida*, *Tetrapturus georgii* e *Tetrapturus pfluegeri*) (BERNARD et al., 2013) e ao processamento dado aos peixes no momento do embarque, implicando na remoção da cabeça, vísceras e nadadeiras (DOMINGUES et al., 2015). Para que avaliações apropriadas dos estoques sejam executadas se faz necessária a identificação precisa das espécies capturadas, o que pode ser atingido por meio de dados moleculares. Neste contexto, a identificação espécie-

específica permite monitorar a captação excedente de quotas, garante a precisão de dados diários de bordo e evita a depressão dos estoques pesqueiros (WARD, 2000).

Os últimos relatórios publicados pela ICCAT (Comissão Internacional para a Conservação de Atuns do Atlântico) mostram que o agulhão-azul e o agulhão-branco estão sofrendo sobrepesca desde os anos 1990. Entretanto, os dados estatísticos históricos referentes ao agulhão-branco incluem o agulhão polegar, uma espécie recentemente validada (SHIVJI et al., 2006), tornado as estimativas não confiáveis devido à mistura de dados (ICCAT, 2018).

Levando em consideração a complexidade e as limitações apresentadas pela identificação morfológica de diversas espécies, técnicas moleculares diagnósticas têm sido amplamente aplicadas na identificação de espécies em diferentes ambientes e para diferentes propósitos. Uma das abordagens mais populares é a do DNA *barcoding* (HEBERT et al., 2003), que consiste em sequenciar regiões padronizadas do gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase I) de cada indivíduo e comparar com sequências de referência, depositadas no banco de dados do DNA *barcode* (HEBERT et al., 2003; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007)(HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Devido à sua eficiência, sequências do DNA *barcode* têm sido usadas como uma alternativa para identificações morfológicas em diversas espécies de peixes (BARBUTO et al., 2010; HOLMES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2018; SARMIENTO-CAMACHO; VALDEZ-MORENO, 2018). Entretanto, o sequenciamento de DNA pode ser custoso e demorado, principalmente onde recursos financeiros são escassos. Como consequência, abordagens baseadas em PCR-RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição após amplificação por reação em cadeia da polimerase) e PCR-multiplex têm sido sugeridas como uma alternativa, pois são técnicas mais simples que consomem menos tempo e recursos (CHAPMAN et al., 2003; PINHAL et al., 2012).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas algumas abordagens, baseadas na técnica de PCR, para identificar peixes-de-bico em várias regiões do mundo (CHOW, 1994; HSIEH et al., 2005; HYDE et al., 2005; INNES et al., 1998; MCDOWELL; GRAVES, 2002; SIMMS et al., 2010). Por exemplo, Hyde et al. (2005) desenvolveram um protocolo de PCR multiplex para diferenciar espécies de peixes-de-bico presentes nas águas do Hawaii, comprovando, pela primeira vez, a existência de ovos de agulhão-azul na região. Domingues et al. (2015) desenvolveram um método, utilizando PCR-RFLP da região COI, capaz de diferenciar as seis espécies de peixes-de-bico existentes no Atlântico. Sendo esta, uma ferramenta que pode ter utilidade no monitoramento e gestão de captura.

Tendo em vista que os agulhões e o espadarte são econômica e ecologicamente importantes em todo o mundo e seus estoques estão em declínio devido à sobrepesca, é imperativo que a pesca e o comércio dos peixes-de-bico sejam gerenciados apropriadamente visando garantir sua conservação a longo prazo, o que torna necessário o uso de métodos efetivos na discriminação das espécies capturadas pela pesca comercial. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio de PCR-RFLP da região COI, a composição de espécies de peixes-de-bico comercializadas na maior central de abastecimento e distribuição de produtos agrícolas da América Latina, a CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo).

3.2 Métodos

Amostras de tecido muscular de exemplares de peixe-de-bico expostos no setor de pescado da CEAGESP foram coletadas mensalmente durante o período de junho de 2017 a março de 2019, com devida autorização (**Anexo A**). Todas as amostras foram armazenadas em microtubos contendo etanol 95% e acondicionadas a -20°C no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, São Paulo.

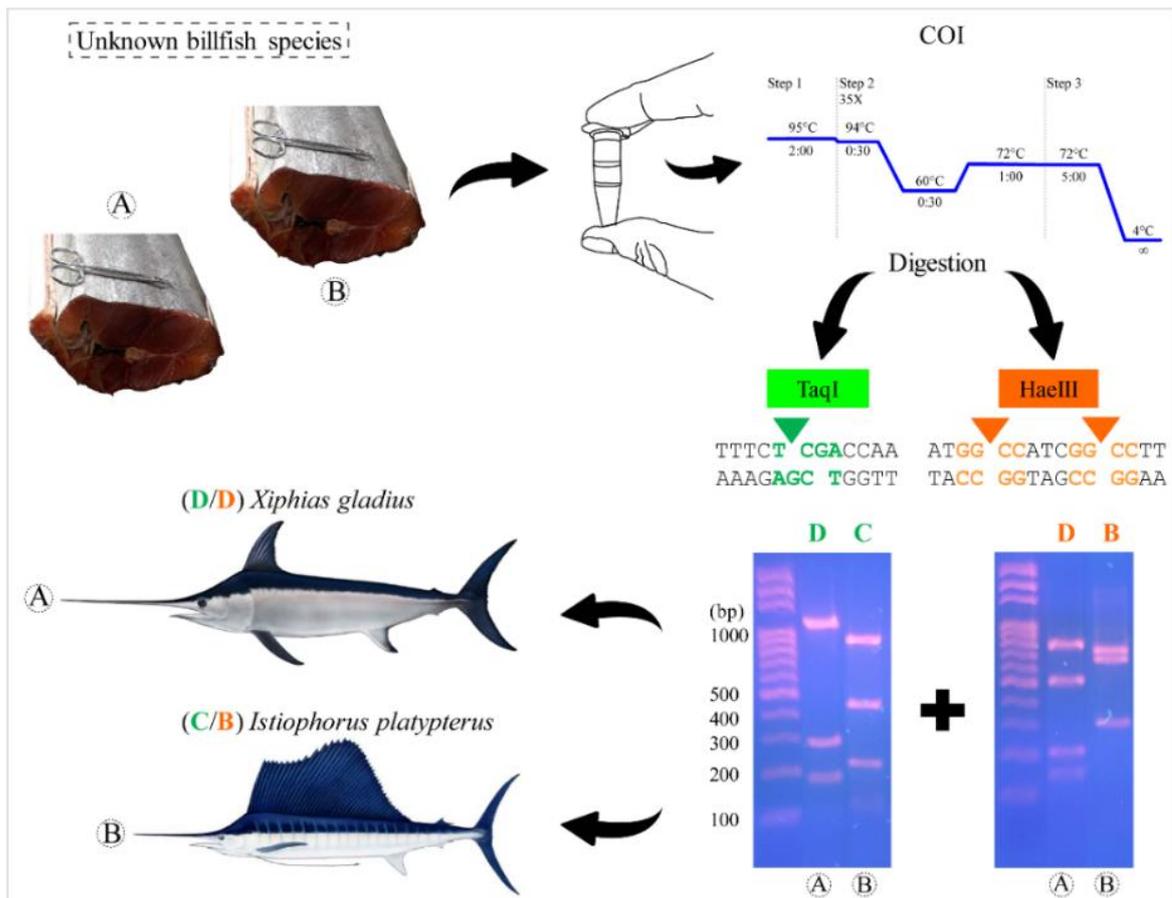
O DNA genômico das amostras foi isolado a partir de um pequeno fragmento de tecido, utilizando Chelex® 100 (Sigma Aldrich). As amostras foram previamente reidratadas com 500 μl de solução PBS 1X por 15 min. A solução PBS foi removida e foi acrescentado às amostras 200 μl de suspensão de Chelex® 100 a 5%, seguido de incubação a 65°C por 15 min. Foi realizada uma segunda incubação de 15 min a 95°C seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 2 min para carregar as partículas da resina para o fundo do tubo e, por fim, 1.300 μl do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos.

Na etapa de identificação das espécies, foi realizada uma reação de PCR para cada amostra visando amplificar a região COI do DNA mitocondrial. Para isso, os primers universais FCOI_BSfish (5'TCTCGACCAATCACAAAGAC3') e RCOI_BSfish (5'TGTRGCGGTKAGTTCTACTG3') (DOMINGUES et al., 2015) foram utilizados. Cada reação de PCR foi executada acrescentando 2 μl da solução de DNA genômico em um mix contendo: tampão da Taq 1X; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,5 mM de dNTPs; 0,7 μM de cada primer e 4 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As reações de PCR foram executadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) com desnaturação inicial de 95°C por 2 min; seguida de 35 ciclos contendo desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram digeridos com duas enzimas de restrição, *TaqI* e *HaeIII* (Promega, Wisconsin, USA), separadamente, em reações preparadas com 1X de tampão específico da enzima; 0,1 mg/ml de BSA; 0,5 U da enzima de restrição; 5 μl do produto de PCR e H_2O para volume final de 20 μl . As reações de digestão foram executadas a 37°C por 2 horas e 80°C por 15 min. Os produtos da digestão foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular 100pb plus (Sinapse). As amostras foram coradas usando Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Uniscience) e os géis foram revelados em fotodocumentador Image Quant 300 (GE Healthcare Life Sciences).

Cada amostra teve seu indivíduo correspondente identificado em nível específico, de acordo com o padrão de bandas apresentado no gel de agarose e por meio de sua comparação com os padrões descritos por Domingues et al. (2015) (**Figura 3.1**). Devido à observação de um novo padrão de bandas na digestão com *HaeIII*, duas amostras foram enviadas para o Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP), onde as mesmas foram sequenciadas, utilizando os *primers* FCOI_BSfish e RCOI_BSfish, em um sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA).

Figura 3.1: Etapas da identificação molecular de peixes-de-bico coletados na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). Fonte: Jaser, 2020.



3.3 Resultados

Um total de 432 amostras de peixes-de-bico foram coletadas na CEAGESP (**Figura 3.2**), das quais, 315 (72,9%) foram identificadas como *X. gladius*, com o padrão de bandas D/D (*TaqI/HaeIII*), 90 (20,8%) foram identificadas como *I. platypterus* (C/B), uma amostra (0,23%) foi identificada como *T. georgii* (A/C) (**Figura 3.3**) e 4 amostras (0,93%) não puderam ser genotipadas pois apresentaram alta taxa de degradação do DNA, o que impediu sua amplificação.

Em 22 amostras, a enzima *HaeIII* mostrou um padrão de bandas desconhecido. Por isso, duas destas amostras foram sequenciadas e tiveram suas sequências comparadas com o banco de dados GenBank, onde foi verificada similaridade de 100% com a região COI de *Xiphias gladius*. Por meio do alinhamento da sequência em análise com a sequência do BenGank (BenGank: AP006036) foi possível identificar duas mutações de nucleotídeo único, nas posições 5.771 e 6.413 (**Figura 3.4**). O novo padrão de bandas gerado pela enzima *HaeIII* foi, então, identificado como padrão E. Desta forma, 22 amostras (5%) foram identificadas como *X. gladius*, com o padrão D/E, totalizando 337 (78%) amostras dessa espécie (**Tabela 3.1**).

Maior parte das amostras identificadas como *I. platypterus* foram coletadas nos meses de novembro e dezembro (n = 46 e 82, respectivamente), já *X. gladius* foi mais numerosa nos meses de junho (n = 70) e julho (n = 82). O único indivíduo referente a *T. georgii* foi verificado na amostragem de janeiro.

Figura 3.2: Coletas de amostras de peixes-de-bico sendo executadas na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), São Paulo, Brasil. Setor de comercialização de pescado e produtos de aquicultura.



Figura 3.3: Gel de agarose mostrando os produtos da amplificação da região citocromo c oxidase I (COI) de peixes-de-bico clivados com as enzimas *TaqI* (acima) e *HaeIII* (abaixo). Cada número, de 2 a 15, corresponde a um indivíduo. 1: marcados de peso molecular. 2 a 11: padrão de bandas de *X. gladius* (D/D). 12 e 13: padrão de bandas para *Istiophorus platypterus* (C/B). 14: falha na identificação. 15: *X. gladius* com o padrão (D/E).

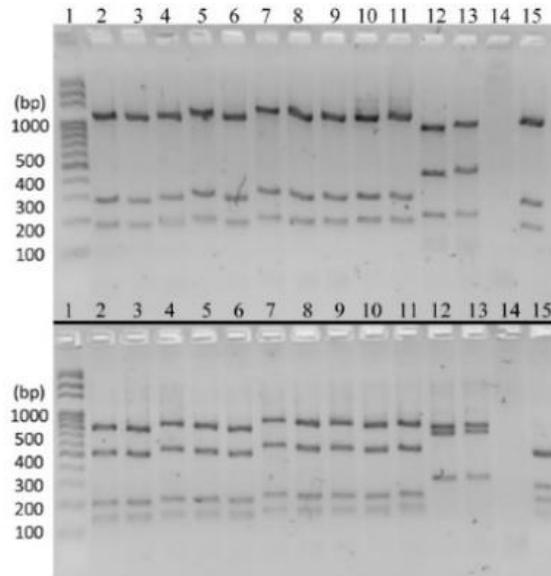


Figura 3.4: Sítios de reconhecimento da enzima de restrição *HaeIII*. Destacados em azul estão os sítios de restrição responsáveis por gerar o padrão de bandas ‘D’ e em vermelho estão destacados os novos sítios de restrição da *HaeIII*, gerados por mutações presentes na região COI do genoma mitocondrial de *Xiphias gladius* e responsáveis por gerar o padrão de bandas ‘E’. Sequência de referência: GenBank-AP006036.

Padrão D

```

ATTCACTAATTCCCCTAATGATTGGAGCCCCCGATATAGCATTCCCT...TTCT
TCGGCCACCCCGAAGTATATATTCTGATCCTCCCCGGCTTCGGAATAATTTCCC
ATATTGTTGCCTACTACTCAGCCAAAAAGAGCCTTTCGGCTATATGGGTATGG
TATGGGCTATGATGGCCATCAGCCTTCTAGGCTTCATTGTATGAGCTCACCACA
TGTTTACAGTCGGAATGGATGTAGACACCCGAGCCTACTTTACATCCGCCACAA
TAATTATCGCTATCCCGACTGGTGTAAGTCTTCAGCTGCTCGCAACTCTGC
ACGGAGGTGCTATTAATGGGAAACCCCTCTACTATGGCCCTTGGCTTTATTT
TCCTCTTACGGTAGGTGGACTAACTGGAATTGTCCTGGCTA
  
```

Padrão E

```

ATTCACTAATTCCCCTAATGATTGGGGCCCCCGATATAGCATTCCCT...TTCT
TCGGCCACCCCGAAGTATATATTCTGATCCTCCCCGGCTTCGGAATAATTTCCC
ATATTGTTGCCTACTACTCAGCCAAAAAGAGCCTTTCGGCTATATGGGTATGG
TATGGGCTATGATGGCCATCAGCCTTCTAGGCTTAATGTATGAGCTCACCACATG
TTTACAGTCGGAATGGATGTAGACACCCGGGCCACTTTACATCCGCCACAATA
ATTATCGCTATCCCGACTGGTGTAAGTCTTCAGCTGCTCGCAACTCTGCAC
GGAGGTGCTATTAATGGGAAACCCCTCTACTATGGCCCTTGGCTTTATTTTC
CTCTTACGGTAGGTGGACTAACTGGAATTGTCCTGGCTA
  
```

Tabela 3.1: Relação de amostras coletadas na CEAGESP e identificadas a nível de espécie por meio de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição TaqI e HaeIII.

Espécie	Padrão (TaqI/HaeIII)	Número de Indivíduos	Porcentagem (%)
<i>Xiphias gladius</i>	D/D	315	72,92
<i>Xiphias gladius</i>	D/E	22	5,09
<i>Istiophorus platypterus</i>	C/B	90	20,83
<i>Tetrapturus georgii</i>	A/C	1	0,23
Não identificadas	-	4	0,92
Total		432	100

3.4 Discussão

O presente estudo mostrou a aplicabilidade, eficiência e acurácia de um método que permite menos gasto de tempo e recursos na identificação de espécies-de-peixes de bico. Mesmo havendo muitos estudos usando abordagens genéticas para identificar espécies (LINACRE; TOBE, 2011), poucos são aqueles que se dedicaram ao monitoramento de longo prazo em locais de comercialização de produtos pesqueiros.

De fato, a falta de identificação apropriada é um dos maiores desafios na gestão da pesca. Com isso, no presente estudo, foram realizadas amostragens e identificação espécie-específica, de longo prazo, de um grupo de grandes predadores marinhos sobrexplorados que continuam sendo pescados e comercializados no Brasil. Além disso, devido à grande similaridade morfológica entre algumas espécies, estas são agrupados sob o mesmo nome comum de ‘agulhões’ quando desembarcados e comercializados. Como consequência, as estatísticas brasileiras de pesca não são baseadas em identificação adequada de espécies, gerando um impacto negativo na avaliação e conservação dos estoques pesqueiros (FREIRE et al., 2015).

Durante amostragens mensais, que duraram 22 meses, o presente estudo identificou três espécies de peixes-de-bico em comercialização na CEAGESP (*X. gladius*, *I. platypterus* e *T. georgii*), dentre as quais *X. gladius* foi, de longe, a espécie mais abundante (78%). Além disso, foi observado que o agulhão-vela foi mais abundante de novembro a janeiro, corroborando estudos prévios que reportaram maior captura dessa espécie entre os meses de dezembro e janeiro devido a migrações de indivíduos adultos provenientes do Atlântico Centro-Oeste tropical em direção à costa sudoeste do Brasil em período de desova (AMORIM; ARFELLI, 2001; MOURATO et al., 2016).

Diferente do agulhão-vela, o espadarte esteve presente ao longo do ano todo, mas teve maior ocorrência nos meses de junho e julho, como relatado previamente por Quaggio et al. (2011). Segundo os autores, na costa Brasileira ocorre aumento do número de espadartes durante o período de inverno, o que pode estar relacionado com o aumento de nutrientes nas zonas eutróficas devido aos movimentos das correntes marítimas.

Sabe-se, hoje, que existem cinco espécies de peixes-de-bico no Oceano Atlântico, entretanto, *M. nigricans*, *K. albida* e *T. pfluegeri* não foram verificadas no presente estudo, o que não significa que estas espécies não estejam sendo capturadas pela pesca comercial.

Em um estudo realizado por Rodrigues Júnior et al. (2020), também na CEAGESP, os autores realizaram três amostragens entre os anos de 2015 e 2016 e verificaram que as amostras coletadas pertenciam às espécies *X. gladius*, *I. platypterus* e *K. albida*, dentre as quais *K. albida*

correspondeu a 9,72% das amostras, o equivalente a sete indivíduos, declarados como *I. platypterus* no momento das coletas. A identificação do agulhão-branco em apenas três amostragens pode indicar que, num passado próximo, a comercialização desta espécie na CEAGESP era relativamente comum, apesar de sua proibição estabelecida no ano de 2005 pela instrução normativa SEAP/PR n° 12, de 14 de julho de 2005 (BRASIL, 2005).

Dados ainda não publicados, gerados por nosso grupo de pesquisa, obtidos a partir de análises por PCR multiplex de amostras de agulhões coletadas no momento do desembarque no porto de Santos, entre 2011 e 2013, mostraram que as cinco espécies de agulhões presentes no Atlântico foram desembarcadas naquele período, onde *K. albida* correspondeu a 72% dos agulhões coletados e *M. nigricans* correspondeu a 1%. A partir dessas informações duas hipóteses podem ser levantadas, (i) os agulhões com proibição de pesca são comercializados em mercados locais ou consumidos pelos próprios pescadores, não sendo, portanto, enviados para as centrais de abastecimento visando evitar possíveis fiscalizações ou (ii) a distância temporal entre o presente estudo e os dois estudos realizados em anos anteriores pode indicar que a população de agulhões-brancos frente à costa brasileira tenha sofrido uma drástica queda ao longo dos anos, fazendo com que sua captura tenha se tornado um evento raro nos tempos atuais.

A estatística da pesca, publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), reportou captura de 142 a 147 toneladas do agulhão-branco pela pesca industrial brasileira entre os anos de 2004 a 2007 (IBAMA, 2006). Durante o período de 2008 a 2011 essa captura foi de 35 a 59,7 toneladas por ano, demonstrando uma tendência de queda no volume de pesca dessa espécie (MPA, 2011).

A partir do ano de 2012, não houveram publicações sobre a estatística pesqueira geral do Brasil, entretanto, dados publicados pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) mostram que *K. albida* tem sido capturada no Brasil desde 1961, e que tem ocorrido um significativo declínio em sua população no Atlântico Norte e Sul desde meados dos anos 1990, com números que atingiram 300 toneladas no fim dos anos 2000 e uma queda abrupta para 47 toneladas em 2017 (FAO, 2018).

Apesar de não ter sido reportada por Rodrigues Júnior et al. (2020) e pelo presente estudo, estudos prévios demonstraram que os desembarques da espécie *M. nigricans* atingiram em torno de 3.000 e 4.000 toneladas durante os anos 2000, com uma notável e constante queda nos desembarques do Atlântico Ocidental desde dos anos 1990. Nos desembarques do Atlântico Norte, os números tiveram queda de, pelo menos, 50% após o ano 2000 (EHRHARDT; FITCHETT, 2016). Tais dados refletem o fato de que os peixes-de-bico do Oceano Atlântico

vêm sofrendo intensa exploração pela pesca atuneira por mais de seis décadas. Ademais, todas as espécies de peixes-de-bico, inclusive o espadarte, são consideradas sobreexploradas em, ao menos, uma área do Oceano Atlântico (EHRHARDT; FITCHETT, 2016; ICCAT, 2018).

3.5 Conclusões

A gestão dos estoques pesqueiros depende de estimativas apropriadas de biomassa e de estabelecimento adequado de quotas de captura para cada espécie em particular, por isso, a identificação precisa das espécies é um pré-requisito (WARD, 2000). Entretanto, identificações incorretas ou agrupamento de espécies nas estatísticas pesqueiras são problemas comuns devido, principalmente, à alta similaridade morfológica entre determinadas espécies, especialmente quando algumas estruturas como cabeça e nadadeiras são removidas dos animais no momento da captura.

Dessa forma, sugere-se que as organizações brasileiras competentes devem implementar estratégias de inspeção, utilizando métodos moleculares de identificação, voltadas aos peixes-de-bico desembarcados nos portos brasileiros, principalmente às espécies que se encontram em situação de vulnerabilidade ou com insuficiência de dados. Também é importante destacar que a inclusão de observadores científicos a bordo de embarcações pesqueiras é fundamental, pois muitas vezes, espécies com captura proibida são embarcadas já sem vida e jogadas de volta ao mar ou consumidas a bordo, sem que algum registro de sua captura seja feito (AROCHA; MARCANO, 2001).

De acordo com recomendações da ICCAT, a gestão sustentável dos peixes-de-bico depende da implementação de metodologias de monitoramento que assegurem a identificação espécie-específica a bordo e no desembarque. Assim, o presente estudo fornece evidências irrefutáveis que suportam a ideia de que métodos moleculares são altamente eficientes para superar a dificuldade de identificação dos peixes-de-bico e a captura ilegal de espécies sobreexploradas no Oceano Atlântico, servindo de suporte para a implementação de novos métodos nos levantamentos estatísticos das atividades pesqueiras.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, A. F.; ARFELLI, C. A. Analysis of the Santos fleet from São Paulo, Southern Brazil (1971-1999). **Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT**, v. 53, p. 263–271, 2001.
- AROCHA, F.; AROCHA, OSCAR; MARCANO, LA. Observed shark bycatch from the Venezuelan tuna and swordfish fishery from 1994 through 2000. **ICCAT Collective Volume of Scientific**, v. 54, p. 1123–1131, 2002.
- AROCHA, F.; MARCANO, L. A. Monitoreo de Grandes Peces Pelagicos en el Mar Caribe y el Atlantico Centro-occidental Mediante un Proggma Integrado de Monitoreo en Venezuela. In: Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. *In: (Gulf and Caribbean Fisheries Institute, Org.) PROCEEDINGS OF THE GULF AND CARIBBEAN FISHERIES INSTITUTE 2001*, **Anais** p. 557–576.
- BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; LABRA, M.; MALANDRA, R.; GALLI, P.; CASIRAGHI, M. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 376–381, 2010.
- Bernard, A.M., Shivji, M.S., Domingues, R.R., Hazin, F.H.V., de Amorim, A.F., Domingo, A., Arocha, F., Prince, E.D., Hoolihan, J.P. and Hilsdorf, A.W.S. Broad geographic distribution of roundscale spearfish (*Tetrapturus georgii*) (Teleostei, Istiophoridae) in the Atlantic revealed by DNA analysis: Implications for white marlin and roundscale spearfish management. **Fisheries Research**, v. 139, p. 93–97, 2013.
- BRASIL. **Instrução normativa SEAP/PR N° 12**, de 14 de julho de 2005. Secretaria de pesca e aquicultura.
- CHAPMAN, DEMIAN D.; ABERCROMBIE, DEBRA L.; DOUADY, CHRISTOPHE J.; PIKITCH, ELLEN K.; STANHOPEN, MICHAEL J.; SHIVJI, MAHMOOD S. A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 415–425, 2003.
- CHOW, S. Identification of billfish using mitochondrial cytochrome b gene fragment amplified by polymerase chain reaction. **Collective Volume of Scientific Papers, Report of Second ICCAT**, v. 41, p. 549–556, 1994.
- Collette, B.B.; Carpenter, K.E.; Polidoro, B.A., Juan-Jordá, M.J., Boustany, A., Die, D.J., Elfes, C., Fox, W., Graves, J., Harrison, L.R. and McManus, R. High Value and Long Life—Double Jeopardy for Tunas and Billfishes. **Science**, v. 333, p. 291–292, 2011.
- DOMINGUES, RODRIGO; OKUDA, GABRIEL; BERNARD, ANDREA; AMORIM, ALBERTO; DE BIASI, JULIANA; HILSDORF, ALEXANDRE. A. DNA tool for the identification of heavily exploited Atlantic billfishes. **Conservation Genetics Resources**, v. 7, 2015.
- EHRHARDT, NELSON; FITCHETT, MARK. **Status of billfish resources and billfish fisheries in the Western Central Atlantic**. FAO Fisheries and Aquaculture Circular, 2016. 72 p.
- ELLIS, RICHARD. **Swordfish a Biography of the Ocean Gladiator**. 1. ed. Chicago: University of Chicago Press, 2013.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. FAO: Rome, 2018.
- Freire, K.M.F., Aragão, J.A.N., Araújo, A.R.R., Ávila-da-Silva, A.O., Bispo, M.C.S., Velasco, G., Carneiro, M.H., Gonçalves, F.D.S., Keunecke, K.A., Mendonça, J.T. and Moro, P.S. Reconstruction of catch statistics for Brazilian marine waters (1950-2010). **Fisheries Centre Research Reports**, v. 23, p. 3–30, 2015.
- GENTNER, B. **The value of billfish resources to both commercial and recreational sectors in the Caribbean**. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Bridgetown, Barbados, 2016. 42 p.
- GENTNER, B. **Economic Analysis of International Billfish Markets**. Gentner Consulting Group: Maryland, 2007. 83 p.

HEBERT, PAUL D. N.; RATNASINGHAM, SUJEEVAN; DE WAARD, JEREMY R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. S96–S99, 2003.

HOLMES, BRONWYN H.; STEINKE, DIRK; WARD, ROBERT D. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. **Fisheries Research**, v. 95, p. 280–288, 2009.

HSIEH, HUNG-SHENG; CHAI, TUU-JYI; HWANG, DENG-FWU. Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of 5 Billfish Species. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. C246–C249, 2005.

HYDE, J. R.; LYNN, E.; JR., R. HUMPHREYS; MUSYL, M.; WEST, A. P. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. **Marine Ecology Progress Series**, v. 286, p. 269–277, 2005.

IBAMA. **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**. Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. Ministério do Meio Ambiente, 2006. 181 p.

ICCAT. **REPORT OF THE STANDING COMMITTEE ON RESEARCH AND STATISTICS (SCRS)**. Madrid.

INNES, B. H.; GREWE, P. M.; WARD, R. D. PCR-based genetic identification of marlin and other billfish. **Marine and Freshwater Research**, v. 49, p. 383–388, 1998.

LINACRE, A.; TOBE, S.S. An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. **Investigative genetics**, England, v. 2, p. 2, 2011.

MCDOWELL, J.; GRAVES, J. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. **Fishery Bulletin**, v. 100, p. 537–544, 2002.

MOURATO, B.; HAZIN, H.; HAZIN, F.; CARVALHO, F.; FERREIRA, A. Assessing Atlantic sailfish catch rates based on Brazilian sport fishing tournaments (1996–2014). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, p. 625–634, 2016.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2011, 60 p.

MYERS, R.A.; WORM, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. **Nature**, v. 423, p. 280–283, 2003.

PINHAL, D.; SHIVJI, M.S.; NACHTIGALL, P.G.; CHAPMAN, D.D.; MARTINS, C.. A streamlined DNA tool for global identification of heavily exploited coastal shark species (genus *Rhizoprionodon*). **PloS one**, v. 7, p. e34797, 2012.

PONS, M.; BRANCH, T.A.; MELNYCHUK, M.C.; JENSEN, O.P.; BRODZIAK, J.; FROMENTIN, J.M.; HARLEY, S.J.; HAYNIE, A.C.; KELL, L.T.; MAUNDER, M.N.; PARMA, A.M. Effects of biological, economic and management factors on tuna and billfish stock status. **Fish and Fisheries**, v. 18, p. 1–21, 2017.

QUAGGIO, A.L.C; LESSA, R.P. T.; KOTAS, J.E.; LIN, C.F. Fishery biology of the swordfish (*Xiphias gladius*, Linnaeus 1758) caught by surface longliners based in Itajaí, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, p. 171–184, 2011.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.

RODRIGUES, J.; CARLOS, E.; DANIEL, S.N.; MARTINS, D.G.; HASHIMOTO, D.T.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Use of genetic markers to identify the illegal trade of billfish in the second largest fishing warehouse of Latin America. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 30, p. 1251–1254, 2020.

RODRIGUES, T.; HILSDORF, A.; PIMENTA, E.; AMORIM, A. Occurrence and identification of Istiophoridae larvae and Xiphiidae eggs off the southeastern Brazilian Coast. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 78–86, 2018.

SARMIENTO-CAMACHO, S.; VALDEZ-MORENO, M. DNA barcode identification of commercial fish sold in Mexican markets. **Genome**, v. 61, p. 457–466, 2018.

SHIVJI, M.; MAGNUSSEN, J.; BEERKIRCHER, L.; HINTEREGGER, G.; LEE, D.; SERAFY, J.; PRINCE, E. Validity, identification, and distribution of the roundscale spearfish, *Tetrapturus georgii* (Teleostei: Istiophoridae): Morphological and molecular evidence. **Bulletin of Marine Science**, v. 79, p. 483–491, 2006.

SIMMS, J.R.; ROOKER, J.R.; HOLT, S.A.; HOLT, G.J.; BANGMA, J. Distribution, growth, and mortality of sailfish (*istiophorus platypterus*) larvae in the northern gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 108, p. 478–490, 2010.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 191–201, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peixes-de-bico são animais explorados comercialmente em todo o mundo e, por isso, seus estoques estão em constante queda. Além de sua importância econômica, também são essenciais para o equilíbrio ecológico marinho. Visto que para elaborar planos de exploração sustentável e conservação se faz necessário entender as dinâmicas populacionais destas espécies e obter relatórios precisos de captura para cada espécie, os estudos genéticos se fazem essenciais.

Por meio de marcadores moleculares, nucleares e mitocondriais, muitos estudos foram realizados para verificar a existência de subpopulações e a diferenciação genética para diversas espécies, além de funcionarem como uma eficiente ferramenta na identificação de espécies quando isso não é possível morfologicamente. Com a identificação genética de espécies é possível que relatórios de captura mais precisos sejam elaborados e que se faça uma eficiente fiscalização. Entretanto, em muitos países, como no Brasil por exemplo, o manejo, a exploração sustentável e a fiscalização de captura, feitos de forma precisa e eficiente, são uma realidade distante.

Atualmente a literatura conta com estudos populacionais, mesmo que escassos, de todas as espécies de peixes-de-bico já conhecidas, com exceção do agulhão-verde (*Tetrapturus pfluegeri*). Além disso, esta espécie é confundida com os agulhões branco (*T. albidus*) e polegar (*T. georgii*) devido à grande semelhança morfológica, fazendo com que seus dados de captura, quando existentes, sejam incertos ou inespecíficos. O presente estudo usou dois marcadores moleculares (microsatélites e D-loop) e análises estatísticas robustas para, pela primeira vez, constatar a existência de estruturação populacional, não geográfica, em *T. pfluegeri* do Oceano Atlântico Ocidental, indicando possível comportamento de filopatria na espécie. Somado a isso, os estudos forenses foram realizados durante um período de 22 meses consecutivos no intuito de testar a eficiência de marcadores genéticos para monitorar a composição de espécies de peixes-de-bico do Atlântico capturadas e comercializadas no maior entreposto de comercialização de pescado do Brasil, o CEAGESP, em São Paulo. O sucesso da identificação específica de peixes, sem a devida integridade corporal, por meio de abordagens moleculares é uma etapa fundamental para o monitoramento da pesca e, assim, para o estabelecimento de medidas de gestão da pesca e proteção de espécies de peixes ameaçadas.

O presente estudo reuni informações científicas sobre um importante recurso genético marinho que se torna um ponto de partida para contribuir com futuros estudos sobre os aspectos biológicos do agulhões-verde e, com isso, coadjuvar na elaboração de planos de manejo e

conservação dessa espécie no Atlântico por órgãos nacionais e internacionais de proteção dos grande peixes pelágicos.

APÊNDICES

Apêndice A. Haplótipos referentes aos dados de sequenciamento da região D-loop de 150 indivíduos pertencentes à espécie *Tetrapturus pfluegeri*, provenientes do Atlântico ocidental. CAR: região do Atlântico Norte. BRA: região do Atlântico Sul. Priv.: número de haplótipos privativos.

Haplótipo	Número de indivíduos por Localidade	
	CAR	BRA
Hap-1	1	-
Hap-2	1	-
Hap-3	2	-
Hap-4	1	2
Hap-5	6	2
Hap-6	1	-
Hap-7	2	-
Hap-8	2	-
Hap-9	2	-
Hap-10	1	-
Hap-11	1	-
Hap-12	4	-
Hap-13	1	1
Hap-14	-	1
Hap-15	2	-
Hap-16	1	1
Hap-17	-	2
Hap-18	-	1
Hap-19	-	1
Hap-20	2	1
Hap-21	1	2
Hap-22	3	1
Hap-23	-	1
Hap-24	3	1
Hap-25	-	1
Hap-26	-	1
Hap-27	-	1
Hap-28	4	2
Hap-29	-	1
Hap-30	1	1
Hap-31	2	1
Hap-32	-	1
Hap-33	-	1
Hap-34	-	1
Hap-35	-	1
Hap-36	-	1
Hap-37	-	1
Hap-38	-	1
Hap-39	2	-
Hap-40	1	-
Hap-41	8	-
Hap-42	1	-
Hap-43	1	-
Hap-44	1	-
Hap-45	2	-
Hap-46	1	-
Hap-47	1	-
Hap-48	1	-
Hap-49	1	-
Hap-50	1	-
Hap-51	3	-

Continuação

Hap-52	2	-
Hap-53	1	-
Hap-54	1	-
Hap-55	1	-
Hap-56	1	-
Hap-57	1	-
Hap-58	1	-
Hap-59	1	-
Hap-60	1	-
Hap-61	2	-
Hap-62	1	-
Hap-63	1	-
Hap-64	2	-
Hap-65	2	-
Hap-66	1	-
Hap-67	1	-
Hap-68	1	-
Hap-69	1	-
Hap-70	1	-
Hap-71	1	-
Hap-72	1	-
Hap-73	1	-
Hap-74	1	-
Hap-75	1	-
Hap-76	2	-
Hap-77	1	-
Hap-78	1	-
Hap-79	1	-
Hap-80	1	-
Hap-81	1	-
Hap-82	1	-
Hap-83	1	-
Hap-84	1	-
Hap-85	1	-
Hap-86	1	-
Hap-87	1	-
Hap-88	1	-
Hap-89	1	-
Hap-90	1	-
Hap-91	1	-
Hap-92	1	-
Hap-93	1	-
Hap-94	1	-
Hap-95	1	-
Hap-96	1	-
Priv.	69	16

Apêndice B. Haplótipos referentes aos dados de sequenciamento da região D-loop de 150 indivíduos pertencentes à espécie *Tetrapturus pfluegeri*, provenientes do Atlântico Ocidental, separados por clusters estimados pelo BAPS (Mt1, Mt2 e Mt3).

Haplótipo	Número de Indivíduos por <i>Cluster</i>		
	Mt1	Mt2	Mt3
Hap-1	1	-	-
Hap-2	-	1	-
Hap-3	-	2	-
Hap-4	3	-	-
Hap-5	8	-	-
Hap-6	1	-	-
Hap-7	2	-	-
Hap-8	2	-	-
Hap-9	2	-	-
Hap-10	1	-	-
Hap-11	1	-	-
Hap-12	4	-	-
Hap-13	2	-	-
Hap-14	1	-	-
Hap-15	2	-	-
Hap-16	2	-	-
Hap-17	2	-	-
Hap-18	-	-	1
Hap-19	-	1	-
Hap-20	-	-	3
Hap-21	-	3	-
Hap-22	4	-	-
Hap-23	1	-	-
Hap-24	4	-	-
Hap-25	1	-	-
Hap-26	1	-	-
Hap-27	1	-	-
Hap-28	6	-	-
Hap-29	-	1	-
Hap-30	2	-	-
Hap-31	3	-	-
Hap-32	1	-	-
Hap-33	1	-	-
Hap-34	-	1	-
Hap-35	1	-	-
Hap-36	1	-	-
Hap-37	1	-	-
Hap-38	1	-	-
Hap-39	2	-	-
Hap-40	1	-	-
Hap-41	8	-	-

Continuação

Hap-42	1	-	-
Hap-43	-	-	1
Hap-44	1	-	-
Hap-45	-	2	-
Hap-46	1	-	-
Hap-47	1	-	-
Hap-48	-	1	-
Hap-49	1	-	-
Hap-50	1	-	-
Hap-51	3	-	-
Hap-52	2	-	-
Hap-53	1	-	-
Hap-54	1	-	-
Hap-55	-	1	-
Hap-56	-	1	-
Hap-57	1	-	-
Hap-58	1	-	-
Hap-59	1	-	-
Hap-60	-	-	1
Hap-61	2	-	-
Hap-62	-	1	-
Hap-63	1	-	-
Hap-64	2	-	-
Hap-65	2	-	-
Hap-66	1	-	-
Hap-67	1	-	-
Hap-68	1	-	-
Hap-69	-	1	-
Hap-70	1	-	-
Hap-71	1	-	-
Hap-72	1	-	-
Hap-73	-	1	-
Hap-74	1	-	-
Hap-75	1	-	-
Hap-76	2	-	-
Hap-77	1	-	-
Hap-78	1	-	-
Hap-79	1	-	-
Hap-80	-	1	-
Hap-81	1	-	-
Hap-82	1	-	-
Hap-83	1	-	-
Hap-84	1	-	-
Hap-85	1	-	-
Hap-86	1	-	-

Continuação

Hap-87	1	-	-
Hap-88	1	-	-
Hap-89	1	-	-
Hap-90	1	-	-
Hap-91	1	-	-
Hap-92	-	1	-
Hap-93	1	-	-
Hap-94	1	-	-
Hap-95	1	-	-
Hap-96	1	-	-

Apêndice C. Composição de indivíduos dos *clusters* e agrupamentos estimados pelo STRUCTURE e pela DAPC para *Tetrapturus pfluegeri* a partir de dados microsatélites.

STRUCTURE			DAPC		
St1	St2	St3	Ag1	Ag2	Ag3
oc-6	oc-1	oc-2	oc-39	oc-6	oc-1
oc-7	oc-3	oc-8	oc-45	oc-7	oc-2
oc-9	oc-12	oc-16	oc-183	oc-9	oc-3
oc-11	oc-20	oc-38	oc-201	oc-11	oc-8
oc-21	oc-27	oc-39	oc-215	oc-16	oc-12
oc-26	oc-28	oc-45	oc-231	oc-21	oc-20
oc-32	oc-30	oc-101	oc-239	oc-26	oc-31
oc-36	oc-31	oc-115	oc-241	oc-27	oc-38
oc-37	oc-35	oc-132	oc-243	oc-28	oc-101
oc-121	oc-41	oc-134	oc-245	oc-30	oc-113
oc-131	oc-43	oc-137	oc-247	oc-32	oc-115
oc-133	oc-110	oc-143	oc-251	oc-35	oc-118
oc-142	oc-113	oc-173	oc-254	oc-36	oc-121
oc-144	oc-118	oc-183	oc-259	oc-37	oc-129
oc-147	oc-126	oc-186	oc-260	oc-41	oc-131
oc-148	oc-129	oc-201	oc-261	oc-43	oc-132
oc-149	oc-135	oc-203	oc-264	oc-110	oc-134
oc-151	oc-140	oc-204	oc-266	oc-126	oc-135
oc-155	oc-150	oc-207	oc-296	oc-133	oc-140
oc-156	oc-154	oc-223	oc-298	oc-137	oc-168
oc-158	oc-157	oc-227	oc-299	oc-142	oc-179
oc-159	oc-160	oc-231	oc-304	oc-143	oc-186
oc-161	oc-170	oc-238	oc-334	oc-144	oc-194
oc-168	oc-179	oc-239	oc-335	oc-147	oc-200
oc-178	oc-182	oc-240	oc-343	oc-148	oc-203
oc-190	oc-184	oc-241	oc-381	oc-149	oc-204
oc-198	oc-188	oc-243	-	oc-150	oc-207
oc-213	oc-189	oc-245	-	oc-151	oc-209
oc-215	oc-191	oc-247	-	oc-154	oc-210
oc-229	oc-194	oc-251	-	oc-155	oc-219
oc-230	oc-196	oc-254	-	oc-156	oc-223
oc-235	oc-200	oc-259	-	oc-157	oc-227
oc-236	oc-209	oc-260	-	oc-158	oc-238
oc-250	oc-210	oc-261	-	oc-159	oc-240
oc-252	oc-211	oc-264	-	oc-160	oc-250
oc-268	oc-214	oc-266	-	oc-161	oc-253
oc-270	oc-218	oc-267	-	oc-170	oc-257
oc-271	oc-219	oc-282	-	oc-173	oc-268
oc-272	oc-220	oc-287	-	oc-178	oc-270
oc-275	oc-246	oc-290	-	oc-182	oc-272
oc-279	oc-253	oc-296	-	oc-184	oc-278
oc-281	oc-255	oc-298	-	oc-188	oc-279
oc-284	oc-257	oc-299	-	oc-189	oc-287
oc-297	oc-263	oc-304	-	oc-190	oc-289
oc-305	oc-278	oc-311	-	oc-191	oc-290
-	oc-289	oc-334	-	oc-196	oc-295
-	oc-294	oc-335	-	oc-198	oc-300
-	oc-295	oc-343	-	oc-211	oc-311
-	oc-300	oc-381	-	oc-213	-
-	oc-306	-	-	oc-214	-
-	-	-	-	oc-218	-
-	-	-	-	oc-220	-
-	-	-	-	oc-229	-
-	-	-	-	oc-230	-
-	-	-	-	oc-235	-

Continuação

-	-	-	-	oc-236	-
-	-	-	-	oc-246	-
-	-	-	-	oc-252	-
-	-	-	-	oc-255	-
-	-	-	-	oc-263	-
-	-	-	-	oc-267	-
-	-	-	-	oc-271	-
-	-	-	-	oc-275	-
-	-	-	-	oc-281	-
-	-	-	-	oc-282	-
-	-	-	-	oc-284	-
-	-	-	-	oc-294	-
-	-	-	-	oc-297	-
-	-	-	-	oc-305	-
-	-	-	-	oc-306	-

Número de Indivíduos

STRUCTURE			DAPC		
St1	St2	St3	Ag1	Ag2	Ag3
45	50	49	26	70	48

Apêndice D. Estudos de avaliação genética populacional em peixes-de-bico (Xiphiidae e Istiophoridae). DNA mitocondrial (DNAmT); DNA nuclear (DNAn); região controle do DNAmT (D-loop); número de alelos (A); riqueza alélica (Ar); equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW); coeficiente de parentesco (R); polimorfismo de sítio único (SNP); sequência curta de repetição (SSR); Clamodulina (CaM); fosfoproteína ribossômica ácida P0 (ARP); cadeia leve de miosina 2 ($Mlc2$); actina alfa-esquelética 2 ($ActA2$); nicotinamida desidrogenase, subunidade 2 (ND2); Oceano Pacífico (PAC); Pacífico Oriental Norte (NEP); Pacífico Oriental Sul (SEP); Índico Norte (IN); Mediterrâneo (MED); Oceano Atlântico (ATL); Atlântico Norte (AN); Atlântico Sul (AS); Atlântico Ocidental Norte (NWA); Atlântico Ocidental Sul (SWA); Atlântico Oriental Norte (NEA); Atlântico Central Norte (NCA); Atlântico Tropical Norte (NTA); Atlântico Equatorial (AE).

ESPADARTE

Autor	Espécie	Localidade (n. de indivíduos)	Marcador	Parâmetros genéticos e *Conclusões
Grijalva-Chon et al. (1994)	<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico Ocidental Norte (47) Pacífico Central Norte (42) Pacífico Oriental Norte (59)	RFLP, DNAmT (17 enzimas de restrição)	Sem diferenciação geográfica significativa. $H = 27$ $\pi = 0,0017 - 0,0026$ $G_{ST} = 0,046$ ($p > 0,1$) *Fluxo gênico suficiente ao longo Pacífico Norte, evitando dif. genética. Único estoque genético.
Bremer et al. (1995)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico (35) Pacífico (8) Mediterrâneo (7)	Sequenciamento D-loop (280 pb)	$H = 33$ $h = 0,85 - 1,00$ 2 clados (I, II) que divergiram a ≈ 550.000 anos atrás I: todas as regiões II: principalmente no MED e AN $\Phi_{CT} = 0,093$ ($p = 0,038$) *Baixa diferenciação entre ATL e PAC, indica fluxo gênico histórico. *Suportou a hipótese de estoque único no ATL. *Pode haver filopatria de fêmeas para áreas de reprodução. *Parece razoável que os haplótipos do clado II sejam originários do MED.
Kotoulas et al. (1995)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (123) Tarifa, Estreito de Gibraltar, Espanha (31) Golfo da Guiné, Atlântico (50)	RFLP, DNAmT (11 enzimas de restrição)	$H = 25$ $h = 0,137$ MED+Tarifa/Guiné (82% da heterogeneidade total) *Baixo fluxo gênico entre MED e ATL. *1ª evidência de dif. genética em <i>X. gladius</i> .
Bremer et al. (1996)	<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico (26) Atlântico (47) Mediterrâneo (49)	Sequenciamento D-loop (330 pb)	$H = 69$ $h = 0,94 - 1,00$ Dois clados altamente divergentes Alta diferenciação genética entre: PAC/AN ($p = 0,0145$); PAC/MED ($p = 0,0001$); AN/MED ($p = 0,0001$). *Ao menos 4 pops. geneticamente distintas de <i>X. gladius</i> .

Continuação

Grijalva-Chon et al. (1996)	<i>Xiphias gladius</i>	Hawaii (44) México (50)	Alozimas (26 loci)	4 loci polimórficos México: $H_o = 0,010$; $H_e = 0,013$ Hawaii: $H_o = 0,026$; $H_e = 0,027$ $G_{teste} = 8,792$ ($p < 0,05$) $F_{ST} = 0,039$ ($p < 0,01$) Migrantes/geração = 6,2 *Necessidades de futuros estudos para corroborar o status da espécie no PAC.																														
Rosel and Block (1996)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (20) Atlântico (34) Pacífico (105)	Sequenciamento D-loop (300pb)	$H = 121$ $h = 0,994$ $\pi = 0,0345$ $\Phi_{ST} = 0,157$ ($p < 0,001$) 2 clados diferentes (I; II) I (todas as localidades); II (ATL e MED). *Estruturação genética em escala global precisa ser confirmada por sequências de menor variabilidade.																														
Chow et al. (1997)	<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico (236) Índico (63) África do Sul (11) Atlântico (119) Mediterrâneo (34)	PCR-RFLP, D-loop (4 enzimas de restrição)	$h = 0,702 - 0,962$ Análises do X^2 para comparação dos locais de amostragem por pares. Níveis de significância: * $0,0001 < p < 0,005$ e ** $p < 0,0001$.																														
				<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PAC</th> <th>Índico</th> <th>AS</th> <th>NWA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PAC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Índico</td> <td>51,689</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>AS</td> <td>75,763*</td> <td>36,990</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>NWA</td> <td>114,583**</td> <td>49,905*</td> <td>43,29*</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MED</td> <td>94,047*</td> <td>41,031**</td> <td>40,582</td> <td>29,965*</td> </tr> </tbody> </table>		PAC	Índico	AS	NWA	PAC					Índico	51,689				AS	75,763*	36,990			NWA	114,583**	49,905*	43,29*		MED	94,047*	41,031**	40,582	29,965*
	PAC	Índico	AS	NWA																														
PAC																																		
Índico	51,689																																	
AS	75,763*	36,990																																
NWA	114,583**	49,905*	43,29*																															
MED	94,047*	41,031**	40,582	29,965*																														
				*Fluxo gênico restrito a pesar da ausência de barreiras geográficas. *MED: baixa diversidade; raramente recebe migrantes.																														
Chow and Takeyama (2000)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (81) Atlântico Norte (144) Atlântico Sul (185) Índico (84) Pacífico (236)	PCR-RFLP do intron 4 do gene CaM, DNAn (1 enzima) PCR-RFLP, D-loop (2 enzimas)	$A = 2$ $F_{IS} = -0,006 - 0,127$ EHW: $p > 0,05$ $F_{ST} = 0,369$ ($p < 0,001$) $X^2 = 21,3 - 142,3$ ($p < 0,001$) *Os dois marcadores indicam existir ao menos 4 unidades de reprodução																														

Continuação

Reeb et al. (2000)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico (36) PAC: Austrália (12) Japão (46) Hawaii (42) Califórnia (30) México (15) Centro-Equatorial, CE (54) Chile (46)	Sequenciamento D-loop (629pb)	$h = 0,999$ Φ_{ST} (Japão/Austrália) = 0,032 ($p = 0,001$) Φ_{ST} (Hawaii/Austrália) = 0,014 ($p = 0,030$) Φ_{ST} (CE/Japão) = 0,014 ($p = 0,035$) Φ_{ST} (Chile/Japão) = 0,015 ($p = 0,028$) Φ_{ST} (CE/Hawaii) = 0,015 ($p = 0,027$) *Correlação entre \neq genética e distância geográfica. *Pop. do PAC estruturada; mais de um estoque.
Chow et al. (2002)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Ocidental Norte (129) Atlântico Tropical Norte (114) Atlântico Tropical Sul (47) Brasil (128)	PCR-RFLP DNAn (1 locus)	EHW: $p < 0,001$ $F_{IS} = 0,204$ AN/AS: $F_{ST} = 0,35$ ($p < 0,001$) *Existem ao menos 2 estoques distintos no ATL.
Pujolar et al. (2002)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico (12) MED: Alboran (11) Alicante (30) Ligurian (143) Ionian (128) Aegean (77)	Alozimas (38 loci)	2 loci polimórficos Baixa variabilidade genética $H_o = 0,006 - 0,017$ EHW: $p > 0,05$ $G_{ST} = 0,007 - 0,025$ ($p > 0,05$) *Pop. única no MED e águas adjacentes do ATL.
Bremer et al. (2005a)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Ocidental Norte (97) Atlântico Sul (174) Mediterrâneo Occidental (135) Índico (45) Pacífico (29)	Sequenciamento D-loop (330 pb)	2 clados diferentes (I; II) π (MED/NWA) = 0,018 – 0,032 (I); 0,009 – 0,021 (II) % de variação entre regiões = 8,67 ($p = 0,004$) *NWA e AS pertencem a pops. separadas. *Indicativo de filopatria para regiões de reprodução e alimentação.
Bremer et al. (2005b)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (138) Atlântico Norte (27)	Sequenciamento D-loop (303 pb)	$H = 151$ $h = 0,973$ $\pi = 0,043$ 2 clados altamente diferentes $\Phi_{ST} = 0,091$ ($p < 0,001$) *Não houve estruturação dentro do MED, assim como do ATL. *Pops. divergentes devido a vicariância, contato secundário e histórias demográficas regionais diferentes.

Continuação

Bremer et al. (2006)	<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico, 10 localidades (273) Índico Oriental, 1 localidade (32)	Sequenciamento do intron 6 do gene <i>ldh</i> -A (DNAn - 97pb)	$A = 7$ $H_o = 0,333 - 0,789$ $H_e = 0,497 - 0,689$ $F_{IS} = -0,079 - 0,330$ EHW: $p = 0,103 - 1,000$ $F_{ST} = 0,013$ ($p = 0,0007$) *Existe diferenciação genética entre pops. do Hawaii, NEP, SEP e Austrália.
Jean et al. (2006)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico Ocidental Sul, 4 localidades (86)	PCR-RFLP, DNAm (1900 pb) ----- Microssatélites (6 loci)	$H = 15$ $h = 0,789 - 0,896$ $F_{ST} = 0,001 - 0,020$ ($p > 0,197$) ----- $A = 7,17 - 13,5$ EHW: $p < 0,05$ para 2 loci $F_{ST} = -0,002 - 0,0008$ ($p = 0,148 - 0,999$) *Pequeno n. amostral para detectar estruturação pop. O estudo serve como base para futuros estudos.
Lu et al. (2006)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico (136) Pacífico (39) Mediterrâneo (20)	Sequenciamento D-loop (841pb)	$H = 142$ $h = 0,914 - 1,000$ $\pi = 0,011 - 0,018$ $F_{ST} = 0,04910 - 0,14376$ ($p < 0,05$) 3 populações mostraram grande diferenciação (Madagascar Norte, IN, MED). *Importantes resultados para o gerenciamento da pesca no Indo-Pacífico.
Viñas et al. (2006)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Oriental Norte (42) Atlântico Ocidental Norte (66) Mediterrâneo (229)	Sequenciamento D-loop (303pb)	$H = 114$ $h = 0,968$ $\pi = 0,048$ Φ_{ST} (MED+NEA/NWA) = 0,091 ($p < 0,001$) Φ_{ST} (ANE/NWA) = 0,048 ($p = 0,012$) Φ_{ST} (MED/NWA) = 0,091 ($p < 0,001$) *A pop. do MED excede o limite do Estreito de Gibraltar e pode ser verificado um estoque misto no AN.

Continuação

		Atlântico Norte (60) Golfo da Guiné (84) Índico (45) Atlântico Sul (87)	Sequenciamento D-loop	2 cladogramas (I e II) Pops. do AS/Índico e NEA/MED foram significativamente diferentes.
Bremer et al. (2007)	<i>Xiphias gladius</i>	Namíbia (28) Agulhas (30) Atlântico Norte (144) Atlântico Sul (185) Índico (84)	PCR-RFLP do intron 4 do gene CaM, DNAn (1 enzima)	Pops. do AS/NWA ($p < 0,01$) e AS/Índico ($p < 0,05$) são diferentes.
		Atlântico Sul (140) Atlântico Norte (173)	Sequenciamento do intron 6 do gene <i>ldh-A</i> , DNA nuclear (97pb)	Pops. do AS/NWA não foram diferentes ($p = 0,035$). *Base para que futuros estudos possam evitar erros do tipo I. * Delimitação das áreas onde futuros trabalhos devem se basear para esclarecer a estrutura pop. da espécie.
Chow et al. (2007)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Norte (160) Atlântico Centro-Sul (354) Zona de limite (18)	SNP (1 locus, intron do gene CaM)	$A = 2$ EHW: $p > 0,2$ $F_{ST} = 0,18 - 0,34$ ($p < 0,001$) *O fluxo gênico entre as áreas é consideravelmente restrito. *A zona limite de gerenciamento dos estoques de <i>X. gladius</i> do ATL deve ser reconsiderada.
Kasapidis et al. (2007a)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Oriental Norte (432) Atlântico Ocidental Norte (451) Atlântico Central (116) Atlântico Sul (180)	Microsatélites (4 loci)	$A = 52 - 74$ EHW: $p > 0,05$ F_{ST} (AS/demais locais) = $0,0012 - 0,0018$ ($p < 0,005$) *Dados não conclusivos que precisam ser corroborados por maior número de loci.
Kasapidis et al. (2007b)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Ocidental Norte (448) Atlântico Oriental Norte (363) Atlântico Central (167) Mediterrâneo (393) Alboran (64)	Microsatélites (4 loci)	Análise Bayesiana: 2 clusters (I, II) I: maioria dos indivíduos pertenciam ao MED R (I) = $0,576 - 0,621$ II: maioria dos indivíduos pertenciam ao ATL R (II) = $0,734 - 0,847$ *Corroborou a diferenciação genética entre ATL e MED, mas não detectou separação entre AS e AN.

Continuação

Kotoulas et al. (2007)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (602) Atlântico Norte (997) Atlântico Sul (181) Índico Sul (77) Pacífico Sul (169)	Microsatélites (4 loci)	<p>$A = 56 - 82$ $Ar = 22,85 - 37,75$ EHW: $p < 0,05$ $F_{ST} = 0,001 - 0,042$ ($p =$ altamente significativa) *Maior número de loci e combinação com DNAm são necessários para elucidar os resultados. *Migrações sazonais também precisam ser melhor estudadas.</p>
Kasapidis et al. (2008)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico (658) Mediterrâneo (206) Pacífico (134) Índico (151)	Microsatélites (10 loci)	<p>EHW: $p < 0,05$ Análise de heterogeneidade: estruturação genética entre MED/AS/AN/Indo-Pacífico. Análise Bayesiana: 3 clusters (I, II, III) I = MED; $R = 0,88$ II = ATL; $R = 0,44 - 0,53$ III = Indo-Pacífico; $R = 0,58 - 0,61$ *Com maior número de loci e maior cobertura geográfica, futuros estudos poderão atribuir indivíduos a seu local de origem em menor escala geográfica.</p>
Muths and Bourjea (2008)	<i>Xiphias gladius</i>	<p>Índico: Glorieuses, GLO (105) Seychelles, SEY (67) Reunion, RUN (65) Madagascar, MADA (100)</p>	<p>Sequenciamento D-loop (517 pb)</p> <hr/> <p>Microsatélites (11 loci)</p>	<p>$H = 240$ $h = 0,996 - 0,997$ $\pi = 0,019 - 0,021$ $\Phi_{ST} (SEY/RUN) = 0,003$ ($p < 0,05$) $\Phi_{ST} (demais locais) = 0,000 - 0,001$ ($p > 0,05$)</p> <hr/> <p>$A = 14,3 - 17,5$ $Ar = 13,3 - 14,6$ $H_o = 0,640 - 0,720$ $H_e = 0,771 - 0,784$ $F_{IS} = 0,079 - 0,176$ $F_{ST} (SEY/GLO) = 0,005$ ($p < 0,001$) $F_{ST} (demais locais) = 0,000 - 0,003$ ($p > 0,05$) *Discreta diferenciação genética pode ser indicio de um pool genético no Índico Norte. Os resultados devem ser levados em conta para gerenciamento pesqueiro.</p>

Continuação

Muths et al. (2009)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico: Glorieuses, GLO (105) Seychelles, SEY (67) Reunion, RUN (65) Madagascar, MADA (100)	Sequenciamento D-loop (517 pb) Microssatélites (11 loci)	$H = 59 - 90$ $h = 0,996 - 0,997$ $\pi = 0,019 - 0,021$ $\Phi_{ST} (SEI/RUN) = 0,003 (p < 0,05)$ $\Phi_{ST} (demais locais) = 0,000 - 0,001 (p > 0,05)$ <hr/> $A = 14,3 - 17,5$ $Ar = 13,3 - 14,6$ $Ho = 0,640 - 0,720$ $He = 0,771 - 0,784$ $F_{IS} = 0,079 - 0,176$ $F_{ST} (SEY/GLO) = 0,005 (p < 0,001)$ $F_{ST} (demais locais) = 0,000 - 0,003 (p > 0,05)$ *O Índico possui uma única pop. panmítica, entretanto diferenças genéticas discreta pode indicar um segundo pool genético ao Norte do Índico.
Smith et al. (2010)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Ocidental Norte (44) Atlântico Sul (45) Mediterrâneo (30)	PCR-RFLP do DNAn	3 pops. significativamente diferentes $R (NWA) = 0,944$ $R (AS) = 0,952$ $R (MED) = 0,933$ *93% dos indivíduos foram atribuídos a seus locais de origem. Marcadores nucleares e análise Bayesiana tiveram grande capacidade de definir pops. e devem ser consideradas para o gerenciamento de estoques mistos.
Viñas et al. (2010)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo Ocidental (104) Mediterrâneo Oriental (147)	Sequenciamento D-loop (303pb)	$H = 96$ $h = 0,948$ $\pi = 0,047$ 2 cladogramas altamente divergentes (I, II) $\Phi_{ST} (I) = 0,058 (p = 0,000)$ $\Phi_{ST} (II) = 0,037 (p = 0,006)$ Mismatch (I): tamanho pop. constante Mismatch (II): expansão pop. *Pops. do MED devem ser geridas como, ao menos, dois estoques distintos. *O gerenciamento como um estoque no MED, pode levar à sobrepesca de pequenas pops.

Continuação

Bradman et al. (2011)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico: Mar de Coral (50) Mar de Timor (45) Fremantle (37) Índico Central (25) Seychelles (48)	Sequenciamento D-loop (835pb)	$H = 169$ $h = 0,997$ $\pi = 0,015$ F_s de $F_u = -1,7$ ($p > 0,10$) D de Tajima = $-1,5$ ($p > 0,10$) $\Phi_{ST} = -0,0002 - 0,0023$ ($p > 0,3$)
			Sequenciamento ND2, DNAMt (1047pb)	$H = 76$ $h = 0,911$ $\pi = 0,002$ F_s de $F_u = -4,2$ ($p < 0,02$) D de Tajima = $-2,6$ ($p < 0,001$) $\Phi_{ST} = -0,006 - 0,012$ ($p = 0,024 - 0,684$) Φ_{ST} (Seychelles/Timor) = $0,012$ ($p = 0,024$) Φ_{ST} (Seychelles/Coral) = $0,011$ ($p = 0,029$)
<p>*D-loop subestimou a diferenciação genética existente entre as pops. *Os marcadores genéticos devem ser escolhidos de acordo com o grau de subdivisão.</p>				
Garcia et al. (2011)	<i>Xiphias gladius</i>	Atlântico Norte Ocidental (39) Atlântico Norte Central (53) Atlântico Norte Oriental (51) Atlântico Tropical Norte (48) Atlântico Equatorial (83)	PCR-RFLP, D-loop (5 enzimas)	$H = 19 - 39$ $h = 0,755 - 0,935$ $\pi = 0,017 - 0,026$ F_{ST} (NCA/AE) = $0,0412$ ($p < 0,05$) F_{ST} (NTA/AE) = $0,0333$ ($p < 0,05$) * Esses resultados indicam que não é necessário alterar os limites das zonas de manejo para a pesca atlântica.

Continuação

Muths et al. (2013)	<i>Xiphias gladius</i>	Índico (1920) Atlântico (186) Pacífico (125)	Sequenciamento ND2, DNAmT (pb)	$H = 282$ $h = 0,886$ $\pi = 0,002$ 2 clados divergentes (I, II) $\Phi_{ST} = 0,006$ ($p < 0,001$) Φ_{CT} (entre os oceanos) = $0,011$ ($p < 0,001$) $D > 0,25$
			Microssatélites (19 loci)	$Ar = 5,8 - 6,5$ $F_{IS} = 0,02 - 0,14$ 2 pools genético $F_{ST} = 0,003$ ($p < 0,001$) F_{CT} (entre os oceanos) = $0,0008$ ($p < 0,01$) $D < 0,03$ *Homogeneidade genética no Índico. *Isolamento entre os oceanos gerando grandes perspectivas para a gestão pesqueira.
Smith et al. (2015)	<i>Xiphias gladius</i>	Mediterrâneo (59) Atlântico Norte (475) Atlântico Sul (240)	SNPs (26 loci, genes nucleares)	$A = 2 - 6$ F_{ST} (MED/AS) = $0,081 - 0,121$ ($p < 0,05$) F_{CT} (MED/AN/AS) = $0,052$ ($p < 0,001$) *O grande número de loci e cobertura amostral possibilitaram identificar, com fina resolução, os limites que separam as pops. do Atlântico. *Os dados foram interpretados com base na biologia reprodutiva, padrões de dispersão e características oceanográficas que podem atuar como barreiras ao fluxo gênico.
Lu et al. (2016)	<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico (891)	SNPs (10 loci) SSR (2 loci)	Regiões temperadas foram homogêneas entre si. Houve heterogeneidade genética entre regiões tropicais. Diferenciação genética significativa entre regiões tropical e temperada ($F_{CT} = 0,002$, $p < 0,01$). Comparação entre Taiwan, região tropical e região temperada ($F_{CT} = 0,0044$, $p < 0,001$). *Não foram identificados limites genéticos claros. *A estruturação pop. no PAC é mais complexa que a separação entre pops. das zonas tropical e temperada, necessitando de estudos mais abrangentes para ser elucidada.

Continuação

Righi et al. (2020a)	<i>Xiphias gladius</i>	<p>MED: Mar das Baleares (84) Sul da Sicília (59) Mar Egeu (17) Mar Adriático Sul (62) Mar Tirreno (16) Mar de Sardenha (49)</p>	Sequenciamento D-loop	<p>2010: $H = 33 - 60$ $h = 0,861 - 0,946$ $\pi = 0,006 - 0,160$ 2020: $H = 10 - 26$ $h = 0.418 - 0.844$ $\pi = 0.003 - 0.130$ $F_{ST} (2010/2020) = 0,018 (p < 0,001)$ *Primeira evidência da redução de variabilidade genética dos espadartes do MED em curto período de tempo. *Possível relação entre a perda de diversidade e a atividade pesqueira na região.</p>
Righi et al. (2020b)	<i>Xiphias gladius</i>	<p>MED: Mar das Baleares (85) Sul da Sicília (61) Mar Egeu (20) Mar Adriático Sul (62) Mar Tirreno (16) Mar de Sardenha (54) ATL: NWA (25)</p>	Microsatélites (20 loci)	<p>DAPC: três <i>clusters</i> no MED Alto nível de mistura no MED $F_{ST} (MED/ATL) = 0,091 (p < 0,05)$ $F_{ST} (MED) = 0,018 (p < 0,05)$ $F_{ST} (clusters) = 0,05 - 0,07 (p < 0,05)$ *A mistura de diferentes clusters em uma localidade dificulta uma clara delimitação de áreas de gestão. *Amostragens em áreas de reprodução podem melhorar a avaliação da segregação genética geográfica.</p>
AGULHÕES				
Shaklee et al. (1982)	<i>Makaira nigricans</i>	Hawaii (95)	Alozimas (23 enzimas, 35 loci)	<p>11 loci polimórficos $A = 2 - 5$ Frequência alélica = 0,005 – 0,995 $H_o = 0,060$ Taxa de polimorfismo = 0,26 $H_o = 0,06$ *Os níveis de polimorfismo e a heterozigiosidade sugeriram a existência de estruturação populacional, o que pode revelar heterogeneidade de estoques.</p>
Finnerty and Block (1992)	<i>Makaira nigricans</i>	<p>PAC: Hawaii (14) Nova Zelândia (1) ATL: Bahamas (3) Carolina do Norte (7) Caribe (2)</p>	Sequenciamento citocromo b, DNAm (612 pb)	<p>$H = 7$ $h = 0,683$ $\pi = 0,0034$ Genótipos se dividem em 2 grupos: PAC/ATL $X^2 = 6,03 (p < 0,05)$ *As frequências dos dois ramos evolutivos predominantes possuem diferenciação significativa entre PAC e ATL. *O manejo pesqueiro deve se atentar na preservação da variabilidade genética.</p>

Continuação

Graves and McDowell (1994a)	<i>Kajikia audax</i>	PAC: México (36) Equador (40) Hawaii (43) Austrália (47)	PCR-RFLP, DNAm (11 enzimas)	N. de genótipos = 20 Diversidade genética = 0,69 – 0,84 Aparente divisão espacial de genótipos $X^2: p < 0,001$ Cada local foi caracterizado pela presença de genótipos únicos em elevadas frequências. *Manejo deve focar em unidades menores que as atualmente estabelecidas para a conservação da variabilidade genética da espécie.
Graves and McDowell (1994b)	<i>Kajikia audax</i>	México (38) Equador (42) Hawaii (41) Austrália (39)	PCR-RFLP, DNAm (13 enzimas)	<i>K. audax</i> : heterogeneidade genética significativa entre as localidades.
	<i>Makaira nigricans</i>	Hawaii (25) Porto Rico (26)		Maior diferenciação genética foi verificada entre os Oceanos Atlântico e Pacífico para <i>M. nigricans</i> e <i>I. platypterus</i> . *Os resultados indicam fluxo gênico limitado entre os Oceanos.
	<i>Istiophorus platypterus</i>	Florida (23) México (20)		
		ATL: Porto Rico (24) Jamaica (20) PAC: Hawaii (54)	Alozimas (33 enzimas)	4 loci polimórficos Variação genética = 0,30 EHW: $p > 0,05$ Diferenciação genética (ATL/Pacífico) = 0,08
Buonaccorsi et al. (1999)	<i>Makaira nigricans</i>	ATL: Porto Rico (31) Jamaica (25) PAC: Hawaii (58)	PCR-RFLP, DNAm (67 enzimas)	AMOVA (Φ) = 0,025 ($p < 0,001$) Variação genética = 0,85 Diferenciação genética (ATL/Pacífico) = 0,39
		ATL: Jamaica (214) EUA (23) PAC: Hawaii (103) México (49,24) Equador (19) Austrália (25)	DNAn de cópia única (13 clones)	4 loci polimórficos Sítios polimórficos = 11 Variação genética = 0,37 Diferenciação genética (ATL/Pacífico) = 0,09 Diferença significativa nas frequências alélicas do ATL e do Pacífico. *Resultados consistentes com um período histórico de alopatria seguido de recente mistura. *Menor divergência nuclear que mitocondrial é consistente com a migração estimada entre oceanos.

Continuação

		Atlântico (220) Pacífico (176)	Microsatélites (5 loci)	$A = 161$ $A_r = 32,2$ $H_o = 0,95$ $F_{ST} = 0,146 (p < 0,047)$
Buonaccorsi, McDowell and Graves (2001)	<i>Makaira nigricans</i>	Atlântico (195) Pacífico (163)	RFLP, DNAmT (11 enzimas)	Análise de clusters = 2 grupos divergentes $H = 110$ $h = 0,93$ (ATL) vs. $0,76$ (PAC); $p < 0,0001$ $\pi = 0,052$ (ATL); $0,016$ (PAC) $\Phi = 0,217 (p < 0,001)$ Baixo fluxo gênico *Os resultados ilustram o poder das análises genealógicas por DNAmT para investigar história populacional e a precisão do DNAn para estimar fluxo gênico.
Graves e McDowell (2001)	<i>Makaira nigricans</i>	Jamaica (273) EUA (66) Bahamas (28) Brasil (61) Ghana (49)	RFLP, DNAmT Cyt b, DNAmT scnDNA, DNAn intron, DNAn Microsatélites (5 loci)	*Todos os marcadores indicaram a existência de apenas um estoque no ATL. *Resultados consistentes com a história natural das espécies (distribuição contínua através dos trópicos, ampla variedade de áreas e épocas de desova e ampla capacidade de deslocamento dos adultos).
	<i>Tetrapturus albidus</i>	Brasil (81) EUA (77) Rep. Dominicana (18) Marrocos (36) Venezuela (36)	RFLP, DNAmT Microsatélites (4 loci)	
McDowell and Graves (2002)	<i>Istiophorus platypterus</i>	Atlântico Ocidental (163) Atlântico Oriental (131)	PCR-RFLP, D-loop (5 enzimas)	$H = 42$ $h = 0,84 - 0,94$ $\pi = 0,017 - 0,024$ $F_{ST} = 0,0005 (p = 0,400)$
			Microsatélites (3 loci)	$A = 4 - 15$ Diversidade gênica = $0,583 - 0,905$ $F_{ST} = -0,004 (p = 0,971)$ *No ATL não foi verificada estruturação populacional.
Hoolihan et al. (2004)	<i>Istiophorus platypterus</i>	Dentro do Golfo Pérsico (78) Fora do Golfo Pérsico (69)	PCR-RFLP, D-loop (25 enzimas)	$H = 39$ $h = 0,022 - 0,051$ Haplótipos privados dentro do golfo = 6 Haplótipos privados fora do golfo = 25 F_{ST} (fora/dentro do golfo) = $0,356 (p < 0,001)$ Migração restrita. *Variabilidade restrita dentro do golfo e alta diferença nas frequências haplotípicas sugere ocorrência de efeito fundador devido ao aumento do nível do mar no fim da última glaciação.

Continuação

Graves and McDowell (2006)	<i>Tetrapturus albidus</i>	Atlântico Ocidental Norte (74)	Microsatélites (5 loci)	$A = 14 - 31$ $H_o = 0,838 - 0,892$ $F_{ST} (NWA/SWA) = 0,0041 (p = 0,017)$
		Atlântico Ocidental Sul (63)		
		Atlântico Oriental (36)		
		Atlântico Ocidental Norte (20)	Sequenciamento D-loop (834 pb)	$H = 90$ $h = 0,998$ $\pi = 0,032$ $\Phi_{ST} = -0,012 - 0,040 (p > 0,05); (NWA/Caribe) = 0,040 (p = 0,045)$ * No Atlântico o fluxo gênico é suficiente para prevenir o acúmulo de diferenciação genética. Entretanto, a observação de diferenciação entre algumas regiões merece análises mais profundas.
		Caribe (36)		
		Atlântico Ocidental Sul (20)		
		Atlântico Oriental (23)		
McDowell et al. (2007)	<i>Makaira nigricans</i>	Atlântico Ocidental Norte (15)	Sequenciamento D-loop (904 pb)	$H = 11 - 17$ $h = 0,99 - 1,00$ $\pi = 0,11 - 0,13$ $\Phi_{ST} (localidades) = \text{todos negativos e não significantes}$ Duas linhagens distintas (I, II) $\Phi_{ST} (I/II) = 0,799 (p < 0,0001)$ *Resultados vão de acordo com o manejo da espécie como um único estoque no ATL.
		Caribe (11)		
		Atlântico Ocidental Sul (13)		
		Atlântico Oriental (18)		
McDowell and Graves (2008)	<i>Kajikia audax</i>	PAC: Taiwan (24)	Sequenciamento D-loop (819 pb)	$H = 79$ $h = 0,998 - 1,000$ $\pi = 0,039 - 0,054$ $\Phi (PN/PS) = 0,034 (p < 0,0001)$
		Japão (92)		
		Austrália (97)	Microsatélites (5 loci)	$A = 7 - 27$ $Ar = 6,98 - 24,16$ $H_o = 0,67 - 0,97$ $He = 0,73 - 0,96$ $F_{ST} (localidades) = 0,013 (p < 0,001)$ *Revelou a existência de pops. discretamente diferentes no Pacífico, suportando a dispersão limitada e preferência por diferentes áreas de reprodução.
		Hawaii (48)		
		México (32)		
		Califórnia (39)		
		Equador (39)		

Continuação

Purcell and Edmands (2011)	<i>Kajikia audax</i>	Japão (116)	Microsatélites (12 loci)	$A = 2 - 49$
		Hawaii (539)		$A_r = 2,4 - 7$
		Califórnia (66)		$H_o = 0,652 - 0,727$ (não significativo)
		México (239)		$F_{ST} = 0,0002 - 0,034$ ($p < 0,01$)
		América Central (105)		$G_{ST} = 0,0004 - 0,077$
		Nova Zelândia (86)		$H = 18 - 91$
		Austrália (48)	Sequenciamento D-loop (1000 pb)	$h = 0,981 - 0,999$
				$H_{ST} = 0,00493$ ($p < 0,001$)
				$K_{ST} = 0,06995$ ($p < 0,001$)
				*A consistência entre os resultados de estudos independentes suporta fortemente o manejo da espécie para, pelo menos, três estoques claramente delimitados no PAC.
Sorenson et al. (2013)	<i>Makaira nigricans</i>	ATL:	Microsatélites (12 loci)	$A = 23,1$ (ATL); 21,8 (Pacífico)
		Gana (46)		$H_o = 0,907$ (ATL); 0,900 (Pacífico)
		EUA (45)		$He = 0,916$ (ATL); 0,917 (Pacífico)
		Jamaica (51)		EHW: em equilíbrio
		Brasil (45)		F_{ST} (ATL/Pacífico) = 0,0099 ($p < 0,05$)
		PAC:		*A discriminação entre pops. do ATL e PAC fornece maior poder para atribuir a origem de agulhões-azul comercializados.
		Hawaii (44)		
		Austrália (45)		
		Equador (19)		
		México (19)		
Bernard et al. (2014)	<i>Tetrapturus georgii</i>	Atlântico Ocidental	Microsatélites (13 loci)	$A = 17,5$ (N); 14,7 (S)
		Norte (140)		$A_r = 14,3$ (N); 14,6 (S)
		Atlântico Ocidental Sul (58)	Sequenciamento D-loop (580 pb)	$H_o = 0,73$ (N); 0,71 (S)
				$He = 0,74$ (N); 0,72 (S)
				EHW: em equilíbrio
				$F_{ST} = 0,0037$ ($p = 0,05$)
				$D_{EST} = 0,021$ ($p = 0,005$)
				$H = 36$ (N); 37 (S)
				$h = 0,992$ (N); 0,994 (S)
				$\pi = 0,024$ (N e S)
				$\Phi_{ST} = 0,0046$ ($p = 0,24$)
				*Os dois marcadores mostraram resultados controversos.
				*Recomenda-se gerenciamento da espécie como dois estoques, visando evitar reduções drástica e colapso de pops. ainda desconhecidas.

Continuação

Lu et al. (2015)	<i>Istiophorus platypterus</i>	Pacífico Oriental Norte (37,16) Pacífico Ocidental Norte (39)	Sequenciamento D-loop (307 pb) Microsatélites (5 loci)	$H = 60$ $h = 0,941$ $\pi = 0,0199$ Análise Bayesiana: $K = 2$ (I: Costa Rica, México; II: Taiwan) $\Phi_{ST} = 0,145$ ($p < 0.001$) $A = 4 - 42$ $Ar = 3,642 - 20,726$ Diversidade genica = $0,804 - 0,835$ $H_o = 0,567 - 0,956$ $H_e = 0,553 - 0,972$ $F_{ST} = 0,032$ ($p < 0.001$) *Os dados indicaram que NWP e NEP pertencem a populações distintas. São necessários estudos com amostras mais representativas para que a estrutura pop. da espécie no Pacífico seja melhor entendida.
Williams et al. (2015)	<i>Istiompax indica</i>	Noroeste da Austrália (59) Sudoeste da Austrália (37) Austrália Ocidental (29) Golfo de Carpentaria (17) Taiwan (40)	Microsatélites (18 loci) Sequenciamento D-loop (603 pb)	$A = 2 - 16$ $H_e = 0,11 - 0,85$ $F_{ST} = 0,010$ ($p < 0,05$) Análise Bayesiana: 3 clusters (I, II, III) <hr/> $H = 58$ $h = 0,997$ $\pi = 0,032$ Análises filogenéticas: 3 clados altamente divergentes $\Phi_{ST} = 0,000 - 0,013$ ($p > 0,09$) *Os marcadores mostraram resultados distintos, indicando uma transição histórica de não-estruturação para estruturação pop. *A heterogeneidade genética pode estar relacionada a filopatria reprodutiva. *O gerenciamento deve ser feito como três estoques diferentes.
Chen et al. (2016)	<i>Makaira nigricans</i>	Pacífico (150) Índico (33)	Sequenciamento D-loop e citocromo b (2045 pb)	$H = 179$ $h = 0,998 - 1,000$ $\pi = 0,01 - 0,013$ Φ_{ST} (par-a-par) = $0,0318 - 0,0918$ ($p < 0,0001$) Mismatch: expansão demográfica (≈ 300 e 650 mil anos atrás). *Estoque distintos entre Pacífico e Índico Oriental. A alta variação genética sugere existência de haplótipos únicos que são vulneráveis a altos níveis de captura e podem desaparecer.

Continuação

Rubio-Castro et al. (2016)	<i>Istiophorus platypterus</i>	Mazatlán (81) Colima (28) Acapulco (60) Oaxaca (74) Equador (7)	Sequenciamento D-loop (530 pb)	<p>$H = 7 - 58$ $h = 0,902 - 1,000$ $\pi = 0,0062 - 0,0082$ $\Phi_{ST} = 0,0061$ ($p = 0,029$) Correlação entre distância geográfica e genética. Mismatch: condizente com cenário de expansão populacional (≈ 80 a 250 mil anos atrás). *A pesar dos insights sobre estruturação pop., as diferenças detectadas foram pequenas, portanto, mais estudos são necessários para sustentar decisões de gerenciamento.</p>
Mamoozadeh et al. (2018)	<i>Kajikia albida</i>	EUA (263) Caribe (40) Golfo do México (49) Atlântico Ocidental Central (55) Atlântico Ocidental Sul (39) Atlântico Oriental Norte (33)	Sequenciamento D-loop (875 pb) Microsatélites (24 loci)	<p>$H = 242$ $h = 0,99$ $\pi = 0,031$ $\Phi_{ST} = 0,00190$ ($p = 0,614$) $A = 3 - 35$ $Ar = 9,96 - 10,39$ EHW: em equilíbrio $F_{ST} = 0,00009$ ($p = 0,525$) *Os resultados são consistentes com a existência de um único estoque no ATL.</p>
Mamoozadeh, McDowell e Graves (2018)	<i>Kajikia audax</i>	Índico (46) Pacífico (199)	SNPs (3.916 loci)	<p>$Ar = 1,463 - 1,501$ $Ho = 0,144 - 0,304$ $He = 0,147 - 0,204$ $F_{ST} = 0,0169 - 0,0836$ ($p = 0,000$) *Foram identificadas 5 pops. geneticamente distintas: Índico Ocidental, Oceania, Pacífico Oriental Central, Pacífico Norte (2 pops.). *Ainda são necessárias pesquisas adicionais. Dados não conclusivos.</p>
Mamoozadeh, Graves and McDowell (2019)	<i>Kajikia audax</i>	Índico (46) Pacífico (199)	SNPs (4.206 loci)	<p>5 grandes grupos: Índico Ocidental; Índico Oriental; Pacífico Sul Ocidental; Pacífico Norte; Pacífico Centro-Oriental. EHW: todos os loci em equilíbrio. $He = 0,148 - 0,199$ $Ho = 0,143 - 0,293$ $F_{IS} = -0,404 - 0,068$ F_{ST} (por localização) = $0,0137 - 0,0819$ ($p < 0,001$) F_{ST} (temporal) = $0,0029$ ($p = 0,002$); $0,0042$ ($p = 0,000$) Os SNPs também foram eficientes em atribuir indivíduos às populações de origem. *Os resultados valiosos para melhorar estratégias de conservação e manejo para a espécie. Trabalhos com amostragens ainda mais representativas são necessários para identificar limites regionais dos estoques e se os limites são sazonalmente dinâmicos.</p>

Continuação

Williams et al. (2020)	<i>Makaira nigricans</i>	PAC: Pacífico Centro-Oriental (44) Mar de Corais (30) China (12)	Microsatélites (17 <i>loci</i>) <hr/> SNPs (6204 <i>loci</i>)	A = 2 – 18 He = 0,03 – 0,97 $F_{ST} = -0,0038 - 0,0008$ ($p > 0,05$) <hr/> $F_{ST} = 0,003$ ($p > 0,05$) Análise Bayesiana: $K = 1$ (ambos marcadores) *A ausência de diferenciação genética suporta o gerenciamento de apenas um estoque de agulhão-azul no Pacífico. Para melhor entender as dinâmicas populacionais da espécie são necessários estudos mais abrangentes.
------------------------	--------------------------	--	--	--

ANEXOS

Anexo A. Documento para autorização de acesso da aluna Suhaila K. K. Jaser no setor de distribuição de pescado da CEAGESP.



Companhia de Entrepósitos e
Armazéns Gerais de São Paulo
Av. Dr. Gastão Vidigal, 1946
05316-900 - Vila Leopoldina - São Paulo - SP
Telefone: (11) 3643 3700
ceagesp@ceagesp.gov.br - www.ceagesp.gov.br

Ofício nº 169/2017/DEPEC

São Paulo, 02 de março de 2017.

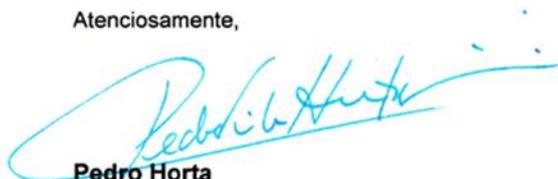
À
Universidade de Mogi das Cruzes – UMC
A/C: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Laboratório de Genética de Organismos
Aquáticos e Aquicultura - LAGOAA
Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200
08780-911 – Mogi das Cruzes - SP

Assunto: Autorização de acesso ao Setor de Pescados da aluna Suhaila Karim Khalil Jaser para realização de coleta de amostras e análise genética de agulhões e espadartes, com a supervisão dos trabalhos pela equipe de inspeção da COVISA coordenada pela Dra. Andréa Barbosa Boanova.

Prezado Senhor,

Em atenção ao requerido na correspondência protocolada sob nº 333 em 13 de fevereiro de 2017, informamos, respaldado por parecer operacional da área do Frigorífico de São Paulo, o **deferimento** do pedido supracitado.

Atenciosamente,


Pedro Horta
Gerente do DEPEC
Departamento de Entrepósito da Capital

c.c.: FRISP
PH/NWR.clara

OM-P-057

Anexo B. Comprovante de submissão do manuscrito referente ao capítulo 3 desta tese para a revista Conservation Genetics Resources (COGR).

Conservation Genetics Resources

Assessing illegal fishing and trade of Atlantic billfish and swordfish by DNA-based identification

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	COGR-D-20-00149	
Full Title:	Assessing illegal fishing and trade of Atlantic billfish and swordfish by DNA-based identification	
Article Type:	Methods and Resources Article	
Keywords:	forensic genetics; marlin; Istiophoridae; PCR-RFLP; multiplex PCR	
Corresponding Author:	Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Ph.D. University of Mogi das Cruzes Mogi das Cruzes, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Mogi das Cruzes	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Suhaila Karim Khalil Jaser, M.Sc.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Suhaila Karim Khalil Jaser, M.Sc. Rodrigo Rodrigues Domingues, PhD Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPESP (2015/23883-0) CNPq (304662/2017-8)	Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Abstract:	<p>Due to the morphological similarity between some billfish species, the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT) recommends the use of molecular tools to identify billfish at the species-level to properly manage this imperiled group. In this study, swordfish and billfish species-specific identification was carried out by using PCR-RFLP and multiplex PCR. Samples were obtained during landings of the tuna fleet at the Public Fisheries Port of Santos (PFPS) and in the General Warehouse Company of São Paulo (CEAGESP). A total of 87 samples from PFPS were identified: <i>Kajikia albida</i>, <i>Tetrapturus georgii</i>, <i>Tetrapturus pfluegeri</i>, <i>Makaira nigricans</i>, and <i>Istiophorus platypterus</i>. In the CEAGESP, 432 individuals were collected, and three species were detected: <i>Xiphias gladius</i>, <i>I. platypterus</i> and <i>T. georgii</i>. Some samples presented an unknown band pattern for PCR-RFLP, which were sequenced and identified as <i>X. gladius</i>. These findings demonstrate that billfishes protected by law are being caught by industrial fisheries, but they are not traded in CEAGESP. Once Brazil is an ICCAT signatory country, we advocate for onboard and landings continuous monitoring using molecular identification tools in accordance with ICCAT recommendations. Thus, we provided evidence that DNA-based methods are efficient in overcoming the billfish misidentification in Atlantic.</p>	
Suggested Reviewers:	<p>Eric Hallerman, Phd Full Professor, Virginia Tech ehallerm@vt.edu Dr. Hallerman has a large experience on genetics applied to conservation of fish resources.</p> <p>Freddy Arocha, Phd Full Professor, University of Oriente Faculty of Natural Sciences: Universidad de</p>	