

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

ALINE DOMINISKI DE OLIVEIRA

FILOGEOGRAFIA DO TUBARÃO-CROCODILO
***PSEUDOCARCHARIAS KAMOHARAI* ENTRE OS OCEANOS**
ATLÂNTICO E ÍNDICO

SANTOS/SP

2021

ALINE DOMINISKI DE OLIVEIRA

**FILOGEOGRAFIA DO TUBARÃO-CROCODILO
PSEUDOCARCHARIAS KAMOHARAI ENTRE OS OCEANOS
ATLÂNTICO E ÍNDICO**

Dissertação apresentada a
Universidade Santa Cecília
como parte dos requisitos para
obtenção de título de Mestre em
Ecologia, sob a orientação do
Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva
Ferrette.

SANTOS/SP

2021

597.31 Oliveira, Aline Dominiski de.
045f Filogeografia do tubarão-crocodilo *pseudocarcharias*
kamoharai entre os oceanos Atlântico e Índico. /
Aline Dominiski De Oliveira.
2021.
63 f.

Corientador: Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva Ferrette

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Santa Cecília,
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Santos, SP, 2021.

1. *Pseudocarcharias kamoharai*. 2. Lamniformes. 3. Região
controle do DNA mitocondrial. 4. Linhagens mitocondriais.
I. Ferrette, Bruno Lopes da Silva. II. Filogeografia do
tubarão-crocodilo *pseudocarcharias kamoharai* entre os
oceanos Atlântico e Índico.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, meu pai, minhas filhas que tiveram paciência para suportar minha ausência; minha melhor amiga, e ao meu orientador que estiveram sempre ao meu lado me apoiando.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva Ferrete, que teve todo cuidado em me apoiar em cada passo, sendo muito presente e essencial para a realização desse trabalho, pelo incentivo nos bons e principalmente nos maus momentos, pela sua amizade e confiança, e toda sua paciência. Sem você, nada deste trabalho seria possível.

Gostaria de agradecer a todos os Professores que participaram do meu Mestrado direta ou indiretamente, pela oportunidade de poder aprender e trabalhar ao lado de cada um.

Um agradecimento especial aos professores em que estagiei em suas aulas, aos professores que participaram da minha qualificação, que me ajudaram muito em melhorar meu trabalho, e a Professora/Coordenadora do Mestrado, Ursulla Pereira Souza, por todo apoio a mim dedicado.

Um agradecimento mais que especial, a todos os funcionários da Universidade, “tios e tias” da portaria, elevador, cantina, limpeza que foram praticamente uma família nessa caminhada, como também à Sandra e a Imaculada da Secretaria que sem elas nada disso seria possível.

Eu gostaria de agradecer a minha família, aos meus pais, Aristides e Ivani, e principalmente as minhas filhas, Aruana e Analua, e agradecer também a minha melhor amiga, Larissa, que me ajudou e me apoiou em toda minha trajetória e aos meus queridos amigos Juliana e Álison, pelos bons momentos proporcionados ao longo de meu mestrado e que foi essencial para este longo percurso.

EPÍGRAFE

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

RESUMO

A Filogeografia é a ciência que estuda o arranjo espacial da diversidade genética e das linhagens divergentes de indivíduos da mesma espécie ou de espécies relacionadas. O tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* é uma espécie epi- e mesopelágica, altamente migratória, capturada regularmente como captura acessória em pescarias de espinhel e classificada como “Pouco Preocupante” pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. A espécie forma uma população panmítica entre os oceanos Atlântico e Índico, entretanto a história demográfica de *P. kamoharai* nunca foi avaliada e pode ser que existam linhagens divergentes ou unidades de manejo diferenciadas. Desta forma, o presente estudo visa analisar a filogeografia da espécie entre os oceanos Atlântico e Índico através de sequências da região controle do DNA mitocondrial. Os resultados identificaram 22 novos haplótipos para a espécie, totalizando 53 haplótipos com alta diversidade haplotípica ($h_d = 0.901 \pm 0.012$) e moderada diversidade nucleotídica ($\pi = 0.00342 \pm 0.00016$). Apesar dos novos haplótipos, nem a AMOVA ($\Phi_{ST} = -0.00398, p > 0,05$), nem os agrupamentos espaciais identificaram a existência de estrutura genética populacional. Entretanto, a inferência filogenética Bayesiana evidenciou um evento coalescente há 14,09 milhões de anos durante o Mioceno Médio, possivelmente associado ao fechamento do Mar de Tethys e a formação do Istmo do Panamá, que originou duas linhagens mitocondriais divergentes e com grande diferenciação genética ($\Phi_{ST} = 0.37373, p = 0.00001$). Além disso, ambas as linhagens apresentaram independência demográfica e evidenciaram expansão demográfica e espacial durante os ciclos glaciais e interglaciais do Pleistoceno. O fluxo gênico histórico também evidenciou a existência de uma população panmítica, provavelmente ambas as linhagens ficaram isoladas por um período considerável, mas após o restabelecimento dos níveis oceânicos, tiveram contato secundário e, atualmente, ambas são simpátricas entre as duas bacias oceânicas estudadas.

Palavras-Chave: *Pseudocarcharias kamoharai*. Lamniformes. Região controle do DNA mitocondrial. Linhagens mitocondriais. Ciclos glaciais e interglaciais.

ABSTRACT

Phylogeography of the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai* between the Atlantic and Indian oceans

Phylogeography studies the spatial arrangement of genetic diversity and divergent lineages of populations or related species. The crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai* is an epi and mesopelagic species, highly migratory, caught regularly as bycatch in longline fisheries and classified as “Least Concern” by the Red List of the International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. The species forms a panmictic population between the Atlantic and Indian oceans, however, the demographic history of *P. kamoharai* has never been evaluated and there may be divergent lineages or different management units. Thus, the present study aims to evaluate the phylogeography of the species between the Atlantic and Indian oceans through sequences of the mitochondrial DNA control region. The results found 22 new haplotypes, totaling 53 haplotypes with high haplotypic diversity ($h_d = 0.901 \pm 0.012$) and moderate nucleotide diversity ($\pi = 0.00342 \pm 0.00016$). Despite the new haplotypes, neither AMOVA ($\Phi_{ST} = -0.00398$, $p > 0.05$), nor the spatial clustering found the existence of genetic population structure. However, Bayesian phylogenetic inference showed a coalescent event at 14.09 million years ago during the Middle Miocene, possibly associated with the closure of the Tethys' Sea and the formation of the Panama Isthmus, which originated two divergent mitochondrial lineages with high genetic differentiation ($\Phi_{ST} = 0.37373$, $p = 0.00001$). In addition, both lineages showed demographic independence evidenced by demographic and spatial expansion during the glacial and interglacial cycles of the Pleistocene. The historical gene flow also showed the existence of a panmictic population, probably both lineages were isolated for a considerable period, but after the reestablishment of ocean levels, they had secondary contact and, currently, both are sympatric between the two ocean basins.

Keywords: *Pseudocarcharias kamoharai*. Lamniformes. Control region of mitochondrial DNA. Mitochondrial lineages. Glacial and interglacial cycles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Proporção das espécies de cada ordem da classe de vertebrados listados na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais.....	19
Figura 2.	Proporção das espécies de cada ordem da classe Chondrichthyes listados na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais.....	20
Figura 3.	Quantidade de toneladas reportada de Chondrichthyes por ordem taxonômica capturados a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) entre 1950–2018.....	21
Figura 4.	Representação das famílias existentes da ordem Lamniformes.....	22
Figura 5.	Exemplar do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> (Matsubara 1936).....	24
Figura 6.	Distribuição conhecida do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> (Matsubara 1936).....	25
Figura 7.	Amostragem dos espécimes de tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> nos oceanos Atlântico e Índico.....	31
Figura 8.	Rede de haplótipos da região controle do DNA mitocondrial do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	38
Figura 9.	Mapa de probabilidades posteriores do agrupamento espacial Bayesiana de populações (K) do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	39
Figura 10.	Inferência filogenética Bayesiana dos haplótipos da região controle do DNA mitocondrial do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	40
Figura 11.	Análise de <i>Mismatch Distributions</i> do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> e das duas linhagens mitocondriais.....	42
Figura 12.	Análise <i>Bayesian skyline</i> da população panmítica e das duas linhagens mitocondriais do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	43
Figura 13.	Representação das rotas migratórias históricas do tubarão <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> entre os oceanos Atlântico e Índico.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diversidade genética do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> entre os oceanos Atlântico e Índico.....	36
Tabela 2.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os grupos amostrais do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	37
Tabela 3.	Φ_{ST} por pares entre as regiões amostras abaixo da diagonal e Φ_{ST} linearizado par a par acima da diagonal.....	37
Tabela 4.	Tabela de Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as duas linhagens mitocondriais do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	40
Tabela 5.	Análise de <i>Mismatch Distributions</i> e Testes de Neutralidade do tubarão-crocodilo <i>Pseudocarcharias kamoharai</i>	42
Tabela 6.	Seleção do melhor modelo de migração das análises do MIGRATE-N através de <i>Bayes Factor</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

~	- Aproximadamente
π	- Diversidade Nucleotídica
Φ_{ST}	- Índice de Fixação análogo ao F de Wright
α	- Valor de Alpha
μ	- Taxa de mutação
τ	- Tempo de Geração
<i>p-inv</i>	- Sítios invariáveis
Θ	- Tamanho Populacional em Escala de Mutação Histórica
θ_0	- Tamanho Populacional Antes da Expansão
θ_1	- Tamanho Populacional Após a Expansão
A	- Nucleotídeo Adenina
AMOVA	- Análise de Variância Molecular
C	- Nucleotídeo Citosina
CR	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ criticamente em Perigo”
DD	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Dados Deficientes”
EM	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Em Perigo”
EW	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Extinto”
EX	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Extinto na Natureza”
FAO	- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
G	- Nucleotídeo Guanina
GOG	- Golfo da Guiné
<i>h</i>	- Haplótipos
<i>h_d</i>	- Diversidade Haplotípica
H _{RI}	- Índice de Irregularidade de Harpending
IUCN	- Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
IUU	- <i>Illegal, unreported and unregulated</i>
K	- Número de Clusters
L1	- Linhagem Mitocondrial 1
L2	- Linhagem Mitocondrial 2
LC	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Menor Preocupação”
LR/lc	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Menor Risco/Dependente de Conservação”
LR/nt	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “ Menor risco/Quase Ameaçado”
m	- Metros
<i>M</i>	- Taxa de Migração em Escala de Mutação Histórica
Mia	- Milhões de Anos Atrás
MCMC	- Cadeias de Markov Monte Carlo
mtCR	- Região Controle do DNA Mitocodrial
mtDNA	- DNA Mitocondrial
MCO	- Mioceno Climático Ótimo
MPWP	- Período Quente Médio do Piacenza
MUSCLE	- MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation

n	- Número de Indivíduos
N_e	- Tamanho Efetivo Populacional
NECA	- Atlântico Central Nordeste
NT	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “Quase Ameaçado”
pb	- Pares de Bases
ppm	- Partes por Milhão
s	- Sítios Polimórficos
SEA	- Atlântico Sudoeste
SNPs	- <i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
SSD	- Soma dos Desvios de Qui-Quadrados
SWA	- Sudoeste Atlântico
SWI	- Sudoeste Índico
t	- Toneladas
T	- Tempo de Expansão em unidades de Tempo Mutacional
T	- Nucleotídeo Timina
TCMM	- Transição Climática do Mioceno Médio
TPMI	- Transição do Pleistoceno Médio-Inferior
VU	- Categoria de Espécies Ameaçadas da IUCN “Vulnerável”
WEA	- Atlântico Equatorial Oeste

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais dos Chondrichthyes.....	1
1.2. <i>Pseudocarcharias kamoharai</i> (Matsubara, 1936).....	5
1.3. Filogeografia.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Amostragem.....	12
2.2. Diversidade genética e estrutura genética populacional.....	13
2.3. Inferência filogenética Bayesiana.....	14
2.4. Demografia e fluxo gênico históricos.....	15
3. RESULTADOS.....	18
3.1. Diversidade genética e estrutura genética populacional.....	18
3.2. Inferência filogenética Bayesiana.....	21
3.3. Demografia e fluxo gênico históricos.....	23
4. DISCUSSÃO.....	28
4.1. Diversidade genética e estrutura genética populacional.....	28
4.2. Filogeografia.....	29
5. CONCLUSÃO.....	33
6. TRABALHO SUBMETIDO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXO.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais dos Chondrichthyes

Os vertebrados mandibulados (Gnathostomata) compreendem mais de 99% das espécies de vertebrados vivos e a divisão mais profunda na filogenia dos Gnathostomata é entre as classes Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras) e Osteichthyes (peixes ósseos e tetrápodes). Essa divergência ocorreu durante o Siluriano Superior há pelo menos 423 milhões de anos (Mia) (ZHU *et al.*, 2009). Os primeiros peixes mandibulados são divididos em quatro grandes classes: os antigos representantes das classes Chondrichthyes e Osteichthyes, em conjunto com duas classes extintas, Acanthodii e Placodermi (BRAZEAU e FRIEDMAN, 2015). Os registros mais antigos atribuídos aos Chondrichthyes são do início do Período Siluriano por volta de 443–438 Mia (KARATAJŪTĖ-TALIMAA e PREDTECHENSKYJ, 1995; ZHAO e ZHU, 2010). Entretanto, as evidências mais antigas e universalmente aceitas são substancialmente mais jovens, representados por fósseis do Devoniano Inferior há 400 Mia (BRAZEAU e FRIEDMAN, 2015).

Os peixes cartilaginosos (classe Chondrichthyes) representados pelos tubarões e raias (subclasse Elasmobranchii) e pelas quimeras (subclasse Holocephali) são o grupo de vertebrados mandibulados mais antigos e entre os de maior sucesso evolutivo, tendo sobrevivido as últimas cinco grandes extinções em massa (FRIEDMAN e SALLAN, 2012). Atualmente, estas espécies possuem um importantíssimo papel ecológico de predadores de topo e de mesopredadores, principalmente nos ecossistemas marinhos, onde geralmente são os mais abrangentes predadores (FERRETTI *et al.*, 2010; BORNATOWSKI *et al.*, 2014; HEUPEL *et al.*, 2014; ROFF *et al.*, 2016).

As últimas avaliações sobre a biodiversidade de peixes cartilaginosos totalizaram 1212 espécies, o que inclui nove ordens, 34 famílias, 105 gêneros e 517 espécies de tubarões; quatro ordens, 27 famílias, 104 gêneros e 646 espécies de raias; uma ordem, três famílias, seis gêneros e 49 espécies de quimeras (LAST *et al.*, 2016a,b,c; WEIGMANN, 2016; 2017). No Brasil, o último levantamento registrou 165 espécies; seis ordens, 22 famílias, 43 gêneros e 89 espécies de tubarões; cinco ordens, 11 famílias, 32 gêneros e 70 espécies de raias e uma ordem, três famílias,

quatro gêneros e seis espécies de quimeras (ROSA e GADIG, 2014).

Entretanto, apesar de sua resiliência histórica e importância ecológica, atualmente os Chondrichthyes são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados de extinção (DULVY *et al.*, 2014) (Figura 1), pois 93,56% das espécies descritas estão listadas na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) e muitas espécies ainda não possuem sequer dados biológicos para as classificarem de modo apropriado. Deste total, 19,13% das espécies encontram-se nas categorias de espécies ameaçadas de extinção, “Vulnerável”, “Em Perigo” e “Criticamente em Perigo”, enquanto 37,03% são classificadas como “Dados Deficientes” (IUCN, 2020) (Figura 2).

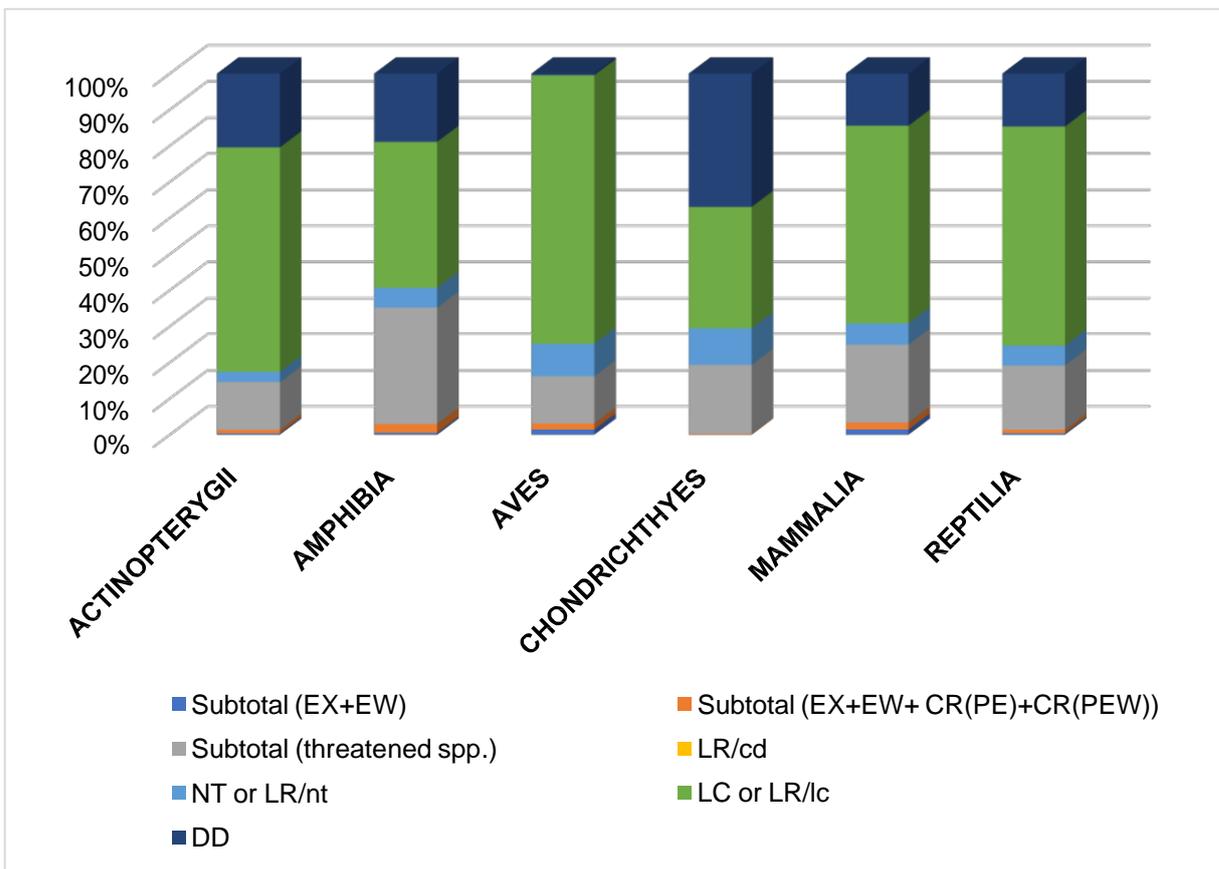


Figura 1. Proporção das espécies de cada ordem da classe de vertebrados listados na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Categorias da lista vermelha da IUCN: EX - Extinto, EW - Extinto na natureza, CR - Criticamente em perigo, LR / lc - Menor risco / dependente de conservação, NT - Quase ameaçado (inclui LR / nt - Menor risco / quase ameaçado), DD – Dados Deficientes, LC - Menor preocupação (inclui LR / lc - Menor risco / menor preocupação).

Fonte: <https://www.iucnredlist.org/statistics>

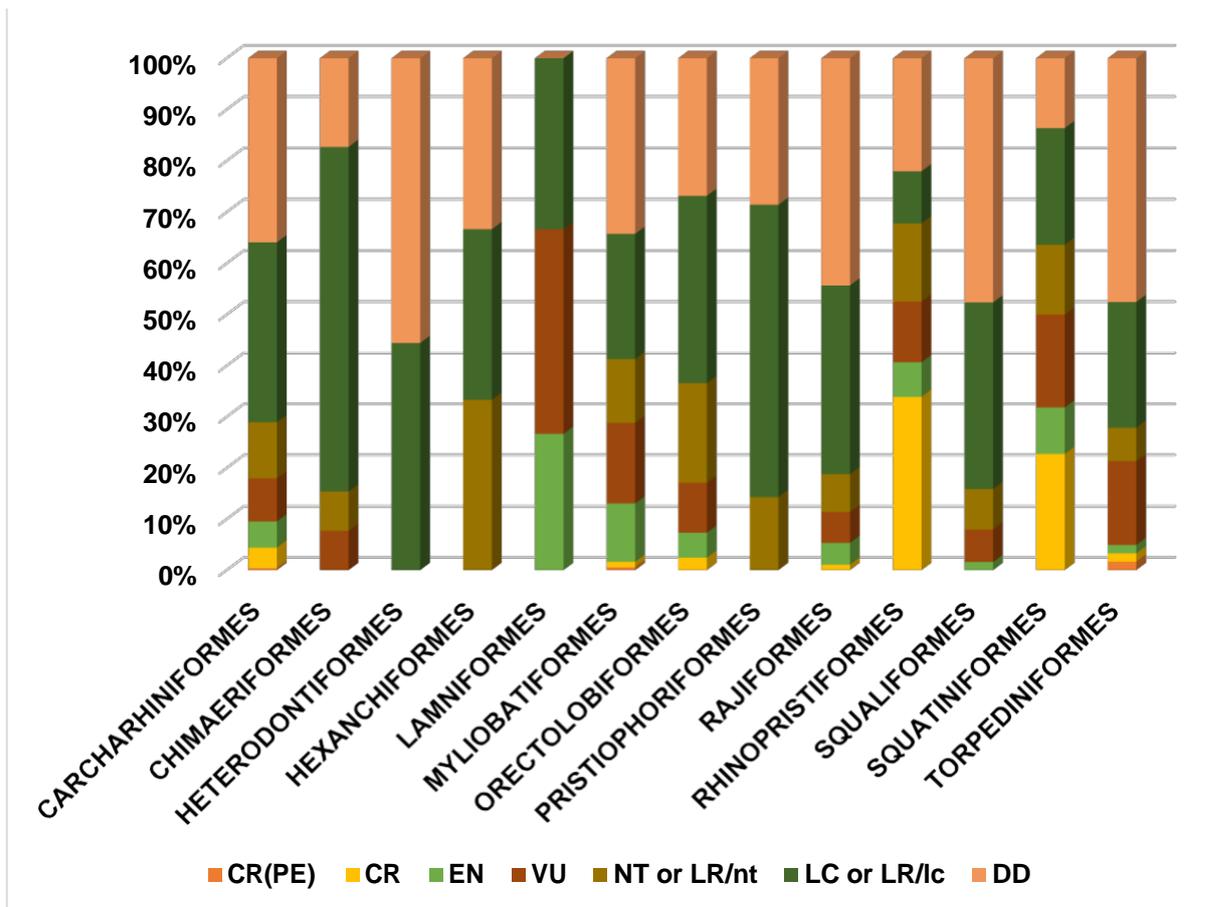


Figura 2. Proporção das espécies de cada ordem da classe Chondrichthyes listados na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Categorias da lista vermelha da IUCN: CR - Criticamente em perigo, EN - Em perigo, VU - Vulnerável, LR / lc - Menor risco / dependente de conservação, NT - Quase ameaçado (inclui LR / nt - Menor risco / quase ameaçado), DD – Dados Deficiência, LC - Menor preocupação (inclui LR / lc - Menor risco / menor preocupação).

Fonte: <https://www.iucnredlist.org/statistics>

As maiores ameaças aos Chondrichthyes atualmente são a sobrepesca (STEVENS *et al.*, 2000; OLIVER *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2019), a degradação de habitats e as mudanças climáticas (LOTZE *et al.*, 2006; FERRETTI *et al.*, 2010; CHEUNG *et al.*, 2013a,b; ROSA *et al.*, 2014, 2017; ALOMAR e DEUDERO, 2017; COLMENERO *et al.*, 2017; LAM *et al.*, 2020). Apesar disso, a atividade pesqueira insustentável ainda é a maior ameaça a estas espécies. As capturas globais de Chondrichthyes aumentaram gradativamente até atingir um pico em 2013 com a captura reportada de 523.768 toneladas (t) pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (Figura 3).

Para agravar este cenário, as quantidades das capturas reportadas à FAO podem estar subestimadas e, na verdade, estas capturas podem ser 50% maiores e estar declinando de uma forma muito mais intensa (PAULY e ZELLER, 2016), além

do fato de muitas espécies sofrerem com a captura acessória ou serem descartadas (OLIVER *et al.*, 2015; ZELLER *et al.*, 2018; FERRETTE *et al.*, 2019a).

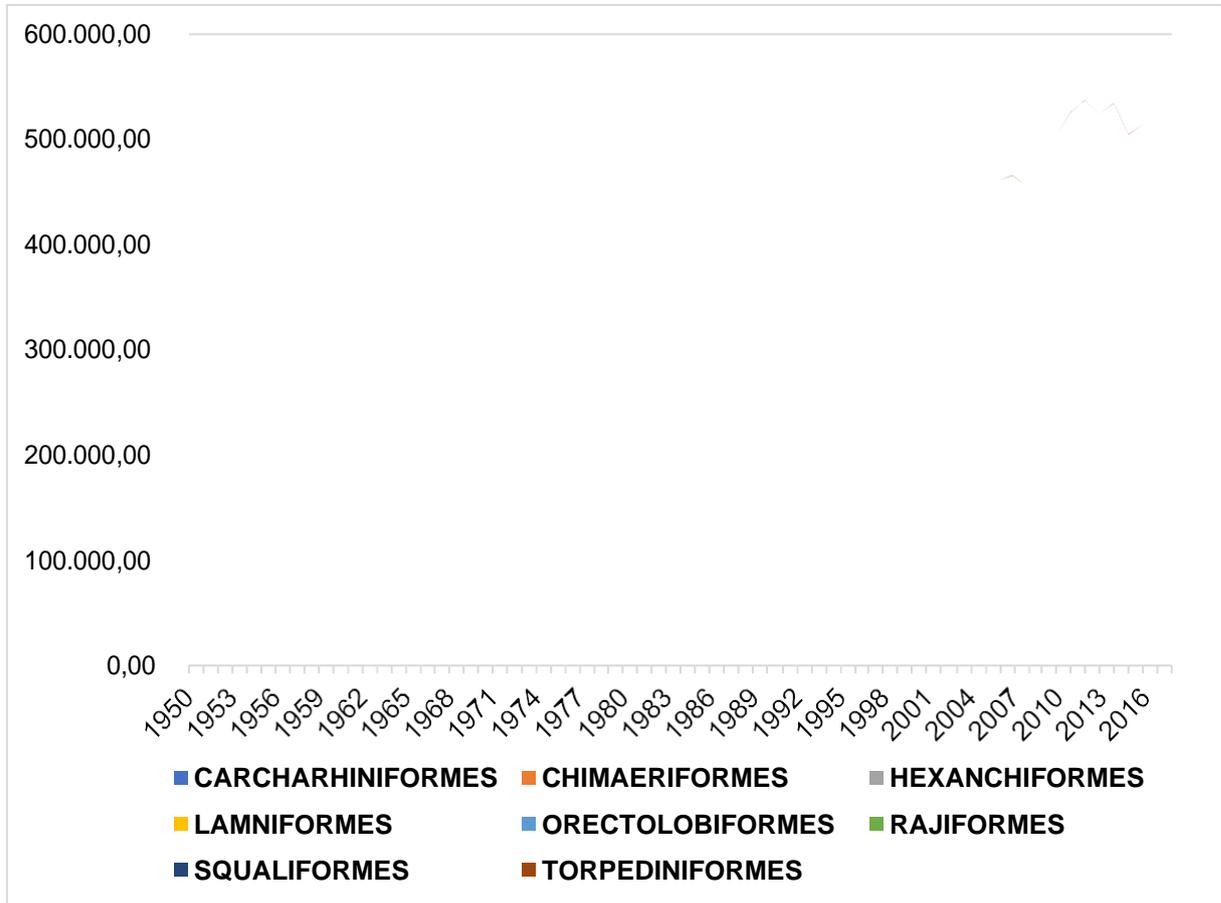


Figura 3. Quantidade de toneladas reportada de Chondrichthyes por ordem taxonômica capturados à Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) entre 1950–2018.

Fonte: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>

A captura de Chondrichthyes, principalmente de tubarões e raias, foi impulsionada pela alta demanda de nadadeiras de tubarões e raias pelo grande desenvolvimento da economia asiática, que resultou em uma alta valorização dos produtos oriundos destas espécies (CLARKE, 2004). A grande demanda por “alimentos de luxo” pela cultura asiática, associada aos altos valores comerciais destes produtos desencadeou a captura indiscriminada destas espécies incentivando a pesca ilegal, não reportada e não regulamentada (do inglês *illegal, unreported and unregulated (IUU) fisheries*) e também a uma prática ilegal em diversos países, inclusive no Brasil, o *finning*, que consiste na captura de tubarões e raias para a retirada de suas nadadeiras e o posterior descarte do animal, que muitas vezes ainda estão vivos no momento do descarte (JAITEH *et al.*, 2017; SHEA e TO, 2017).

As pescarias IUU e o *finning* para suprir a demanda por nadadeiras de tubarão têm ocasionado um grande esforço pesqueiro sobre os tubarões e raias, inclusive ocasionando a captura de espécies ameaçadas de extinção e protegidas por lei em diferentes países do mundo (HOLMES *et al.*, 2009; STEINKE *et al.*, 2017; FIELDS *et al.*, 2018; FERRETTE *et al.*, 2019b).

Por estes motivos é importante que estudos científicos, das mais diferentes vertentes, sejam realizados, a fim de se gerar informações biológicas para tubarões e raias tanto para as espécies ameaçadas, quanto para as espécies que são deficientes de dados para uma classificação adequada em relação ao seu verdadeiro status de conservação e se conheçam melhor suas principais ameaças (BLAND *et al.*, 2015, 2017).

1.2. *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara, 1936)

O registro fóssil da ordem Lamniformes remonta ao Cretáceo Inferior há ~140 milhões de anos e há indícios de que eles eram mais diversos durante o Cretáceo Médio e Superior (UNDERWOOD, 2006; GUINOT e CAVIN, 2016). Atualmente, a ordem é representada por 7 famílias (Figura 4) e apenas 15 espécies, das quais 4 são monoespecíficas (Cetorhinidae, Megachasmidae, Mitsukurinidae, Pseudocarchariidae) (EBERT *et al.*, 2013; WEIGMANN, 2016).

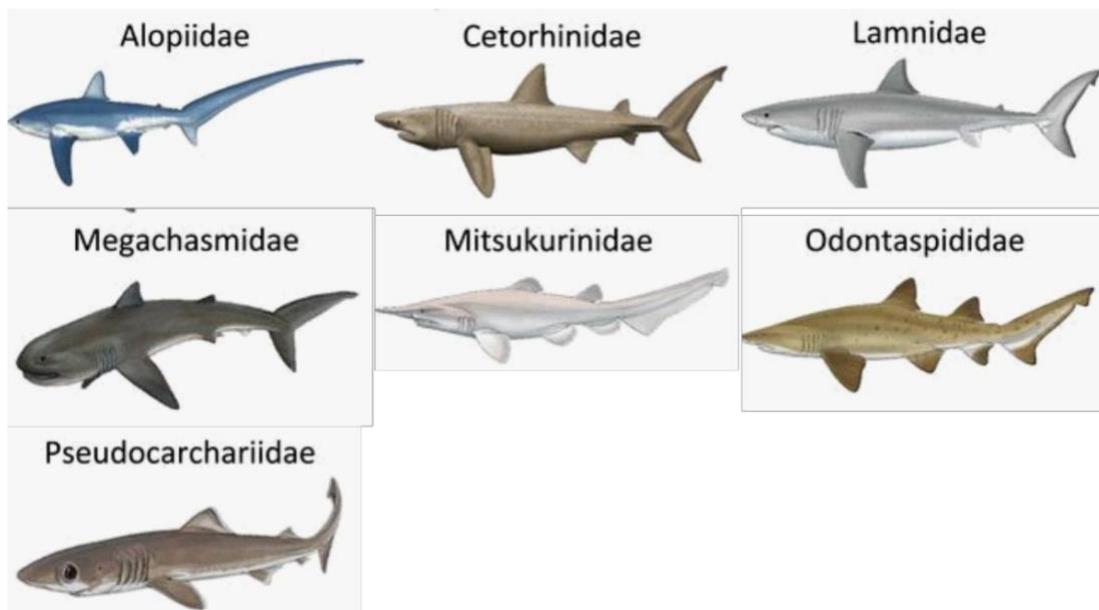


Figura 4. Representação das famílias existentes da ordem Lamniformes.
Fonte: CONDAMINE *et al.* (2019).

A ordem Lamniformes inclui algumas das espécies de tubarão mais icônicas e

conhecidas, como o grande tubarão-branco *Carcharodon carcharias* e o tubarão megalodon *Otodus megalodon*, que podia atingir tamanhos de até 16 metros (m) de comprimento total e que se extinguiu provavelmente há 3,51 Mia durante o Plioceno Inferior (BOESSENECKER *et al.*, 2019; SHIMADA, 2019; COOPER *et al.*, 2020), bem como representantes mais incomuns como o tubarão-duende *Mitsukurina owstoni* e o tubarão-boca-grande *Megascasma pelagios*.

O tamanho do corpo das espécies atuais pode variar de em torno de 1 m para o tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* a 8 m para o tubarão-peregrino *Cetorhinus maximus*. Estas espécies são principalmente pelágicas, de alto-mar, entretanto algumas são mais nectobentônicas, como o cação-mangona *Carcharias taurus* e podem ser encontrados em diferentes profundidades, desde as águas costeiras até a zona batipelágica de até 1.300 m de profundidade. Sua dieta é diversa, inclui predadores carnívoros de pequeno a médio porte a grandes predadores de topo de cadeia alimentar, como o *C. carcharias*, mas também filtradores como *C. maximus* e *M. pelagios* (CONDAMINE *et al.*, 2019).

A baixa diversidade, o baixo número de espécies por família e a forte disparidade morfológica e ecológica têm sido frequentemente usados para caracterizar as espécies dos Lamniformes vivos como representantes de um clado que já foi especioso e, subsequentemente, experimentou um declínio em sua diversidade durante sua história evolutiva (GUINOT e CAVIN, 2016; GUINOT e CARRILLO-BRICENO, 2018). Entretanto, a influência em sua dinâmica de diversificação e seu declínio são desconhecidos, mas há indícios de que tenham relação com fatores bióticos, como temperatura (GUINOT e CAVIN, 2016) ou com a extinção do Cretáceo-Paleogeno há 65 Mia e subsequente preenchimento de seus antigos nichos ecológicos por tubarões da ordem Carcharhiniformes (KRIWET e BENTON, 2004; FRIEDMAN e SALLAN, 2012; BAZZI *et al.*, 2018).

Entre os Lamniformes, o tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara 1936) (Figura 5) possui um registro fóssil desde o início do Período Mioceno há 23,03 Mia (CAPPETTA, 2012), enquanto a família Pseudocarchariidae pode estar presente nos ambientes marinhos desde o Período Cretáceo, baseado em estudos filogenéticos (MARTIN *et al.*, 2002; HEINICKE *et al.*, 2009).



Figura 5. Exemplar do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara 1936).

Fonte:

http://www.fpir.noaa.gov/Graphics/OBS/obs_sharks/obs_crocodile_sharks/obs_crocodile_shark3.jpg

O *P. kamoharai* é uma espécie epi- e mesopelágica registrada da superfície até profundidades de pelo menos 590 m de distribuição circumtropical (LAST *et al.*, 2009, EBERT *et al.*, 2013; KYNE *et al.*, 2019) (Figura 6), entretanto realiza migrações verticais na coluna d'água permanecendo em águas mais profundas durante o dia e se deslocando em direção à superfície à noite, provavelmente seguindo o deslocamento de suas presas (LAST *et al.*, 2009). Entretanto, apesar de sua ampla distribuição geográfica e longa história geológica, ainda faltam informações biológicas básicas sobre a espécie (ACHEBE *et al.*, 2013).

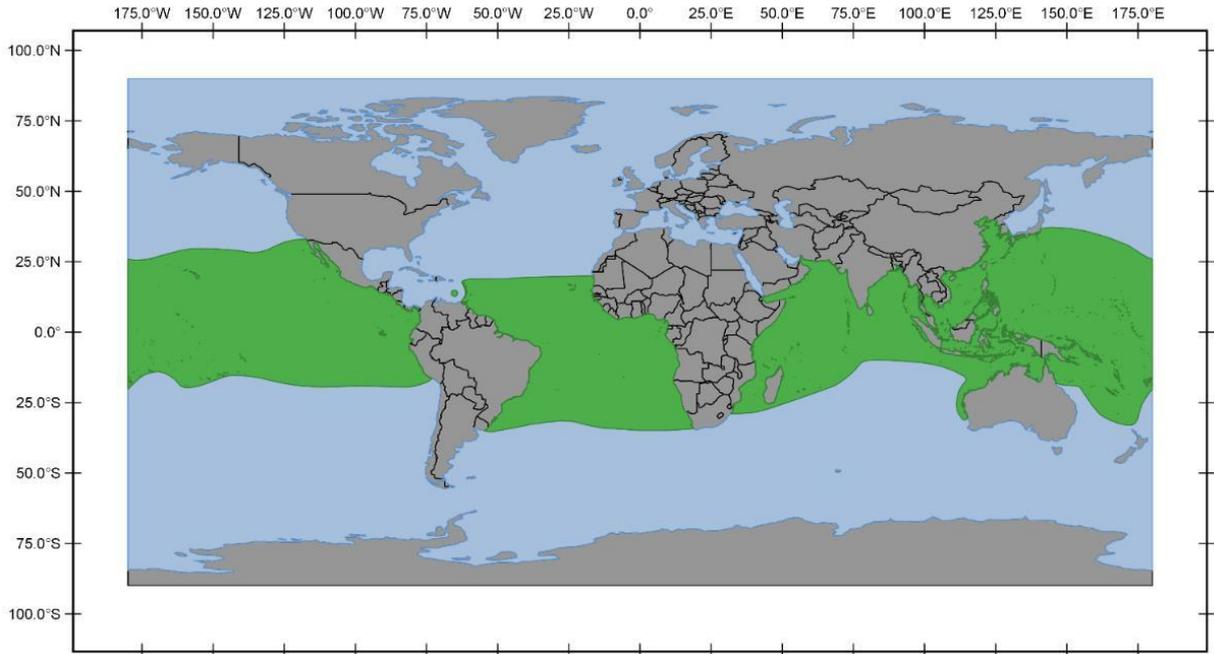


Figura 6. Distribuição conhecida (verde) do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* (Matsubara 1936).
Fonte: KYNE *et al.* (2019).

Esta espécie tem pouco valor comercial e geralmente é descartada, apesar de que pequenas quantidades podem ser retidas a bordo por suas nadadeiras, carne e óleo de fígado (LAST e STEVENS, 2009). A espécie é capturada principalmente como captura acidental (*bycatch*) em pescarias de espinhel pelágico, que tem como espécies-alvo o peixe espada (*Xiphias gladius*) e os atuns (Scombridae), tanto pelas frotas industriais (ROMANOV *et al.*, 2008, COELHO *et al.*, 2012), quanto pelas artesanais (MARTÍNEZ-ORTIZ *et al.*, 2015). Ainda que sua mortalidade após as capturas seja baixa (~13%; COELHO *et al.*, 2012), a espécie é considerada de alto risco ecológico devido à sua alta suscetibilidade à captura e sua baixa produtividade biológica (MURUA *et al.*, 2018).

Atualmente não há medidas de conservação específicas para *P. kamoharai* em vigor e a espécie é classificada como “Pouco Preocupante” (*Least Concern*) na Lista Vermelha da IUCN (KYNE *et al.*, 2019). Ainda assim, o monitoramento da atividade pesqueira, o que inclui a coleta de dados espécie-específicos sobre suas capturas e descartes é necessária para fomentar avaliações populacionais e planos de manejo e conservação. Nos últimos anos, *P. kamoharai* teve um aumento de estudos científicos, principalmente em relação a sua biologia reprodutiva (OLIVEIRA *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2012; LESSA *et al.*, 2016), mas também sua anatomia (ACHEBE *et al.*, 2013) e

até sua estrutura genética populacional foi avaliada entre os oceanos Atlântico e Índico, em que se constatou que a espécie forma um único estoque genético entre estas duas bacias oceânicas compondo uma única população panmítica (FERRETTE *et al.*, 2015).

Apesar do aumento de estudos para a espécie, ainda há muitos aspectos de sua biologia desconhecidos, por isso são necessários estudos para conhecer de maneira apropriada sua biologia, status de conservação e principais ameaçadas, a fim de proporcionar maneiras mais eficientes de se conservar a espécie.

1.3. Filogeografia

A Filogeografia é uma disciplina relativamente nova, que lida com os arranjos espaciais de linhagens genéticas, especialmente dentro e entre espécies estreitamente relacionadas. A palavra filogeografia foi cunhada por Avise *et al.* (1987). Cerca de uma década antes, os cientistas começaram a utilizar o DNA mitocondrial (mtDNA) para investigar como indivíduos coespecíficos estão genealogicamente relacionados através de seus ancestrais compartilhados. Em diferentes espécies, padrões evolutivos foram descobertos nos arranjos espaciais de suas linhagens de mtDNA. Em outras palavras, sua genealogia e biogeografia pareciam estar de alguma forma conectadas (AVISE, 2009).

O DNA mitocondrial em eucariotos, se originou de uma fusão endossimbiótica entre uma proteobactéria e uma célula pré-eucariótica. Ao longo de sua evolução, este genoma citoplasmático perdeu a maior parte de seu DNA para o núcleo e hoje é tipicamente representado em células animais por apenas 37 genes, todos ligados ao longo de uma molécula circular fechada com cerca de 17.000 pares de nucleotídeos de comprimento (AVISE, 2009). Dado o importante papel funcional do mtDNA em células animais, especulava-se de que este genoma deveria evoluir lentamente.

Surpreendentemente, Brown *et al.* (1979) demonstraram que o mtDNA animal acumula substituições de nucleotídeos muitas vezes mais rápido do que o DNA nuclear de cópia única típico. Diversos fatores provavelmente contribuem para o ritmo evolutivo acelerado do mtDNA, como mecanismos relativamente ineficientes de reparo do DNA nas mitocôndrias; o ambiente corrosivo rico em oxigênio, ao qual as moléculas de mtDNA são expostas na organela mitocondrial; um relaxamento das restrições funcionais resultante do fato de que o mtDNA codifica apenas alguns tipos

de polipeptídios e não produz proteínas diretamente envolvidas em sua própria replicação, transcrição ou tradução; e o fato de que o mtDNA não é fortemente ligado às proteínas histonas, que podem restringir as taxas de evolução no DNA nuclear. A rápida taxa evolutiva do mtDNA também se reflete na presença, na maioria das espécies animais, de uma alta variação da sequência de nucleotídeos, que é um pré-requisito para análises filogeográficas (AVISE, 2009).

Embora muitas linhagens genéticas distintas possam coexistir em uma população, todas remontam a ancestrais comuns específicos em algum ponto de sua história evolutiva. Assim, todos os indivíduos existentes são relacionados a este indivíduo por meio de um processo coalescente envolvendo uma linhagem materna. O objetivo nas avaliações filogeográficas é usar árvores genéticas para inferir as forças históricas e contemporâneas que produziram a arquitetura genealógica atual de populações e espécies intimamente relacionadas (AVISE, 2009).

Os estudos filogeográficos normalmente lidam com populações distribuídas por diferentes regiões geográficas. Frequentemente, existem impedimentos comportamentais e/ou físicos à dispersão, contemporânea ou no passado, entre algumas destas populações. Especialmente em espécies com vagilidade limitada, as populações podem ser parcialmente isoladas apenas pela distância. Filtros físicos ou barreiras (como rios para espécies terrestres ou montanhas para espécies de terras baixas) geralmente aumentam os efeitos da vagilidade limitada na promoção da estrutura populacional. Alguns desses filtros podem ser semipermeáveis e permitir trocas ocasionais de linhagens genéticas, mas outros podem bloquear todas as trocas de genes por períodos substanciais durante sua evolução (AVISE, 2009).

Muitos organismos têm alto potencial de dispersão, seja como adultos (por exemplo, insetos alados, pássaros ou peixes marinhos de águas abertas), como juvenis (por exemplo, invertebrados marinhos com longos períodos larvais) ou como gametas (por exemplo, espécies de plantas com pólen disperso pelo vento). Mesmo nessas espécies, as barreiras históricas à dispersão às vezes podem ser intransponíveis (BACON *et al.*, 2015). Por exemplo, o Istmo do Panamá bloqueou o fluxo gênico interoceânico em quase todas as espécies marinhas ao longo de seu longo processo de formação (BACON *et al.*, 2015). Isso se reflete hoje em muitos peixes marinhos, camarões, tartarugas marinhas e outras espécies cujas populações no lado Atlântico vs. Pacífico da ponte terrestre provaram apresentar separações históricas bastante profundas em pesquisas moleculares de mtDNA e outros genes

(BACON *et al.*, 2015).

Por fim, a filogeografia lida com as dimensões espaciais e temporais da genealogia, portanto também pode ser considerada um ramo da biogeografia. Entretanto, ela difere da biogeografia tradicional por seu foco especial em populações coespecíficas e em informações genealógicas explícitas. Deste modo, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a filogeografia do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* entre os oceanos Atlântico e Índico através da análise de sequências da região controle do DNA mitocondrial do estudo de Ferrette *et al.* (2015), a fim de reavaliar seus resultados com novos softwares e abordagens, reavaliar sua estrutura genética populacional, para testar se há ou não estruturação populacional no Oceano Atlântico e entre as bacias oceânicas e propor uma hipótese filogeográfica para espécie, a fim de compreender de que forma se deu sua ocupação no ambiente marinho ao longo do tempo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

A amostragem utilizada foram as sequências da região controle do DNA mitocondrial (*mtCR*) disponibilizadas no *GenBank*[®] (números de acesso KF952742–KF952772) por Ferrette *et al.* (2015) de espécimes de tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamohara*) distribuídos nos oceanos Atlântico e Índico. Estas amostras foram coletadas por observadores de bordo de espinhéis pelágicos comerciais das frotas portuguesas, brasileiras e francesas, que operam em diferentes regiões dos oceanos Atlântico e sudoeste do Índico. Em relação à frota francesa, com base na Ilha da Reunião, as amostras também foram coletadas pelos capitães dos navios e durante um cruzeiro de pesquisa do *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*.

No total foram amostrados 255 indivíduos, dos quais 217 foram coletados em diferentes regiões do Oceano Atlântico, 50 do Atlântico Equatorial Oeste, 73 do Atlântico Equatorial Nordeste, 68 do Golfo da Guiné, 12 do Sudoeste Atlântico e 14 do Atlântico Sudeste e outras 38 amostras do sudoeste do Oceano Índico (Figura 7).

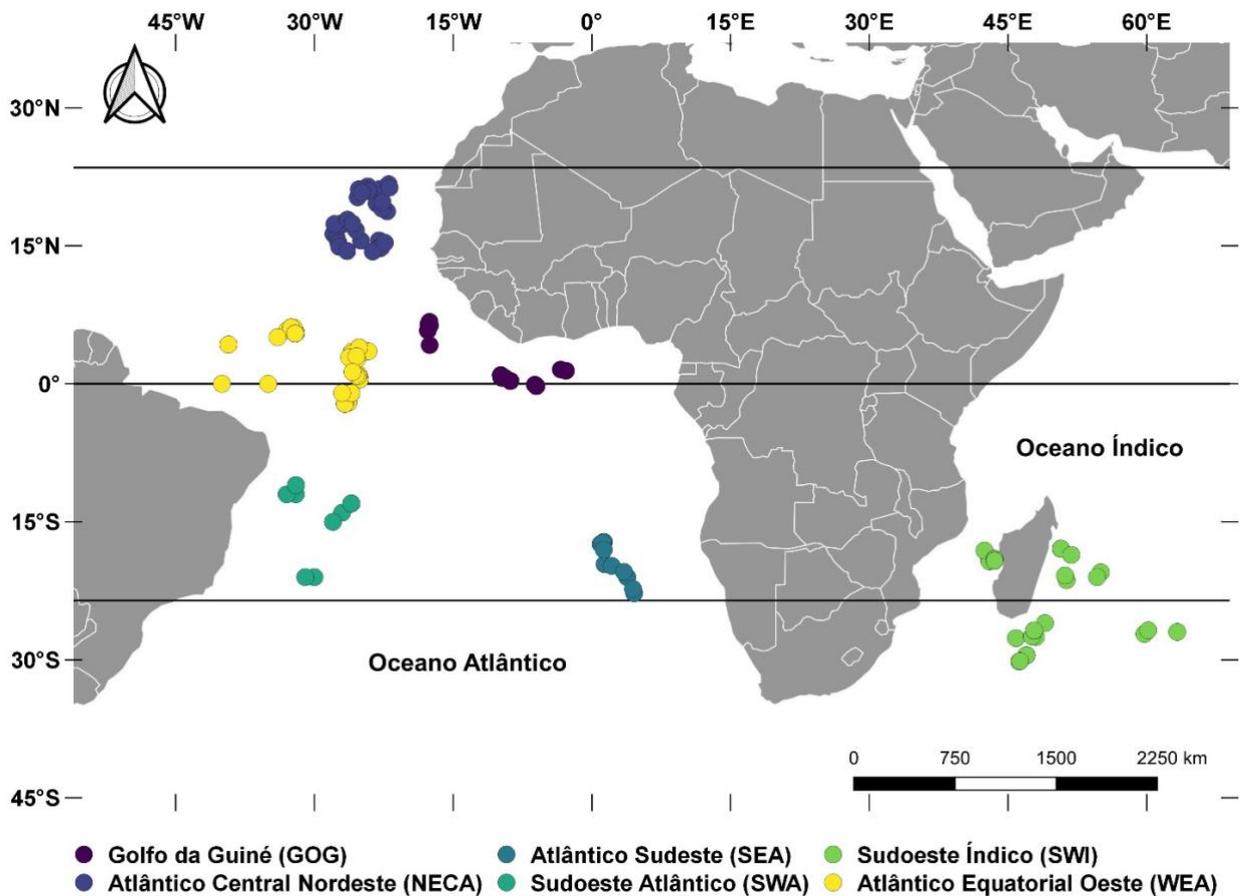


Figura 7. Amostragem dos espécimes de tubarão-crocodilo (*Pseudocarcharias kamoharui*) nos oceanos Atlântico e Índico.

Fonte: FERRETTE *et al.* (2015).

2.2. Diversidade genética e estrutura genética populacional

As sequências da região controle do DNA mitocondrial (*mtCR*) disponibilizadas por Ferrette *et al.* (2015) foram reavaliadas utilizando-se o algoritmo *MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (EDGAR, 2004) no software *Geneious* 11.1.5 (KEARSE *et al.*, 2012). O número de sítios polimórficos (*S*) e de haplótipos (*h*), as diversidades haplotípica (h_d) e nucleotídica (π) foram calculados pelo software *DnaSP* 6.12.03 (ROZAS *et al.*, 2017).

A estrutura genética populacional foi reavaliada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) calculada pelo software *Arlequin* 3.5.2.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) e o cálculo de uma rede de *Median-Joining* (BANDELT *et al.*, 1999) calculada pelo software *PopART* 1.7 (LEIGH e BRYANT, 2015) entre haplótipos. A estimativa dos índices de estruturação genética utiliza informações sobre o conteúdo alélico dos haplótipos, bem como suas frequências (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

As informações sobre as diferenças no conteúdo alélico entre os haplótipos são inseridas como uma matriz de distâncias quadradas euclidianas. A significância dos componentes de covariância associados aos diferentes níveis possíveis de estrutura genética (dentro de indivíduos, dentro de populações, dentro de grupos de populações, entre grupos) é testada usando procedimentos de permutação não paramétrica (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

Além da AMOVA, também foram estimados os Φ_{ST} por pares para todos os pares de populações hipotéticas, bem como diferentes índices de dissimilaridades (distâncias genéticas) entre os pares de populações hipotéticas, como os Φ_{ST} por pares transformados que podem ser usados como distâncias genéticas de curto prazo entre as populações (REYNOLDS *et al.*, 1983; SLATKIN, 1995).

Para inferir a estrutura genética espacial, um método para estimar o número de clusters (K) e os limites espaciais entre eles usando um modelo Bayesiano com o pacote do R v3.6.3 (R CORE TEAM, 2020), Geneland v4.9.2 (GUILLOT *et al.*, 2005; GUILLOT *et al.*, 2008). As análises foram realizadas sob o modelo espacial assumindo um modelo de frequência não correlacionado através de dez simulações independentes de Cadeias de *Markov Monte Carlo* (MCMC) variando o K entre 1 e 10 por 10 milhões de iterações MCMC com 10% de *burn-in*, uma taxa máxima de processos de Poisson de 255 e um número máximo de núcleos no mosaico de Poisson-Voronoi fixado em 765. O valor de K com melhor valor estatístico foi determinado com base na pontuação de probabilidade log posterior média mais alta.

2.3. Inferência filogenética Bayesiana

A inferência filogenética Bayesiana refere-se a um método desenvolvido por probabilística baseado no Teorema de Bayes (BAYES, 1763), o qual combina a probabilidade anterior de uma árvore filogenética P (A) com a probabilidade dos dados (B) para produzir uma distribuição de probabilidade posterior nas árvores P (A | B). A probabilidade posterior de uma árvore indicará a probabilidade de a árvore estar correta, sendo a árvore com a maior probabilidade posterior a escolhida para representar melhor uma filogenia.

Neste estudo, a inferência filogenética Bayesiana foi utilizada para averiguar a ocorrência de eventos coalescentes em *P. kamoharai*, que levaram à estruturação populacional ou ao surgimento de linhagens divergentes. As árvores filogenéticas

utilizando os haplótipos KF952742–KF952772 somados aos encontrados neste estudo, foram construídas pelo software *BEAST* v1.10.4 (SUCHARD *et al.*, 2018) e, para tal, foi utilizado o modelo de especiação de Yule (YULE, 1925; GERNHARD, 2008) e um relógio molecular *uncorrelated relaxed* com uma distribuição lognormal (DRUMMOND *et al.*, 2006).

O modelo TrN+I+G ($p\text{-inv} = 0,52$; $\alpha = 0,80$) foi selecionado como melhor modelo de substituição de nucleotídeos pelo software *jModelTest* 2.1.10 (DARRIBA *et al.*, 2012). A análise teve uma árvore inicial de máxima verossimilhança construída no software *PhyML* 3.3 (GUINDON *et al.*, 2010) com 1000 *bootstraps* e o método de Cadeias de *Markov Monte Carlo* (MCMC) realizado por 500 milhões de MCMC com 10% de *burn-in*. O software *Tracer* v1.7.1 (RAMBAUT *et al.*, 2018) foi utilizado para verificar a convergência dos dados. Após a constatação de convergência, o software *TreeAnnotator* v1.10.4 (<https://beast.community/treeannotator>) resumiu as informações das árvores produzidas pelo *BEAST* em uma única árvore de maior credibilidade posterior.

Para a calibração da árvore filogenética, devido à falta de uma taxa de mutação relatada para a *mtCR* para *P. kamoharai*, foram utilizadas as estimativas dos registros fósseis de *P. kamoharai* e de outras da ordem Lamniformes, como as espécies tubarão-mega-boca *Megachasma pelagios* (*GenBank*® número de acesso KC702506), tubarão-mangona *Carcharias taurus* (*GenBank*® número de acesso KF569943), tubarão raposa-de-olho-grande *Alopias superciliosus* (*GenBank*® número de acesso KC757415), os quais possuem origem estimada entre o Oligoceno Superior e o Mioceno Inferior há 23,03 (27,82–20,44) milhões de anos (Mia) (LUCIFORA *et al.*, 2003; CAPPETTA, 2012; SHIMADA e WARD, 2016; LANDINI *et al.*, 2019). Como grupo externo, foi utilizada a espécie basal da ordem Lamniformes, o tubarão- duende *Mitsukurina owstoni* (*GenBank*® número de acesso NC_011825), que apresenta registro fóssil desde o Eoceno Médio há 47,8 Mia (MAISEY *et al.*, 2012). Após a datação de possíveis eventos coalescentes, foi calculada a divergência genética entre as linhagens pelo software MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016) através do método de Máxima Verossimilhança por 1000 permutações.

2.4. Demografia e fluxo gênico históricos

A demografia histórica foi avaliada utilizando-se três abordagens.

Primeiramente, foi utilizada a análise de *Mismatch Distributions* calculada pelo software *Arlequin* 3.5.2.2 utilizando 1000 permutações. Foram testados dois modelos, o de expansão demográfica (ROGERS e HARPENDING, 1992) e o de expansão espacial (RAY *et al.*, 2003). Populações em equilíbrio demográfico têm uma distribuição multimodal, enquanto a distribuição uni-modal é interpretada como expansão demográfica (SLATKIN e HUDSON, 1991; ROGERS e HARPENDING, 1992).

Para a validação, os resultados foram testados usando o índice de irregularidade de Harpending (H_{RI}) (HARPENDING, 1994) e a Soma dos Desvios de Qui-Quadrados (SSD) (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999) entre os valores observados e os esperados. Os parâmetros demográficos τ (tempo de expansão em unidades de tempo mutacional), θ_0 (tamanho da população antes da expansão) e θ_1 (tamanho da população após a expansão) e o valor τ estimado foi usado para estimar o tempo de expansão nas gerações (t), usando a fórmula $t = \tau / 2\mu$ (ROGERS e HARPENDING, 1992). Uma segunda abordagem para detectar uma eventual oscilação demográfica foi baseada nos testes de neutralidade R_2 (RAMOS-ONSIS e ROZAS, 2002) e F_s (FU, 1997) implementados nos softwares *DnaSP* 6.12.03 e *Arlequin* 3.5.2.2, respectivamente, e sua significância estatística testada por 10.000 simulações.

A terceira abordagem para se averiguar a oscilação do tamanho efetivo populacional (N_e) ao longo do tempo através da construção de *Bayesian skyline plots* (DRUMMOND *et al.*, 2005), que também utiliza a inferência filogenética Bayesiana. Para a análise, todas as 255 sequências de *mtCR* foram utilizadas, porém sem adição de grupo externo. O modelo HKY+I+G ($p\text{-inv} = 0,94$; $\alpha = 0,59$) foi selecionado como o melhor modelo de substituição de nucleotídeos pelo software *jModelTest* 2.1.10. A análise foi efetuada pelo software *BEAST* v1.10.4 e para a construção da topologia bayesiana foram utilizados 10 grupos *a priori*, um modelo *piecewise-constant* e relógio molecular estrito. A análise foi efetuada por 500 milhões de MCMC com 10% de *burn-in*. O software *Tracer* v1.7.1 foi utilizado para verificar a convergência dos dados e construir o gráfico.

As estimativas de fluxo gênico histórico foram calculadas através do número de migrantes históricos por geração ($Nm = \Theta.M$) entre as populações e foi inferido pelo software *MIGRATE-N* v4.4.4 (BEERLI e FELSENSTEIN, 2001; BEERLI e PALCZEWSKI, 2010). O software estimou, também sob uma abordagem Bayesiana,

os tamanhos populacionais em escala de mutação histórica (Θ), definidos como $\Theta = N_e\mu$ para o mtDNA, e a taxa de imigração em escala de mutação histórica (M), definida como $M = m / \mu$ onde m é a taxa de imigração e μ é a taxa de mutação por sítios e geração. Diferentes hipóteses de modelos de migração foram testadas e o melhor modelo foi atribuído por meio do fator de Bayes usando as pontuações de Bezier de cada execução (BEERLI e PALCZEWSKI, 2010). As execuções foram realizadas com uma faixa de distribuição exponencial de Θ 0–0,1 (Δ 0,01; 5000 *bins*) e M 0–1000 (Δ 100; 5000 *bins*). As MCMC foram definidas como uma longa cadeia registrada por 100.000 etapas incrementadas a cada 1000 etapas com uma única réplica compreendendo um total de 100 milhões de MCMC. Um esquema de aquecimento estático de quatro cadeias paralelas com temperaturas de 1.000.000; 3; 1,5; 1 com um *burn-in* de 30%. A atribuição de convergência foi feita no *Tracer* v1.7.1.

3. RESULTADOS

3.1. Diversidade genética e estrutura genética populacional

A reavaliação das sequências de *mtCR* do estudo de Ferrette *et al.* (2015) utilizou as mesmas 255 sequências de 758 pares de bases (pb) nucleotídicas. Com o realinhamento das sequências do *mtCR* foi possível identificar 22 haplótipos novos. As sequências apresentaram composição nucleotídica de adenina (A): 32,2%, citosina (C): 20,6%, guanina (G): 13,5%, timina (T): 33,7%. Foram identificadas nas 255 sequências de *mtCR*, 25 sítios polimórficos, 53 haplótipos, $0,901 \pm 0,012$ e $0,00342 \pm 0,00016$ de diversidades haplotípica e nucleotídica, respectivamente. Os valores de diversidade para cada região amostrada estão dispostos na Tabela 1. Estes valores evidenciam uma alta diversidade haplotípica, porém uma diversidade nucleotídica abaixo da média para elasmobrânquios (DOMINGUES *et al.*, 2018a). O Anexo 1 mostra as frequências haplotípicas entre os grupos amostrais e a localização dos 25 sítios polimórficos das sequências de *mtCR*.

Tabela 1. Diversidade genética do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* entre os oceanos Atlântico e Índico. *n*, número de indivíduos, *S*, sítios polimórficos, *h*, número de haplótipos, h_d , diversidade haplotípica, π , diversidade nucleotídica. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste, L1: linhagem mitocondrial 1, L2: linhagem mitocondrial 2.

Localidade	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	h_d	π
WEA	50	12	17	0.866 ± 0.035	0.00306 ± 0.00038
SWA	12	8	7	0.773 ± 0.128	0.00370 ± 0.00096
NECA	73	16	25	0.909 ± 0.020	0.00337 ± 0.00030
GOG	68	16	29	0.936 ± 0.016	0.00362 ± 0.00027
SEA	14	8	10	0.923 ± 0.060	0.00377 ± 0.00062
Atlântico	217	21	47	0.903 ± 0.013	0.00342 ± 0.00017
SWI	38	15	19	0.899 ± 0.037	0.00347 ± 0.00039
TOTAL	255	25	53	0.901 ± 0.012	0.00342 ± 0.00016
L1	131	16	20	0.969 ± 0.035	0.00153 ± 0.00017
L2	124	18	33	0.919 ± 0.012	0.00379 ± 0.00016

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à estrutura genética populacional, mesmo com a adição de 22 novos haplótipos, não foi possível rejeitar a hipótese nula de ausência de estruturação populacional entre os grupos amostrais analisados entre os oceanos Atlântico e Índico, assim como nos resultados de Ferrette *et al.* (2015). De acordo com a AMOVA

(Tabela 2), toda a variação encontrada foi intrapopulacional (100,4%) e não interpopulacional (-0,4%), o que resultou em uma estruturação negativa e não significativa ($\Phi_{ST} = -0.00398$, $p = 0.67421$, $p > 0,05$). Portanto, a espécie *P. kamoharai* é formada por uma população panmítica entre os oceanos Atlântico e Índico Sudoeste e não apresenta estruturação genética populacional na região estudada.

Tabela 2. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os grupos amostrais do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste.

Cenário hipotético de estruturação	Fonte da variação	%	Índice de Fixação	p-valor
(WEA+SWA+NEC+GOG+SEA+SWI)	Interpopulacional	-0,4	$\Phi_{ST} = -0.00398$	0.67421
	Intrapopulacional	100,4		

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cálculos de Φ_{ST} por pares também não detectaram estruturação populacional entre os grupos amostrais (Tabela 3). Todos os resultados não foram significativos e apresentaram valores negativos ou próximos de zero. O cálculo de Φ_{ST} linearizado por pares, que leva em consideração o tempo de isolamento entre os grupos amostrais, não detectou períodos significativos de isolamento entre os grupos amostrais (Tabela 3).

Tabela 3. Φ_{ST} por pares entre as regiões amostras abaixo da diagonal e Φ_{ST} linearizado par a par acima da diagonal. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste. *Todos os valores não foram significativos ($p > 0,05$).

	WEA	SWA	NECA	GOG	SEA	SWI
WEA	-	0	0	0,02108	0	0
SWA	-0,03034	-	0	0,01569	0	0
NECA	-0,00465	-0,01466	-	0	0	0
GOG	0,02064	0,01545	-0,00219	-	0	0
SEA	-0,01664	-0,05198	-0,02359	-0,0016	-	0
SWI	-0,01014	-0,02281	-0,01382	-0,00168	-0,02531	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Por não haver estruturação genética populacional, a rede de haplótipos não evidenciou agrupamentos geográficos entre os haplótipos (Figura 8). Há o compartilhamento de haplótipos entre todas as regiões amostradas e todos os haplótipos são separados por um ou dois passos mutacionais. Entretanto, é possível notar que alguns haplótipos apresentam um “formato de estrela”, rodeados por

haplótipos únicos, o que pode ser um indício de que a população possa ter sofrido um aumento rápido e recente. Os haplótipos 1, 4, 6 e 3 foram os mais comuns, compartilhados por 25,49%; 12,15%; 8,23% e 7,84% dos indivíduos, respectivamente.

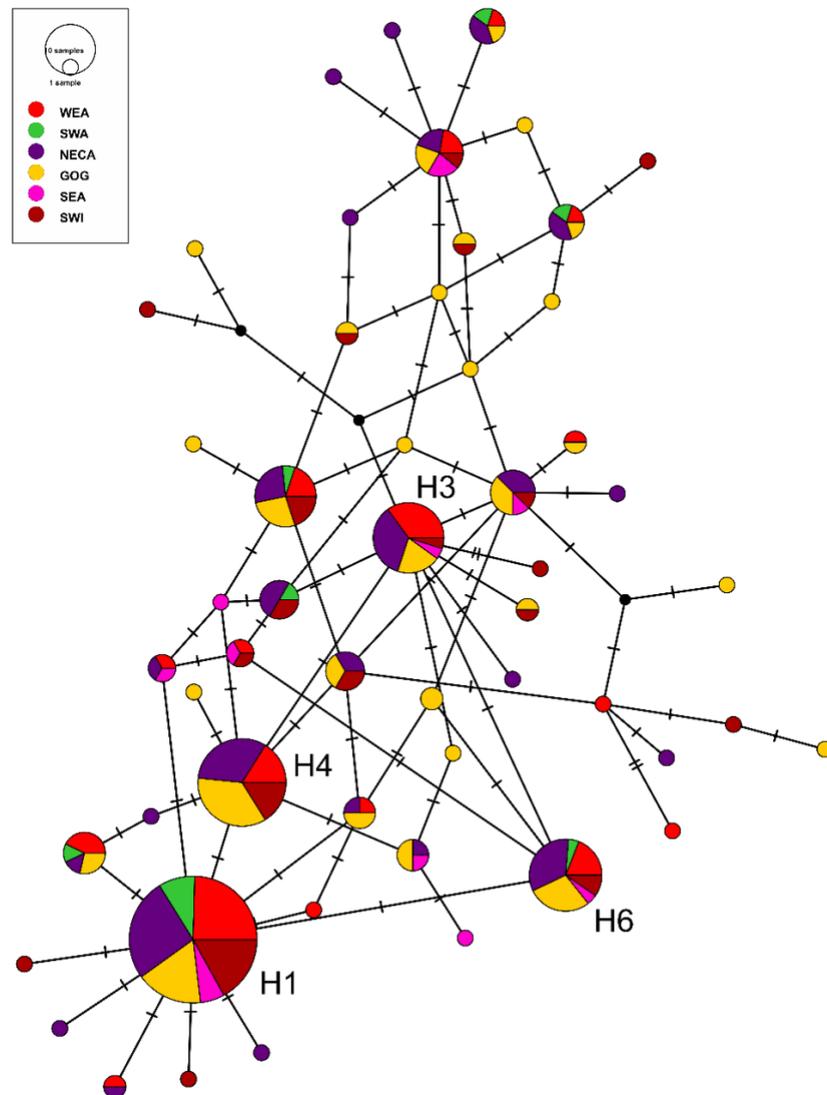


Figura 8. Rede de haplótipos da região controle do DNA mitocondrial do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudoeste, SWI: Índico Sudoeste. Os pontos negros se referem a haplótipos hipotéticos não amostrados e os traços entre os haplótipos aos passos mutacionais entre os haplótipos.

Fonte: Elaborada pela autora.

O método de agrupamentos Bayesianos espaciais para avaliar a estrutura genética populacional detectou apenas um único agrupamento (K) corroborando os resultados da AMOVA e do Φ_{ST} por pares, os quais evidenciaram a existência de

apenas uma população panmítica na região estudada entre os oceanos Atlântico e Índico (Figura 9).

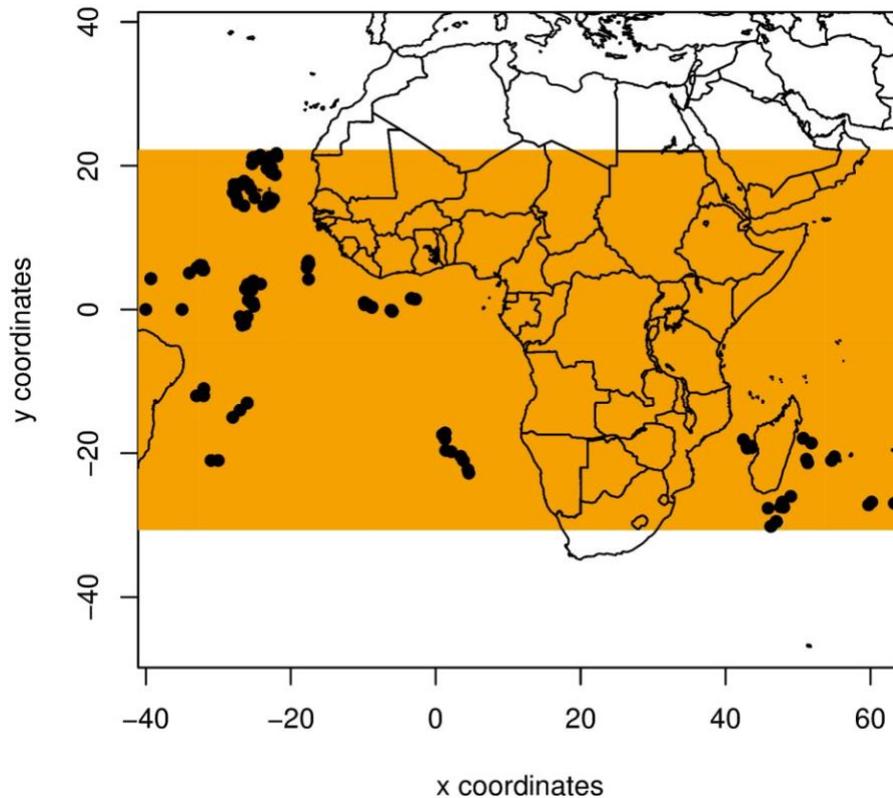


Figura 9. Mapa de probabilidades posteriores do agrupamento espacial Bayesiano de populações (K) do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* fornece a fronteira genética entre os agrupamentos possíveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2. Inferência filogenética Bayesiana

A inferência filogenética Bayesiana demonstrou ter ocorrido um evento coalescente há 14,09 milhões de anos (Mia) durante o Mioceno Médio (15,97–11,63 Mia), que originou duas linhagens mitocondriais simpátricas (Figura 10). Apesar da existência de duas linhagens mitocondriais divergentes, estas apresentaram uma baixa divergência genética (0,2%), o que evidencia que elas ficaram somente por um curto período isoladas uma da outra e, possivelmente, sofreram contato secundário cessando o processo de divergência genética ou, até mesmo, de especiação.

Entretanto, houve uma forte estruturação genética entre as linhagens ($\Phi_{ST} = 0.37373$, $p = 0.00001$), o que pode ser uma evidência de que, mesmo por um breve

período, estas linhagens ficaram isoladas uma da outra no passado, de modo que o fluxo gênico entre elas foi interrompido (Tabela 4).

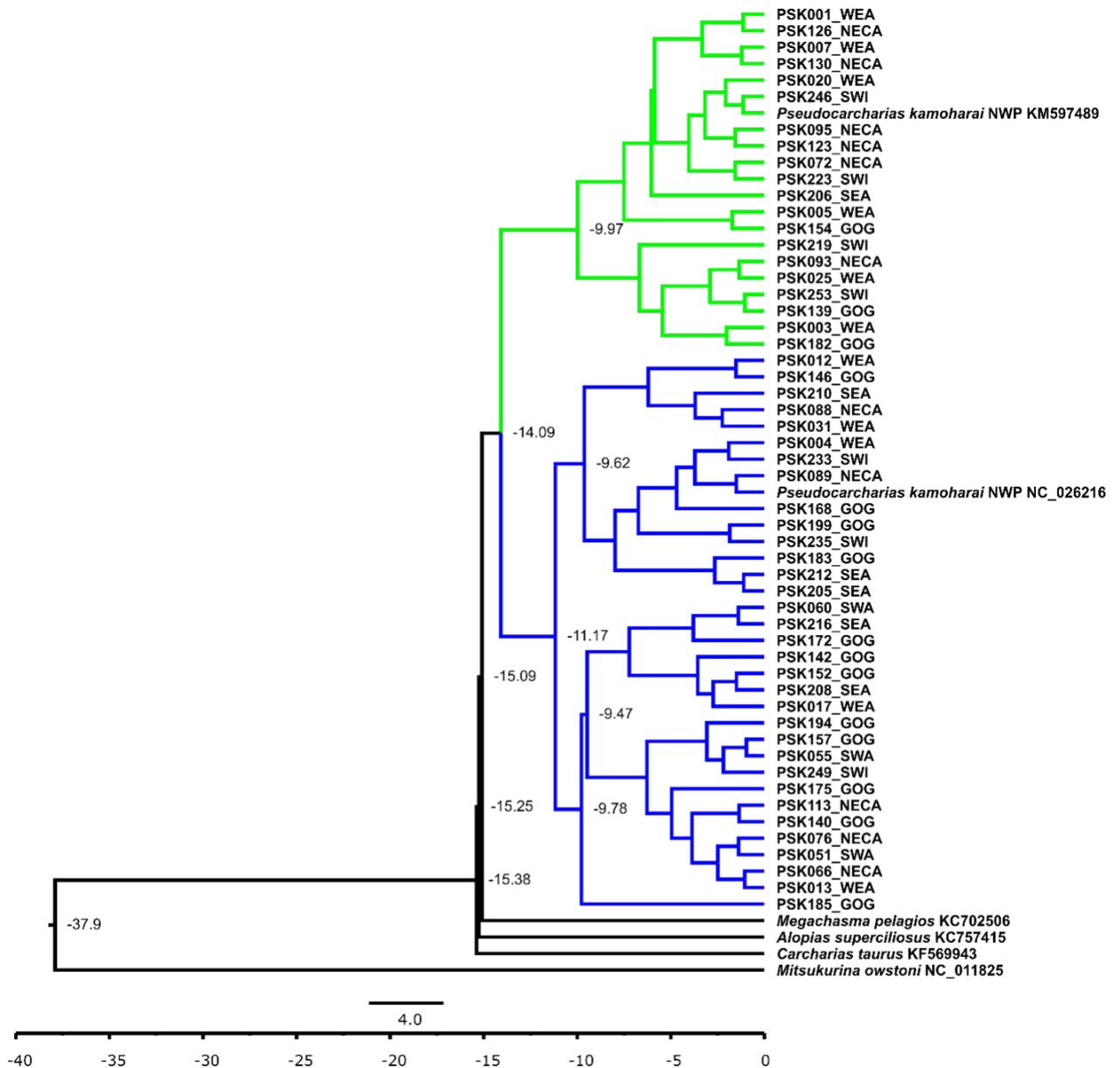


Figura 10. Inferência filogenética Bayesiana dos haplótipos da região controle do DNA mitocondrial do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. Nodos representam a estimativa de tempo em milhões de anos. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as duas linhagens mitocondriais do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. L1: linhagem mitocondrial 1, L2: linhagem mitocondrial 2.

Cenário hipotético de estruturação	Fonte da variação	%	Índice de Fixação	p-valor
(L1+L2)	Interpopulacional	37.37	$\Phi_{ST} = 0.37373$	0.00001
	Intrapopulacional	62.63		

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3. Demografia e fluxo gênico históricos

As análises de *Mismatch Distributions* resultaram em curvas uni-modais tanto para o modelo de Expansão Demográfica, quanto para o de Expansão Espacial (Figura 11) evidenciando que *P. kamoharai* sofreu tanto um aumento demográfico, quanto uma expansão espacial em sua área de distribuição. Na Tabela 5, estão dispostos os parâmetros da *Mismatch Distributions*, em ambas as linhagens é possível averiguar que houve expansão populacional de uma população de tamanho inicial θ_0 para uma população de tamanho θ_1 durante um período τ . Entretanto, o fato de os valores de Soma dos Desvios de Qui-Quadrado (SSD) e do Índice de Irregularidade de Harpending (H_{IR}) serem significativos para a linhagem L1 evidencia que os valores observados não validam os pressupostos dos modelos de expansão para esta linhagem. Mesmo assim, os Testes de Neutralidade F_S e R_2 demonstraram valores significativos corroborando que houve, de fato, expansão populacional em ambas as linhagens.

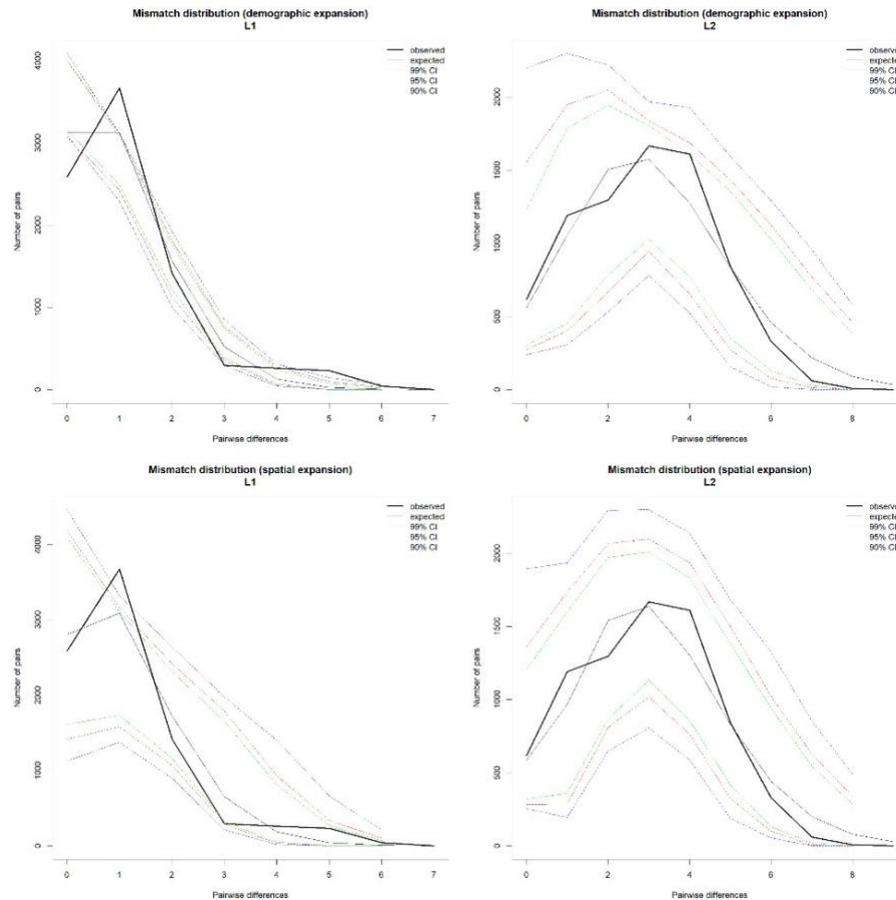


Figura 11. Análise de Mismatch Distributions do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai* e das duas linhagens mitocondriais. L1: linhagem mitocondrial 1, L2: linhagem mitocondrial 2. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5. Análise de Mismatch Distributions e Testes de Neutralidade do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. Parâmetros da Expansão Demográfica: τ : tempo de expansão em unidades de tempo mutacional, θ_0 : tamanho da população antes da expansão, θ_1 : tamanho da população após a expansão, SSD: Soma dos Desvios de Qui-Quadrados, H_{IR} : Índice de Irregularidade de Harpending. Parâmetros da Expansão Espacial: τ : tempo de expansão em unidades de tempo mutacional, θ : tamanho da população, M : $2Nm$, tamanho populacional multiplicado pela taxa de migração. Parâmetros dos Testes de Neutralidade: F_S : F_S de F_u , R_2 : Teste R_2 de Ramos-Orsins e Rozas. Em negrito, valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg ($p < 0,05$).

	Expansão Demográfica					Expansão Espacial					Testes de Neutralidade	
	τ	θ_0	θ_1	SSD	H_{IR}	T	θ	M	SSD	H_{IR}	F_S	R_2
L1	1.000	0.000	3407.185	0.010	0.104	0.973	0.147	4487.505	0.009	0.104	-16.081	0.091
L2	3.324	0.004	21.745	0.004	0.024	3.162	0.025	25.879	0.004	0.024	-22.098	0.089

Fonte: Elaborada pela autora.

A população panmítica de *P. kamoharai* sofreu uma grande variação em seu tamanho efetivo populacional (N_e), resultando em uma grande expansão populacional que teve início durante o início do período Pleistoceno Inferior há 2,5 milhões de anos (Figura 12). Entretanto, as linhagens mitocondriais apresentaram histórias demográficas distintas. A linhagem L1 apresentou um aumento em seu N_e há 3 Mia

durante o Plioceno Superior, enquanto L2 há 2 Mia ao final do Pleistoceno Inferior (Figura 12).

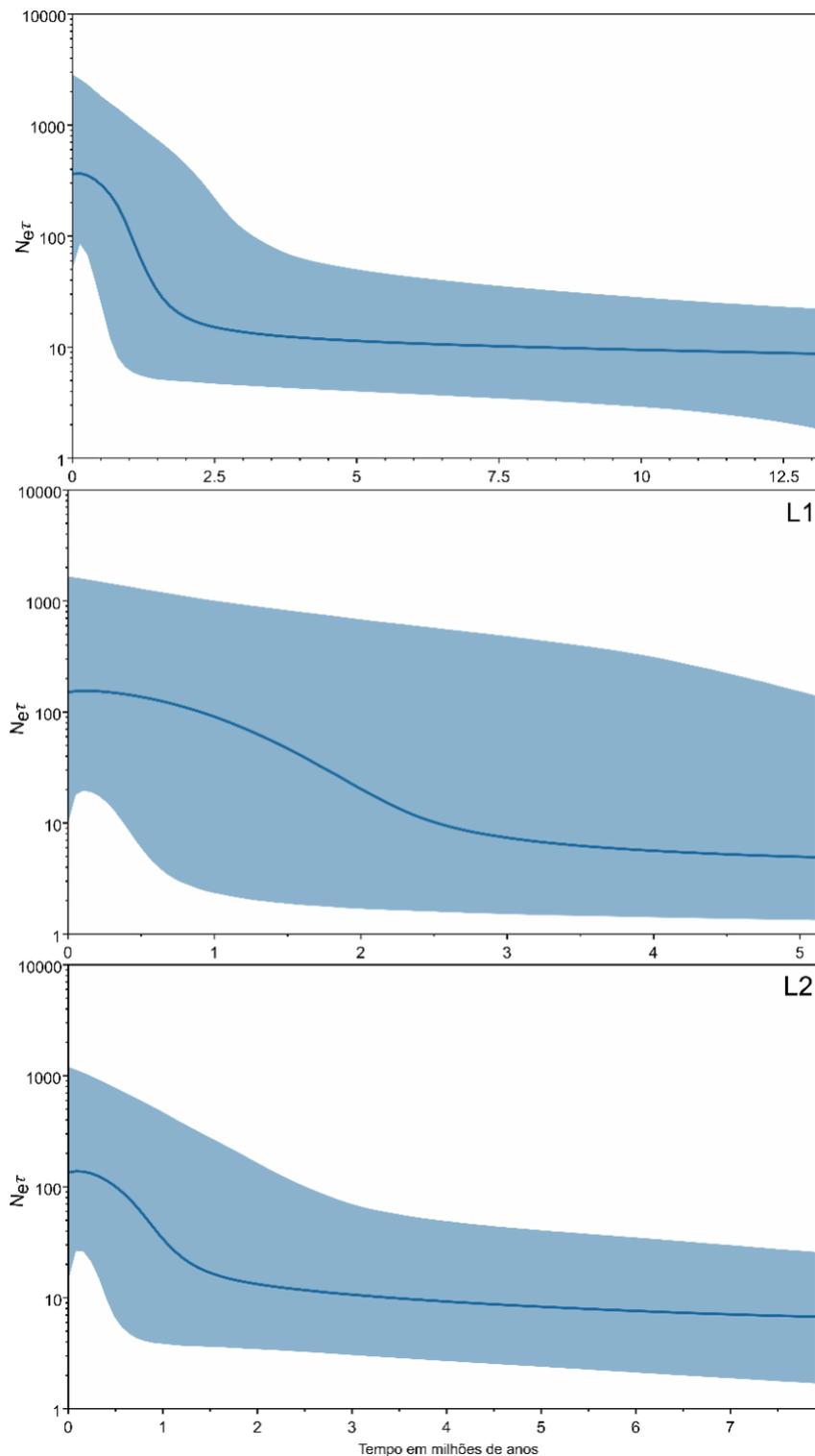


Figura 12. Análise *Bayesian skyline* da população panmítica e das duas linhagens mitocondriais do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. L1: linhagem mitocondrial 1, L2: linhagem mitocondrial 2. O azul representa o intervalo de 95% de maior densidade posterior (HPD), que indica um conjunto confiável em 95% dos valores amostrados. $N_e t$ representa o tamanho efetivo populacional (N_e) multiplicado pelo tempo de geração (t).
Fonte: Elaborada pela autora.

Durante as estimativas de fluxo gênico histórico foram testados seis modelos de migração entre as regiões amostradas. Foram testados modelos de migração que compreendem desde a panmixia (modelo 1) ao *stepping-stone* (modelo 6). O melhor modelo de migração selecionado por *Bayes Factor* foi o panmítico (Tabela 6), não evidenciando nenhum impedimento para o fluxo gênico histórico entre as regiões estudadas, o que comprova novamente a ausência de estruturação genética populacional (Figura 13). As estimativas para o melhor modelo do MIGRATE-N resultaram em um tamanho da população em escala de mutação de $\Theta = 0.00907$ (0.00630–0.01427) para a população panmítica de *P. kamoharai*, o qual compreende toda a região estudada.

Tabela 6. Seleção do melhor modelo de migração das análises do MIGRATE-N através de Bayes Factor. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste.

Número	Modelo de Migração	lnL	LBF	rank
1	Panmixia	-1966.76	0	1
2	Migração Assimétrica	-2125.98	-318.44	2
3	<i>full model</i>	-2146.37	-359.22	3
4	Migração simétrica	-2155.63	-377.74	4
5	WEA→SWA→NECA→GOG→SEA→SWI	-2185.91	-438.3	5
6	SWI→SEA→GOG→NECA→SWA→WEA	-2187.65	-441.78	6

Fonte: Elaborada pela autora.

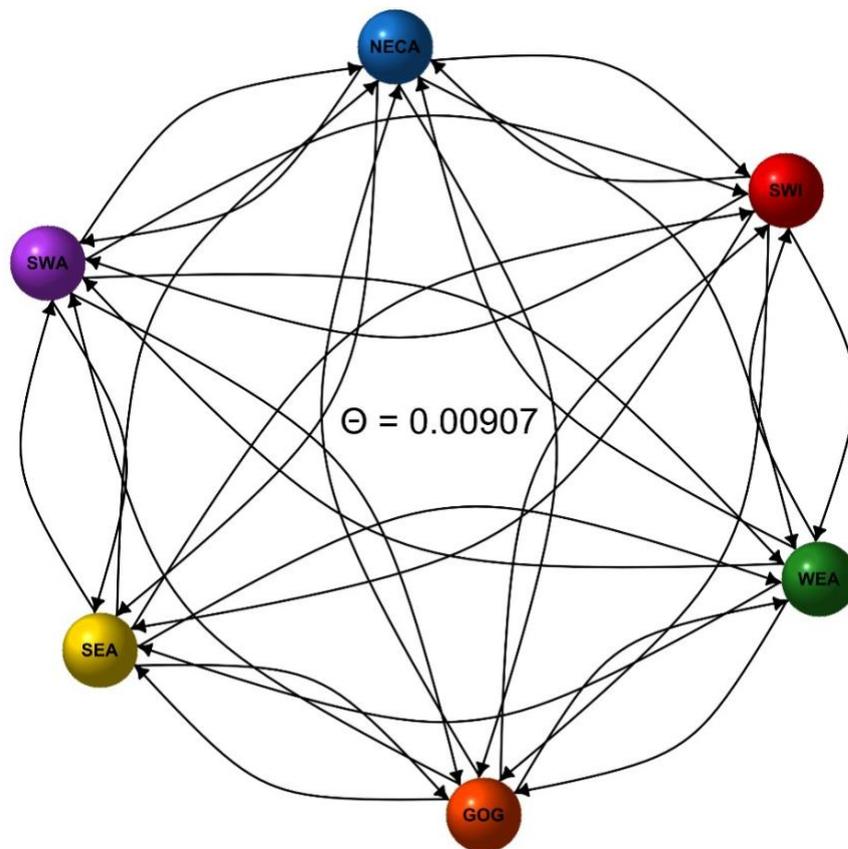


Figura 13. Representação das rotas migratórias históricas do tubarão *Pseudocarcharias kamoharai* entre os oceanos Atlântico e Índico. Θ representa o tamanho da população em escala de mutação e é definido como $\Theta = N_e\mu$, no caso do DNA mitocondrial, em que N_e é o tamanho efetivo populacional e μ é a taxa de mutação por geração. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste.

Fonte: Elaborada pela autora.

4. DISCUSSÃO

4.1. Diversidade genética e estrutura genética populacional

A reavaliação das sequências de *mtCR* de *P. kamoharai* evidenciaram polimorfismo e diversidade genética maiores em relação ao estudo de Ferrette *et al.* (2015). Foram encontrados 22 novos haplótipos, totalizando 53, além de uma alta diversidade haplotípica e uma diversidade nucleotídica um pouco abaixo da média de Chondrichthyes, que utilizaram também a *mtCR* (DOMINGUES *et al.*, 2013).

Em relação a outros Lamniformes, os valores de diversidade genética foram maiores de diversidade haplotípica e menores de nucleotídica em relação ao tubarão-mako *Isurus oxyrinchus* (CORRIGAN *et al.*, 2018) e ao grande tubarão-branco *Carcharodon carcharias* (ANDREOTTI *et al.*, 2016), porém maiores que os encontrados no tubarão-peregrino *Cetorhinus maximus* (HOELZEL *et al.*, 2006) e no tubarão-raposa-de-olho-grande *Alopias superciliosus* (MORALES *et al.*, 2018). Em relação a outros tubarões de distribuição circumtropical com baixa estruturação populacional, *P. kamoharai* apresentou valores semelhantes ao tubarão-azul *Prionace glauca* (VERÍSSIMO *et al.*, 2017), entretanto menores que do tubarão-baleia *Rhincodon typus* (CASTRO *et al.*, 2007).

Em relação a sua estrutura genética populacional, não foi rejeitada a hipótese nula de ausência de estruturação populacional, ou seja, *P. kamoharai* é formado por uma única população panmítica entre as regiões dos oceanos Atlântico e Índico avaliadas. Tanto a AMOVA, quanto o Φ_{ST} par a par resultaram em valores negativos ou próximos de zero não significativos. O Φ_{ST} linearizado também não detectou ter havido tempo de isolamento significativo entre as regiões estudadas. Entre os Lamniformes, ausência de estruturação populacional entre diferentes bacias oceânicas foram constatadas em *C. maximus* (HOELZEL *et al.*, 2006) e *A. superciliosus* (MORALES *et al.*, 2018), enquanto em espécies pelágicas de ampla distribuição, o mesmo padrão foi encontrado em *P. glauca* (VERÍSSIMO *et al.*, 2017).

As redes de haplótipos são utilizadas para analisar dados de genética de populações, a fim de abordar as relações genealógicas intraespecíficas, bem como para inferir sobre filogeografia destas populações (LEIGH e BRYANT, 2015). A rede de haplótipos reflete a ausência de estrutura genética populacional e mostra não haver heterogeneidade espacial na distribuição dos haplótipos, ou seja, todas as regiões

analisadas compartilham haplótipos entre si e o fato de haplótipos de regiões geograficamente distantes, pode ser indicativo de longos períodos de conectividade entre essas regiões.

Entretanto, é possível averiguar um grande número de haplótipos exclusivos, principalmente do Golfo da Guiné, e os haplótipos de maior frequência apresentam um “formato de estrela”, que pode ser um indicativo de um processo de rápida expansão populacional, muito comum em espécies que sofreram uma grande redução em sua área de distribuição no passado, como as ocasionadas pelos sucessivos ciclos glaciais e interglaciais do período Pleistoceno (2,58–0,0117 Mia) (HEAD e GIBBARD, 2015).

4.2. Filogeografia

Em relação à sua filogeografia, a inferência filogenética Bayesiana evidenciou um evento coalescente que originou duas linhagem mitocondriais de *P. kamoharai*, que vivem em simpatria na região estudada, há 14,09 milhões de anos durante o período Mioceno Médio (15,97–11,63 Mia). Nota-se também que ambas as linhagens são compostas por indivíduos dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico.

O Mioceno foi um período de grandes mudanças climáticas e oceanográficas globais (ZACHOS *et al.*, 2001a; METHNER *et al.*, 2020). Houve a mudança de um período inusual de clima quente, o Mioceno Climático Ótimo (MCO) (17–15 Mia), o qual interrompeu brevemente a tendência de resfriamento climático da Era Cenozoica, em que houve a diminuição dos níveis de pCO₂ atmosférico e o aumento da camada de gelo da Antártica (SHEVENELL *et al.*, 2008), o que contrasta com o subsequente período conhecido como a Transição Climática do Mioceno Médio (TCMM), marcada pelo resfriamento em altas e baixas latitudes, estabilização das camadas de gelo da Antártica, grande queda dos níveis oceânicos, que impactaram severamente a biota marinha, sua distribuição e padrões de conectividade (FLOWER *et al.*, 1994; FOSTER *et al.*, 2013; HOLBOURN *et al.*, 2013; 2014).

Além das mudanças climáticas, a deriva continental pode ter contribuído para estas alterações durante o Mioceno Médio. Muitos autores sustentam que os processos do fechamento do Mar de Tethys, que conectava o Oceano Índico ao Mar Mediterrâneo, e do Istmo do Panamá, que conectava os oceanos Pacífico e Atlântico podem ter alterado os padrões de conectividade entre diferentes populações para diversas espécies (HAMON *et al.*, 2013; MONTES *et al.*, 2015). Entretanto, a datação

de ambos os processos de fechamento das conexões marinhas não são consenso e ainda são amplamente debatidos pela comunidade científica (FARRIS *et al.*, 2011; HAMON *et al.*, 2013; BACON *et al.*, 2015; O'DEA *et al.*, 2016; MOLNAR, 2017; JARAMILLO *et al.*, 2017; JARAMILLO, 2018).

Tanto o fechamento do Mar de Tethys, quanto do Istmo do Panamá podem ter interferido na conectividade entre os oceanos e isolaram grupos de indivíduos de *P. kamoharai* originando as duas linhagens mitocondriais. Entretanto na árvore gerada pela inferência filogenética Bayesiana, é possível averiguar que há haplótipos dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico em ambas as linhagens, o que pode indicar esse isolamento entre as linhagens de modo efetivo por um breve período, dado a baixa divergência encontrada entre as linhagens (0,2%) e que, possivelmente, houve contato secundário. Ainda assim, foi medida uma estruturação muito forte entre ambas as linhagens ($\Phi_{ST} = 0.37373$, $p = 0.00001$), o que evidencia que havia uma barreira eficiente ao fluxo gênico entre estas linhagens no passado.

As avaliações sobre a demografia histórica demonstraram que *P. kamoharai* sofreu uma expansão populacional demográfica e espacial, de acordo com a *Mismatch Distributions*. Apesar de os valores de SSD e H_{RI} serem significativos para L1, esta linhagem apresentou uma curva unimodal e os Testes de Neutralidade dão suporte para este aumento populacional, pois ambos os testes resultaram em desvio de neutralidade e foram significativos. Os gráficos de *Bayesian skyline* também evidenciaram um aumento populacional pela variação do N_e durante o período Pleistoceno e no final do período Plioceno e ao longo do Pleistoceno para as linhagens L1 e L2, respectivamente.

O período Plioceno (5,33–2,58 Mia) foi marcado como o último período quente antes do início dos ciclos glaciais e interglaciais de alta magnitude do período Pleistoceno (ZACHOS *et al.*, 2001b). Durante o Plioceno, o período quente médio do Piacenza (MPWP), um intervalo durante o Plioceno Superior (3,264–3,025 Mia), é usado como um período análogo para estimativas do aquecimento antropogênico, uma vez que as condições atmosféricas de CO₂ eram comparáveis aos valores atuais (~400 ppm) (PAGANI *et al.*, 2010) e as temperaturas médias globais estimadas eram 2–3°C maiores em relação ao período pré-industrial (HAYWOOD *et al.*, 2013). Além disso, os níveis oceânicos médios globais eram 23,5 metros (m) acima dos níveis atuais, com 1,6 m adicionais de expansão térmica (DUMITRU *et al.*, 2019).

A transição entre Plioceno Superior e o Pleistoceno Inferior foi um dos períodos

mais importantes e dramáticos de mudança climática global durante a Era Cenozoica (LISIECKI e RAYMO, 2007; LAWRENCE *et al.*, 2010). As principais mudanças climáticas e ambientais incluem a intensificação da glaciação do hemisfério norte (ZACHOS *et al.*, 2008; HENNISSSEN *et al.*, 2015), a reorganização da circulação oceânica global (MARLOW *et al.*, 2000; ETOURNEAU *et al.*, 2010), uma queda acentuada nos níveis oceânicos globais (BINTANJA e VAN DE WAL, 2008; ROHLING *et al.*, 2014), e a intensificação da aridez em grande parte do mundo (DEMENOCAL, 2004; WU *et al.*, 2011). Além disso, o sistema climático global iniciou um período de ciclos glaciais e interglaciais (BARTOLI *et al.*, 2005; HAUG *et al.*, 2005; ROHLING *et al.*, 2014), uma tendência de resfriamento de longo prazo, a amplitude dos ciclos glaciais aumentou e o regime climático global moderno começou a ser estabelecido (LAWRENCE *et al.*, 2010; BAILEY *et al.*, 2012; ROHLING *et al.*, 2014).

Durante o período Pleistoceno, uma mudança climática fundamental ocorreu durante a transição do Pleistoceno Médio-Inferior (TPMI), que ocorreu entre ~1,4–0,4 Mia, marcada por um aumento progressivo na amplitude de ciclos glaciais e interglaciais de 41 mil anos para aproximadamente 100 mil anos, resultando em um aumento do volume de gelo global (RUDDIMAN *et al.*, 1986; LISIECKI e RAYMO, 2007). O aumento progressivo da intensidade e da duração dos ciclos glaciais e interglaciais, atuaram como uma série de filtros ecológicos dos quais muitas espécies eventualmente tornaram-se extintas, enquanto outras se adaptaram em resposta às mudanças (HEAD e GIBBARD, 2005; PIMIENTO *et al.*, 2017).

Portanto, ao longo do período Pleistoceno, cerca de 50 ciclos glaciais e interglaciais resultaram em ciclos de aumento e declínio do volume de gelo das calotas polares e dos níveis oceânicos globais, que tiveram uma variação entre 115–130 m dos níveis atuais atingindo o mínimo durante o Último Máximo Glacial período entre 50–10 mil anos atrás que compreende o maior volume de gelo global (CLARK *et al.*, 2009; LAMBECK *et al.*, 2014; YOKOYAMA *et al.*, 2018). As flutuações dos níveis oceânicos afetaram a dispersão e os padrões de conectividade entre as populações alterando a dinâmica populacional em uma ampla gama de organismos marinhos tropicais durante o Pleistoceno (LUDT e ROCHA, 2015) e pode ter facilitado o isolamento de populações originando diversas linhagens e intensificando o processo de especiação (AVISE, 2009; AVISE *et al.*, 2016).

Os padrões de flutuação no N_e de *P. kamoharai* evidenciam períodos de expansão populacional ao longo do período dos ciclos glaciais e interglaciais e que

ambas as linhagens tiveram suas expansões em períodos distintos, o que pode ser um indício de que estavam isoladas uma da outra durante os ciclos glaciais e interglaciais. As curvas do *Bayesian skyline* evidenciaram um período de estabilidade populacional, que precede o período de expansão, tanto na linhagem L1, quanto na L2. Entretanto, de acordo com Grant (2015), esse achatamento da curva pode ser um indicativo de que as sequências contemporâneas não trazem todas as marcas da história populacional da espécie estudada.

Deste modo, as contrações populacionais durante cada ciclo glacial promoveram a extinção de algumas linhagens de haplótipos e, portanto, as informações sobre a história populacional foram perdidas. Essa perda de informações genéticas não implica necessariamente em fortes gargalos populacionais. A maioria das espécies consiste em populações que experimentam extinções e colonizações locais, de modo que, embora os números totais do censo possam permanecer grandes, o sinal genético pode ser perdido devido à dinâmica da metapopulação (PANNELL, 2003; GRANT, 2015).

As linhagens mitocondriais analisadas neste estudo são as sobreviventes das mudanças climáticas do período Pleistoceno, possivelmente, por terem se abrigado em refúgios glaciais em regiões de baixa latitude, próximas a linha do Equador. Os refúgios glaciais consistem em regiões geográficas com condições climáticas mais amenas, possibilitando a sobrevivência de diferentes espécies durante os períodos climáticos extremos dos ciclos glaciais e interglaciais (PROVAN e BENNETT, 2008). As linhagens de *P. kamoharai* podem ter sobrevivido por se abrigarem em refúgios glaciais no mar do Caribe e norte da América do Sul (LEIGH *et al.*, 2014) e no Golfo da Guiné (PLANA *et al.*, 2004; JENSEN *et al.*, 2019) no Oceano Atlântico e na Ilha de Madagascar no Oceano Índico (PELLISSIER *et al.*, 2014), que podem ter atuado como centros de dispersão da espécie após os períodos glaciais.

Em relação a outras espécies de tubarões e raias, os ciclos glaciais e interglaciais também impactaram e ocasionaram o surgimento de diferentes linhagens e a reclusão de populações (MENDONÇA *et al.*, 2011; TILLET *et al.*, 2012; DOMINGUES *et al.*, 2018b, 2019; CARMO *et al.*, 2019). Em relação ao *P. kamoharai*, após o Último Máximo Glacial, com o restabelecimento dos níveis oceânicos, as duas linhagens sobreviventes provavelmente tiveram um contato secundário e, atualmente, compõem a espécie *P. kamoharai*.

As avaliações de fluxo gênico histórico evidenciaram não ter havido restrições

ao fluxo gênico, provavelmente após as deglaciações. Entretanto, ainda é necessário avaliar o fluxo gênico entre as linhagens e com o uso de marcadores moleculares contemporâneos, como microssatélites ou *single nucleotide polymorphisms* (SNPs).

5. CONCLUSÃO

Estes resultados contam a história filogeográfica de *P. kamoharai* e demonstram que a espécie possui alta diversidade genética, formada por uma população panmítica entre os oceanos Atlântico e Índico. É composta por duas linhagens mitocondriais simpátricas que se separaram durante o Mioceno Médio, as quais provavelmente permaneceram isoladas uma da outra por um breve período e sobreviveram aos ciclos glaciais e interglaciais do período Pleistoceno. Entretanto, estas duas linhagens tiveram contato secundário após a deglaciação e formam a espécie *P. kamoharai* atualmente, que possui distribuição circumtropical e ainda carece de estudos em amplas regiões de sua distribuição geográfica, principalmente no Oceano Pacífico. Portanto, ainda é preciso avaliar os padrões filogeográficos da espécie entre os oceanos Atlântico e Indo-Pacífico, a fim de avaliar a existência de estoques genéticos diferenciados. Deste modo, os resultados aqui apresentados evidenciam é necessário um manejo internacional para a espécie *P. kamoharai*, entretanto, a região do Golfo da Guiné, aparentemente, é a região com maior variabilidade genética e deve ser considerada uma região prioritária para sua conservação.

6. TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Marine and Freshwater Research



Phylogeography of crocodile shark between the Atlantic and Indian oceans

Journal:	<i>Marine and Freshwater Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dominiski, Aline; Universidade Santa Cecilia Ferrette, Bruno; Universidade Santa Cecilia
Keyword:	elasmobranchs, phylogeography

SCHOLARONE™
Manuscripts

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHEBE, I. B.; SHIMADA, K.; REILLY, B.; RIGSBY, C. K. Cranial musculature in extant crocodile shark, *Pseudocarcharias kamoharai* (Lamniformes: Pseudocarchariidae) and its evolutionary implications. **Journal of Fossil Research**, 46, 20-28, 2013.
- ALOMAR, C.; DEUDERO, S. Evidence of microplastic ingestion in the shark *Galeus melastomus* Rafinesque, 1810 in the continental shelf off the western Mediterranean Sea. **Environmental pollution**, 223, 223-229, 2017.
- ANDREOTTI, S.; VON DER HEYDEN, S.; HENRIQUES, R.; RUTZEN, M.; MEYER, M.; OOSTHUIZEN, H.; MATTHEE, C. A. New insights into the evolutionary history of white sharks, *Carcharodon carcharias*. **Journal of Biogeography**, 43(2), 328-339, 2016.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36(1), 3-15, 2009.
- 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**, 18(1), 489-522, 1987.
- AVISE, J. C.; BOWEN, B. W.; AYALA, F. J. In the light of evolution X: Comparative phylogeography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113(29), 7957-7961, 2016.
- BACON, C. D.; SILVESTRO, D.; JARAMILLO, C.; SMITH, B. T.; CHAKRABARTY, P.; ANTONELLI, A. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(19), 6110-6115, 2015.
- BAILEY, I.; FOSTER, G. L.; WILSON, P. A.; JOVANE, L.; STOREY, C. D.; TRUEMAN, C. N.; BECKER, J. Flux and provenance of ice-rafted debris in the earliest Pleistocene sub-polar North Atlantic Ocean comparable to the last glacial maximum. **Earth and Planetary Science Letters**, 341, 222-233, 2012.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, 16(1), 37-48, 1999.
- BARTOLI, G.; SARNTHEIN, M.; WEINELT, M.; ERLLENKEUSER, H.; GARBE-SCHÖNBERG, D.; LEA, D. W. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. **Earth and Planetary Science Letters**, 237(1-2), 33-44, 2005.
- BAYES, T. LII. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. By the late Rev. Mr. Bayes, FRS communicated by Mr. Price, in a letter to John Canton,

AMFR S. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, (53), 370-418, 1763.

BAZZI, M.; KEAR, B. P.; BLOM, H.; AHLBERG, P. E.; CAMPIONE, N. E. Static dental disparity and morphological turnover in sharks across the end-Cretaceous mass extinction. **Current Biology**, 28(16), 2607-2615, 2018.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(8), 4563-4568, 2001.

BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, 185(1), 313-326, 2010.

BINTANJA, R.; VAN DE WAL, R. S. W. North American ice-sheet dynamics and the onset of 100,000-year glacial cycles. **Nature**, 454(7206), 869-872, 2008.

BLAND, L. M.; BIELBY, J.; KEARNEY, S.; ORME, C. D. L.; WATSON, J. E.; COLLEN, B. Toward reassessing data-deficient species. **Conservation Biology**, 31(3), 531-539, 2017.

BLAND, L. M.; COLLEN, B. E. N.; ORME, C. D. L.; BIELBY, J. O. N. Predicting the conservation status of data-deficient species. **Conservation Biology**, 29(1), 250-259, 2015.

BOESSENECKER, R. W., EHRET, D. J., LONG, D. J., CHURCHILL, M., MARTIN, E., BOESSENECKER, S. J. The Early Pliocene extinction of the mega-toothed shark *Otodus megalodon*: a view from the eastern North Pacific. **PeerJ**, 7, e6088, 2019.

BORNATOWSKI, H., NAVIA, A. F., BRAGA, R. R., ABILHOA, V., & CORRÊA, M. F. M. Ecological importance of sharks and rays in a structural foodweb analysis in southern Brazil. **ICES Journal of Marine Science**, 71(7), 1586-1592, 2014.

BRAZEAU, M. D., & FRIEDMAN, M. The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. **Nature**, 520(7548), 490-497, 2015.

BROWN, W. M., GEORGE, M., & WILSON, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 76(4), 1967-1971, 1979.

CAPPETTA, H. **Chondrichthyes. Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii: Teeth**. In: Schultze, H.-P. (ed) *Handbook of Paleoichthyology*, 2012. Volume 3E, pp. 1-512, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munich.

CARMO, C. B.; FERRETTE, B. L. S.; CAMARGO, S. M.; ROXO, F. F.; COELHO, R.; GARLA, R. C.; OLIVEIRA, C.; PIERCY, A. N.; BORNATOWSKI, H.; FORESTI, F.; BURGESS, G. H.; MENDONÇA, F. F. 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**, 29(5), 760-772, 2019.

CASTRO, A. L. F.; STEWART, B. S.; WILSON, S. G.; HUETER, R. E.; MEEKAN, M. G.; MOTTA, P. J.; BOWEN, B. W.; KARL, S. A. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). **Molecular Ecology**, 16(24), 5183-5192, 2007.

CHEUNG, W. W.; SARMIENTO, J. L.; DUNNE, J.; FRÖLICHER, T. L.; LAM, V. W.; PALOMARES, M. D.; WATSON, R.; PAULY, D. Shrinking of fishes exacerbates impacts of global ocean changes on marine ecosystems. **Nature Climate Change**, 3(3), 254-258, 2013a.

CHEUNG, W. W.; WATSON, R.; PAULY, D. Signature of ocean warming in global fisheries catch. **Nature**, 497(7449), 365-368, 2013b.

CLARK, P. U.; DYKE, A. S.; SHAKUN, J. D.; CARLSON, A. E.; CLARK, J.; WOHLFARTH, B.; MITROVICA, J. X.; HOSTETLER, S. W.; MCCABE, A. M. The last glacial maximum. **Science**, 325(5941), 710-714, 2009.

CLARKE, S. Understanding pressures on fishery resources through trade statistics: a pilot study of four products in the Chinese dried seafood market. **Fish and Fisheries**, 5(1), 53-74, 2004.

COELHO, R.; FERNANDEZ-CARVALHO, J.; LINO, P. G.; SANTOS, M. N. An overview of the hooking mortality of elasmobranchs caught in a swordfish pelagic longline fishery in the Atlantic Ocean. **Aquatic Living Resources**, 25(4), 311-319, 2012.

COLMENERO, A. I.; BARRÍA, C.; BROGLIO, E.; GARCÍA-BARCELONA, S. Plastic debris straps on threatened blue shark *Prionace glauca*. **Marine Pollution Bulletin**, 115(1-2), 436-438, 2017.

CONDAMINE, F. L.; ROMIEU, J.; GUINOT, G. Climate cooling and clade competition likely drove the decline of lamniform sharks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 116(41), 2019.

COOPER, J. A.; PIMIENTO, C.; FERRÓN, H. G.; BENTON, M. J. Body dimensions of the extinct giant shark *Otodus megalodon*: a 2D reconstruction. **Scientific Reports**, 10(1), 1-9, 2020.

CORRIGAN, S.; LOWTHER, A. D.; BEHEREGARAY, L. B.; BRUCE, B. D.; CLIFF, G.; DUFFY, C. A.; FOULIS, A.; FRANCIS, M. P.; GOLDSWORTHY, S. D.; HYDE, J. R.; JABADO, R. W. Population connectivity of the highly migratory shortfin mako (*Isurus oxyrinchus* Rafinesque 1810) and implications for management in the Southern Hemisphere. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 6, 187, 2018.

DAI, X. J.; ZHU, J. F.; CHEN, X. J.; XU, L. X.; CHEN, Y. Biological observations on the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharui*. **Journal of Fish Biology**, 80(5), 1207-1212, 2012.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, 9(8), 772-772, 2012.

DEMENOCAL, P. B. African climate change and faunal evolution during the Pliocene–Pleistocene. **Earth and Planetary Science Letters**, 220(1-2), 3-24, 2004.

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**, 29(1), 102-114, 2019.

DOMINGUES, R. R.; HILSDORF, A. W. S.; GADIG, O. B. F. The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 19(3), 501-525, 2018a.

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**, 28(1), 213-227, 2018b.

DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y.; PHILLIPS, M. J.; RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biol**, 4(5), e88, 2006.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B. E. T. H.; PYBUS, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular biology and evolution**, 22(5), 1185-1192, 2005.

DULVY, N. K.; FOWLER, S. L.; MUSICK, J. A.; CAVANAGH, R. D.; KYNE, P. M.; HARRISON, L. R.; CARLSON, J. K.; DAVIDSON, L. N.; FORDHAM, S. V.; FRANCIS, M. P.; POLLOCK, C. M. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. **Elife**, 3, e0059, 2014.

DUMITRU, O. A.; AUSTERMANN, J.; POLYAK, V. J.; FORNÓS, J. J.; ASMEROM, Y.; GINÉS, J.; GINÉS, A.; ONAC, B. P. Constraints on global mean sea level during Pliocene warmth. **Nature**, 574(7777), 233-236, 2019.

EBERT, D. A.; FOWLER, S. L.; COMPAGNO, L. J. Sharks of the world: a fully illustrated guide. **Wild Nature Press**, 2013.

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

ETOURNEAU, J.; SCHNEIDER, R.; BLANZ, T.; MARTINEZ, P. Intensification of the Walker and Hadley atmospheric circulations during the Pliocene–Pleistocene climate transition. **Earth and Planetary Science Letters**, 297(1-2), 103-110, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, 10(3), 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S. Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96(19), 10597-10602, 1999.

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**, 131(2), 479-491, 1992.

FARRIS, D. W.; JARAMILLO, C.; BAYONA, G.; RESTREPO-MORENO, S. A.; MONTES, C.; CARDONA, A.; MORA, A.; SPEAKMAN, R. J.; GLASCOCK, M. D.; VALENCIA, V. Fracturing of the Panamanian Isthmus during initial collision with South America. **Geology**, 39(11), 1007-1010, 2011.

FERRETTE, B. L. S.; DOMINGUES, R. R.; ROTUNDO, M. M.; MIRANDA, M. P.; BUNHOLI, I. V.; DE BIASI, J. B.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; MENDONÇA, F. F. DNA barcode reveals the bycatch of endangered batoids species in the southwest Atlantic: implications for sustainable fisheries management and conservation efforts. **Genes**, 10(4), 304, 2019a.

FERRETTE, B. L. S.; DOMINGUES, R. R.; USSAMI, L. H. F.; MORAES, L.; MAGALHÃES, C. O.; AMORIM, A. F.; HILSDORF, A. W. S.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; MENDONÇA, F. F. DNA-based species identification of shark finning seizures in Southwest Atlantic: implications for wildlife trade surveillance and law enforcement. **Biodiversity and Conservation**, 28(14), 4007-4025, 2019b.

FERRETTE, B. L. S.; MENDONÇA, F. F.; COELHO, R.; DE OLIVEIRA, P. G. V.; HAZIN, F. H. V.; ROMANOV, E. V.; OLIVEIRA, C.; SANTOS, M. N.; FORESTI, F. High connectivity of the crocodile shark between the Atlantic and southwest Indian Oceans: Highlights for conservation. **Plos One**, 10(2), e0117549, 2015.

FERRETTI, F.; WORM, B.; BRITTEN, G. L.; HEITHAUS, M. R.; LOTZE, H. K. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. **Ecology letters**, 13(8), 1055-1071, 2010.

FIELDS, A. T.; FISCHER, C. A.; SHEA, S. K.; ZHANG, H.; ABERGROMBIE, D. I.; FELDHEIM, K. A.; BABCOCK, E. A.; CHAPMAN, D. D. Species composition of the international shark fin trade assessed through a retail-market survey in Hong Kong. **Conservation Biology**, 32(2), 376-389, 2018.

FLOWER, B. P., KENNETT, J. P. (1994). The middle Miocene climatic transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. **Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology**, 108(3-4), 537-555, 1994.

FOSTER, G. L.; ROHLING, E. J. Relationship between sea level and climate forcing by CO₂ on geological timescales. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(4), 1209-1214, 2013.

FRIEDMAN, M.; SALLAN, L. C. Five hundred million years of extinction and recovery: a Phanerozoic survey of large-scale diversity patterns in fishes. **Palaeontology**, 55(4), 707-742, 2012.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147(2), 915-925, 1997.

GERNHARD, T. The conditioned reconstructed process. **Journal of theoretical biology**, 253(4), 769-778, 2008.

GRANT, W. S. Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. **Journal of Heredity**, 106(4), 333-346, 2015.

GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GEELAND: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, 5(3), 712-715, 2005.

GUILLOT, G.; SANTOS, F.; ESTOUP, A. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. **Bioinformatics**, 24(11), 1406-1407, 2008.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, 59(3), 307-321, 2010.

GUINOT, G.; CARRILLO-BRICENO, J. D. Lamniform sharks from the Cenomanian (upper Cretaceous) of Venezuela. **Cretaceous Research**, 82, 1-20, 2018.

GUINOT, G.; CAVIN, L. 'Fish' (Actinopterygii and Euselachthii) diversification patterns through deep time. **Biological Reviews**, 91(4), 950-981, 2016.

HAMON, N.; SEPULCHRE, P.; LEFEBVRE, V.; RAMSTEIN, G. The role of eastern Tethys seaway closure in the Middle Miocene Climatic Transition (ca. 14 Ma). **Climate of the Past**, 9(6), 2013.

HARPENDING, H. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology*, 591-600, 1994.

HAUG, G. H.; GANOPOLSKI, A.; SIGMAN, D. M.; ROSELL-MELE, A.; SWANN, G. E.; TIEDEMANN, R.; JACCARD, S. L.; BOLLMANN, J.; MASLIN, M. A.; LENG, M. J.; EGLINTON, G. North Pacific seasonality and the glaciation of North America 2.7 million years ago. **Nature**, 433(7028), 821-825, 2005.

HAYWOOD, A.; HILL, D.; DOLAN, A.; OTTO-BLIESNER, B.; BRAGG, F.; CHAN, W. L.; CHANDLER, M.; CONTOUX, C.; DOWSETT, H.; JOST, A.; KAMAE, Y. Large-

scale features of Pliocene climate: results from the Pliocene Model Intercomparison Project. **Climate of the Past**, 9(1), 191-209, 2013.

HEAD, M. J.; GIBBARD, P. L. Early-Middle Pleistocene transitions: an overview and recommendation for the defining boundary. Geological Society, London, **Special Publications**, 247(1), 1-18, 2005.

HEAD, M. J.; GIBBARD, P. L. Early–Middle Pleistocene transitions: linking terrestrial and marine realms. **Quaternary International**, 389, 7-46, 2015.

HEINICKE, M. P.; NAYLOR, G. J. P.; HEDGES, S. B. Cartilaginous fishes (Chondrichthyes). The timetree of life, 9, 320-7. **Heinicke, M. P., Naylor, G. J. P. and Hedges, S. B.**, pp. 320-327, 2009. Disponível em: Oxford University Press, Oxford.

HENNISSSEN, J. A.; HEAD, M. J.; DE SCHEPPER, S.; GROENEVELD, J. Increased seasonality during the intensification of Northern Hemisphere glaciation at the Pliocene–Pleistocene boundary ~2.6 Ma. **Quaternary Science Reviews**, 129, 321-332, 2015.

HEUPEL, M. R.; KNIP, D. M.; SIMPFENDORFER, C. A.; DULVY, N. K. Sizing up the ecological role of sharks as predators. **Marine Ecology Progress Series**, 495, 291-298, 2014.

HOELZEL, A. R.; SHIVJI, M. S.; MAGNUSSEN, J.; FRANCIS, M. P. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). **Biology letters**, 2(4), 2006.

HOLBOURN, A.; KUHN, W.; CLEMENS, S.; PRELL, W.; ANDERSEN, N. Middle to late Miocene stepwise climate cooling: Evidence from a high-resolution deep water isotope curve spanning 8 million years. **Paleoceanography**, 28(4), 688-699, 2013.

HOLBOURN, A.; KUHN, W.; LYLE, M.; SCHNEIDER, L.; ROMERO, O.; ANDERSEN, N. Middle Miocene climate cooling linked to intensification of eastern equatorial Pacific upwelling. **Geology**, 42(1), 19-22, 2014.

HOLMES, B. H.; STEINKE, D.; WARD, R. D. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. **Fisheries Research**, 95(2-3), 280-288, 2009.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2020-2. Table 4a: number of animal species in class Chondrichthyes (cartilaginous fishes: sharks, skates, rays, and chimaeras) in each IUCN Red List Category by order, 2020. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/statistics>. Acesso em 10 de Setembro de 2020.

JAITEH, V. F.; LONERAGAN, N. R.; WARREN, C. The end of shark finning? Impacts of declining catches and fin demand on coastal community livelihoods. **Marine Policy**, 82, 224-233, 2017.

JARAMILLO, C. Evolution of the Isthmus of Panama: biological, paleoceanographic and paleoclimatological implications. **Mountains, climate and biodiversity**. Oxford: Wiley Blackwell, 323-338, 2018.

JARAMILLO, C.; MONTES, C.; CARDONA, A.; SILVESTRO, D.; ANTONELLI, A.; BACON, C. D. Comment (1) on “Formation of the Isthmus of Panama” by O’Dea *et al.* **Science Advances**, 3(6), e1602321, 2017.

JENSEN, M. P.; FITZSIMMONS, N. N.; BOURJEA, J.; HAMABATA, T.; REECE, J.; DUTTON, P. H. The evolutionary history and global phylogeography of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Journal of Biogeography**, 46(5), 860-870, 2019.

KARATAJÜTË-TALIMAA, V.; PREDTECHENSKYJ, N. The distribution of the vertebrates in the Late Ordovician and Early Silurian palaeobasins of the Siberian Platform. **Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle, 4ème série–section C–Sciences de la Terre, Paléontologie, Géologie, Minéralogie**, 17(1-4), 39-55, 1995.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12), 1647-1649, 2012.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. Stochastic processes and their applications, 13(3), 235-248, 1982.

KRIWET, J.; BENTON, M. J. Neoselachian (chondrichthyes, elasmobranchii) diversity across the cretaceous–tertiary boundary. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 214(3), 181-194, 2004.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 33(7), 1870-1874, 2016.

KYNE, P.M.; ROMANOV, E.; BARRETO, R.; CARLSON, J.; FERNANDO, D.; FORDHAM, S.; FRANCIS, M.P.; JABADO, R.W.; LIU, K.M.; MARSHALL, A.; PACOUREAU, N.; SHERLEY, R.B. *Pseudocarcharias kamoharai*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T39337A171964644**, 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T39337A171964644.en>. Acesso em 11 de Setembro 2020.

LAM, V. W.; ALLISON, E. H.; BELL, J. D.; BLYTHE, J.; CHEUNG, W. W.; FRÖLICHER, T. L.; GASALLA, M. A.; SUMAILA, U. R. Climate change, tropical fisheries and prospects for sustainable development. **Nature Reviews Earth & Environment**, 1-15, 2020.

LAMBECK, K.; ROUBY, H.; PURCELL, A.; SUN, Y.; SAMBRIDGE, M. Sea level and global ice volumes from the Last Glacial Maximum to the Holocene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(43), 15296-15303, 2014.

LANDINI, W.; COLLARETA, A.; DI CELMA, C.; MALINVERNO, E.; URBINA, M.; BIANUCCI, G. The early miocene elasmobranch assemblage from Zamaca (Chilcatay formation, Peru). **Journal of South American Earth Sciences**, 91, 352-371, 2019.

LAST, P. R.; NAYLOR, G. J.; MANJAJI-MATSUMOTO, B. M. A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. **Zootaxa**, 4139(3), 345-368, 2016a.

LAST, P. R.; STEVENS, J. D.; SWAINSTON, R., DAVIS, G. Sharks and Rays of Australia (ed.) Australia: CSIRO Publishing, 2009.

LAST, P. R.; WHITE, W. T.; NAYLOR, G. Three new stingrays (Myliobatiformes: Dasyatidae) from the Indo-West Pacific. **Zootaxa**, 4147(4), 377-402, 2016b.

LAST, P. R.; WHITE, W. T.; SERET, B. Taxonomic status of maskrays of the *Neotrygon kuhlii* species complex (Myliobatoidei: Dasyatidae) with the description of three new species from the Indo-West Pacific. **Zootaxa**, 4083(4), 533-561, 2016c.

LAWRENCE, K. T.; SOSDIAN, S.; WHITE, H. E.; ROSENTHAL, Y. North Atlantic climate evolution through the Plio-Pleistocene climate transitions. **Earth and Planetary Science Letters**, 300(3-4), 329-342, 2010.

LEIGH, E. G.; O'DEA, A.; VERMEIJ, G. J. Historical biogeography of the Isthmus of Panama. **Biological Reviews**, 89(1), 148-172, 2014.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, 6(9), 1110-1116, 2015.

LESSA, R.; ANDRADE, H. A.; DE LIMA, K. L.; SANTANA, F. M. Age and growth of the midwater crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai*. **Journal of fish biology**, 89(1), 371-385, 2016.

LISIECKI, L. E.; RAYMO, M. E. Plio–Pleistocene climate evolution: trends and transitions in glacial cycle dynamics. **Quaternary Science Reviews**, 26(1-2), 56-69, 2007.

LOTZE, H. K.; LENIHAN, H. S.; BOURQUE, B. J.; BRADBURY, R. H.; COOKE, R. G.; KAY, M. C.; KIDWELL, S. M.; KIRBY, M. X.; PETERSON, C. H.; JACKSON, J. B. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. **Science**, 312(5781), 1806-1809, 2006.

LUCIFORA, L. O.; CIONE, A. L.; MENNI, R. C.; ESCALANTE, A. H. Tooth row counts, vicariance, and the distribution of the sand tiger shark *Carcharias taurus*. **Ecography**, 26(5), 567-572, 2003.

LUDT, W. B.; ROCHA, L. A. Shifting seas: The impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. **Journal of Biogeography**, 42(1), 25-38, 2015.

MAISEY, J. G. What is an 'elasmobranch'? The impact of palaeontology in understanding elasmobranch phylogeny and evolution. **Journal of Fish Biology**, 80(5), 918-951, 2012.

MARLOW, J. R.; LANGE, C. B.; WEFER, G.; ROSELL-MELÉ, A. Upwelling intensification as part of the Pliocene-Pleistocene climate transition. **Science**, 290(5500), 2288-2291, 2000.

MARTIN, A. P.; PARDINI, A. T.; NOBLE, L. R.; JONES, C. S. Conservation of a dinucleotide simple sequence repeat locus in sharks. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 23(2), 205-213, 2002.

MARTÍNEZ-ORTIZ, J.; AIRES-DA-SILVA, A. M.; LENNERT-CODY, C. E.; MAUNDER, M. N. The Ecuadorian artisanal fishery for large pelagics: species composition and spatio-temporal dynamics. **PloS one**, 10(8), e0135136, 2015.

MENDONÇA, F. F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O. B.; FORESTI, F. Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 21(4), 799-814, 2011.

METHNER, K.; CAMPANI, M.; FIEBIG, J.; LÖFFLER, N.; KEMPF, O.; MULCH, A. Middle Miocene long-term continental temperature change in and out of pace with marine climate records. **Scientific reports**, 10(1), 1-10, 2020.

MOLNAR, P. Comment (2) on "Formation of the Isthmus of Panama" by O'Dea *et al.* **Science Advances**, 3(6), e1602320, 2017.

MONTES, C.; CARDONA, A.; JARAMILLO, C.; PARDO, A.; SILVA, J. C.; VALENCIA, V.; AYALA, C.; PÉREZ-ANGEL, L. C.; RODRIGUEZ-PARRA, L. A.; RAMIREZ, V.; NIÑO, H. Middle Miocene closure of the Central American seaway. **Science**, 348(6231), 226-229, 2015.

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**, 28(4), 941-951, 2018.

MURUA, H.; SANTIAGO, J.; COELHO, R.; ZUDAIRE, I.; NEVES, C.; ROSA, D.; ZUDAIRE, I.; SEMBA, Y.; GENG, Z.; BACH, P.; ARRIZABALAGA, H.; BACH, P.; BAEZ, J.C.; RAMOS, M.L.; ZHU, J.F.; RUIZ, J. Updated Ecological Risk Assessment (ERA) for shark species caught in fisheries managed by the Indian Ocean Tuna Commission (IOTC). IOTC-2018-SC21-14_Rev1. **Indian Ocean Tuna Commission**, 2018.

O'DEA, A.; LESSIOS, H. A.; COATES, A. G.; EYTAN, R. I.; RESTREPO-MORENO, S. A.; CIONE, A. L.; RESTREPO-MORENO, S. A.; CIONE, A. L.; COLLINS, L. S.; DE QUEIROZ, A.; FARRIS, D. W.; NORRIS, R. D.; STALLARD, R. F. Formation of the Isthmus of Panama. **Science advances**, 2(8), e1600883, 2016.

OLIVEIRA, P.; HAZIN, F. H. V.; CARVALHO, F.; REGO, M.; COELHO, R.; PIERCY, A.; BURGESS, G. Reproductive biology of the crocodile shark *Pseudocarcharias kamoharai*. **Journal of Fish Biology**, 76(7), 1655-1670, 2010.

OLIVER, S.; BRACCINI, M.; NEWMAN, S. J.; HARVEY, E. S. Global patterns in the bycatch of sharks and rays. **Marine Policy**, 54, 86-97, 2015.

PAGANI, M.; LIU, Z.; LARIVIERE, J.; RAVELO, A. C. High Earth-system climate sensitivity determined from Pliocene carbon dioxide concentrations. **Nature Geoscience**, 3(1), 27-30, 2010.

PANNELL, J. R. Coalescence in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. **Evolution**, 57(5), 949-961, 2003.

PAULY, D.; ZELLER, D. Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. **Nature communications**, 7, 10244, 2016.

PELLISSIER, L.; LEPRIEUR, F.; PARRAVICINI, V.; COWMAN, P. F.; KULBICKI, M.; LITSIOS, G.; OLSEN, S. M.; WISZ, M. S.; BELLWOOD, D. R.; MOUILLOT, D. Quaternary coral reef refugia preserved fish diversity. **Science**, 344(6187), 1016-1019, 2014.

PIMIENTO, C.; GRIFFIN, J. N.; CLEMENTS, C. F.; SILVESTRO, D.; VARELA, S.; UHEN, M. D.; JARAMILLO, C. The Pliocene marine megafauna extinction and its impact on functional diversity. **Nature ecology & evolution**, 1(8), 1100-1106, 2017.

PLANA, V.; GASCOIGNE, A.; FORREST, L. L.; HARRIS, D.; PENNINGTON, R. T. Pleistocene and pre-Pleistocene *Begonia* speciation in Africa. **Molecular phylogenetics and evolution**, 31(2), 449-461, 2004.

PROVAN, J.; BENNETT, K. D. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. **Trends in ecology & evolution**, 23(10), 564-571, 2008.

QUEIROZ, N.; HUMPHRIES, N. E.; COUTO, A.; VEDOR, M.; DA COSTA, I.; SEQUEIRA, A. M.; MUCIENTES, G.; SANTOS, A. M.; ABASCAL, F. J.; ABERCROMBIE, D. L.; ABRANTES, K. Global spatial risk assessment of sharks under the footprint of fisheries. **Nature**, 572(7770), 461-466, 2019.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em 16 de Julho de 2020.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular biology and evolution**, 19(12), 2092-2100, 2002.

RAY, N.; CURRAT, M.; EXCOFFIER, L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. **Molecular Biology and Evolution**, 20(1), 76-86, 2003.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, 105(3), 767-779, 1983.

ROFF, G.; DOROPOULOS, C.; ROGERS, A.; BOZEC, Y. M.; KRUECK, N. C.; AURELLADO, E.; PRIEST, M.; BIRRELL, C.; MUMBY, P. J. The ecological role of sharks on coral reefs. **Trends in ecology & evolution**, 31(5), 395-407, 2016.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular biology and evolution**, 9(3), 552-569, 1992.

ROHLING, E. J.; FOSTER, G. L.; GRANT, K. M.; MARINO, G.; ROBERTS, A. P.; TAMISIEA, M. E.; WILLIAMS, F. Sea-level and deep-sea-temperature variability over the past 5.3 million years. **Nature**, 508(7497), 477-482, 2014.

ROMANOV, E.V.; WARD, P.; LEVESQUE, J.C.; LAWRENCE, E. Preliminary analysis of crocodile shark (*Pseudocarcharias kamoharai*) distribution and abundance trends in pelagic longline fisheries. **IOTC Working Party on Environment and Bycatch (WPEB)**, Bangkok, Thailand IOTC-2008-WPEB-09, 2008.

ROSA, R. S.; GADIG, O. B. F. Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. **Arquivos de Zoologia**, 45, 89-104, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7793.v45iespp89-104>

ROSA, R.; BAPTISTA, M.; LOPES, V. M.; PEGADO, M. R.; PAULA, J. R.; TRÜBENBACH, K.; LEAL, M. C.; CALADO, R.; REPOLHO, T. Early-life exposure to climate change impairs tropical shark survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1793), 20141738, 2014.

ROSA, R.; RUMMER, J. L.; MUNDAY, P. L. Biological responses of sharks to ocean acidification. **Biology letters**, 13(3), 20160796, 2017.

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**, 34(12), 3299-3302, 2017.

RUDDIMAN, W. F.; RAYMO, M.; MCINTYRE, A. Matuyama 41,000-year cycles: North Atlantic Ocean and northern hemisphere ice sheets. **Earth and Planetary Science Letters**, 80(1-2), 117-129, 1986.

SHEA, K. H.; TO, A. W. L. From boat to bowl: Patterns and dynamics of shark fin trade in Hong Kong—implications for monitoring and management. **Marine Policy**, 81, 330-339, 2017.

SHEVENELL, A. E.; KENNETT, J. P.; LEA, D. W. Middle Miocene ice sheet dynamics, deep-sea temperatures, and carbon cycling: A Southern Ocean perspective. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, 9(2), 2008.

SHIMADA, K. The size of the megatooth shark, *Otodus megalodon* (Lamniformes: Otodontidae), revisited. **Historical Biology**, 1-8, 2019.

SHIMADA, K.; WARD, D. J. The oldest fossil record of the megamouth shark from the late Eocene of Denmark and comments on the enigmatic megachasmid origin. **Acta Palaeontologica Polonica**, 61(4), 839-845, 2016.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139(1), 457-462, 1995.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, 129(2), 555-562, 1991.

STEINKE, D.; BERNARD, A. M.; HORN, R. L.; HILTON, P.; HANNER, R.; SHIVJI, M. S. DNA analysis of traded shark fins and mobulid gill plates reveals a high proportion of species of conservation concern. **Scientific reports**, 7(1), 1-6, 2017.

STEVENS, J. D.; BONFIL, R.; DULVY, N. K.; WALKER, P. A. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. **ICES Journal of Marine Science**, 57(3), 476-494, 2000.

SUCHARD, M. A.; LEMEY, P.; BAELE, G.; AYRES, D. L.; DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. **Virus evolution**, 4(1), vey016, 2018.

TILLET, B. J.; MEEKAN, M. G.; BRODERICK, D.; FIELD, I. C.; CLIFF, G.; OVENDEN, J. R. Pleistocene isolation, secondary introgression and restricted contemporary gene flow in the pig-eye shark, *Carcharhinus amboinensis* across northern Australia. **Conservation Genetics**, 13(1), 99-115, 2012.

UNDERWOOD, C. J. Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. **Paleobiology**, 32(2), 215-235, 2006.

VERÍSSIMO, A.; SAMPAIO, Í.; MCDOWELL, J. R.; ALEXANDRINO, P.; MUCIENTES, G.; QUEIROZ, N.; SILVA, C.; JONES, C. S.; NOBLE, L. R. World without borders—genetic population structure of a highly migratory marine predator, the blue shark (*Prionace glauca*). **Ecology and Evolution**, 7(13), 4768-4781, 2017.

WEIGMANN, S. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. **Journal of Fish Biology**, 88(3), 837-1037, 2016.

WEIGMANN, S. Reply to Borsa (2017): Comment on 'Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity by Weigmann (2016)'. **Journal of fish biology**, 90(4), 1176-1181, 2017.

WU, F.; FANG, X.; HERRMANN, M.; MOSBRUGGER, V.; MIAO, Y. Extended drought in the interior of Central Asia since the Pliocene reconstructed from sporopollen records. **Global and Planetary Change**, 76(1-2), 16-21, 2011.

YOKOYAMA, Y.; ESAT, T. M.; THOMPSON, W. G.; THOMAS, A. L.; WEBSTER, J. M.; MIYAIRI, Y.; SAWADA, C.; AZE, T.; MATSUZAKI, H.; OKUNO, J. I.; FALLON, S. Rapid glaciation and a two-step sea level plunge into the Last Glacial Maximum. **Nature**, 559(7715), 603-607, 2018.

YULE, G. U. II. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, FR S. Philosophical transactions of the Royal Society of London. **Series B, containing papers of a biological character**, 213(402-410), 21-87, 1925.

ZACHOS, J. C.; DICKENS, G. R.; ZEEBE, R. E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. **Nature**, 451(7176), 2008.

ZACHOS, J. C.; SHACKLETON, N. J.; REVENAUGH, J. S.; PÄLIKE, H.; FLOWER, B. P. Climate response to orbital forcing across the Oligocene-Miocene boundary. **Science**, 292(5515), 274-278, 2001b.

ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, 292(5517), 686-693, 2001a.

ZELLER, D.; CASHION, T.; PALOMARES, M.; PAULY, D. Global marine fisheries discards: A synthesis of reconstructed data. **Fish and Fisheries**, 19(1), 30-39, 2018.

ZHAO, W. J.; ZHU, M. Siluro-Devonian vertebrate biostratigraphy and biogeography of China. **Palaeoworld**, 19(1-2), 4-26, 2010.

ZHU, M.; ZHAO, W.; JIA, L.; LU, J.; QIAO, T.; QU, Q. The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters. **Nature**, 458(7237), 469-474, 2009.

ANEXO

Anexo 1. Frequências haplotípicas e sítios polimórficos do fragmento de 758 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial do tubarão-crocodilo *Pseudocarcharias kamoharai*. WEA: Atlântico Equatorial Oeste, SWA: Sudoeste Atlântico, NECA: Atlântico Equatorial Nordeste, GOG: Golfo da Guiné, SEA: Atlântico Sudeste, SWI: Índico Sudoeste. Números referem-se à localização do sítio polimórfico na sequência de DNA.

	WEA	SWA	NECA	GOG	SEA	SWI	9	41	158	239	241	243	247	257	268	269	283	290	292	303	309	310	319	326	330	347	501	564	606	607	628	
H1	16	6	17	11	4	11	A	A	T	G	T	T	A	A	A	A	A	C	T	C	C	C	G	C	T	T	T	A	T	C	T	
H2	1	0	0	0	0	0	.	.	.	A	T	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.
H3	7	0	7	4	1	1	C	.	C	
H4	5	0	10	11	0	5	C	.	.	
H5	3	1	1	2	0	0	C	
H6	4	1	7	6	1	2	C	
H7	2	0	2	2	2	1	.	.	.	A	C	C	G	C	.	C	
H8	3	1	4	4	0	3	C	G	C	.	.	
H9	1	0	0	0	0	0	A	
H10	1	0	0	0	0	0	A	C	.	C	.	.	
H11	1	0	0	1	0	0	A	C	.	C	.	C	
H12	1	1	2	1	0	0	.	.	.	A	.	.	G	C	G	C	.	C	
H13	1	1	2	1	0	0	.	.	.	A	C	C	C	G	C	.	C	
H14	1	0	0	0	1	1	G	.	.	C	
H15	1	0	1	0	1	0	G	.	.	.	
H16	1	0	1	0	0	0	T	
H17	1	0	1	2	0	0	C	
H18	0	1	3	0	0	2	G	C	.	C	
H19	0	0	1	2	1	0	G	C	.	.	
H20	0	0	1	0	0	0	.	.	.	A	C	C	G	.	.	C	
H21	0	0	1	0	0	0	.	.	.	A	C	C	G	C	.	.	
H22	0	0	2	2	0	2	C	.	C	.	.	
H23	0	0	3	3	1	1	C	.	C	.	C	
H24	0	0	1	0	0	0	C	C	.	C	.	C	
H25	0	0	1	0	0	0	A	C	.	C		

