

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE B IOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**Estudos genéticos em *Squalus mitsukurii* (Squalidae) na costa da
américa, utilizando SNPs**

Ailton Amarante Ariza

Botucatu - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE B IOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**Estudos genéticos em *Squalus mitsukurii* (Squalidae) na costa da
américa, utilizando SNPs**

Aluno: Ailton Amarante Ariza

Orientadora: Dra. Profa. Vanessa Paes da Cruz

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Botucatu - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ariza, Ailton Amarante.

Estudos genéticos em *Squalus mitsukurii* (Squalidae) na costa da américa, utilizando SNPs / Ailton Amarante Ariza.
- Botucatu, 2023

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

Orientador: Vanessa Paes da Cruz

Capes: 20406010

1. Tubarão (Peixe). 2. *Squalus*. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Genética populacional. 5. Biologia - População.

Palavras-chave: Genética; Genética populacional; Polimorfismo de nucleotídeo único; *Squalus mitsukurii*.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, por todo apoio e por sempre me incentivarem mesmo nos momentos difíceis durante todos esses anos.

A minha orientadora Vanessa pelas correções, ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho, pela ajuda e paciência que me ajudaram a finalizar este trabalho.

Aos professores Claudio e Fausto por todo apoio, suporte e auxílio.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e pelo apoio, em especial para minhas companheiras de laboratório Aisni, Beatriz B., Beatriz D., Giovana e Najla.

Aos colaboradores deste projeto, Dr. Sergio M. Delpiani, Pollyana Roque e ao Instituto de Biotecnologia (IBETEC- Unesp Botucatu).

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da Unesp de Botucatu, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 130332/2021-6), por ser a agência de fomento responsável pela minha bolsa e assim proporcionaram a realização do meu mestrado.

Resumo

Conhecidos popularmente como cação-bagre, os pequenos tubarões do gênero *Squalus* podem atingir até 1,5 m. As espécies deste gênero estão distribuídas em todo o mundo, algumas com ampla distribuição e outras com elevado grau de endemismo. No entanto, devido as suas características biológicas como, crescimento lento, maturação sexual tardia e poucos filhotes por ninhada, estes tubarões estão cada vez mais ameaçados de extinção, principalmente pelos efeitos da pesca excessiva. Atualmente, *Squalus mitsukurii* está classificado como "em perigo" na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). *Squalus mitsukurii* é considerado residente das águas do leste asiático, tendo distribuição da costa da Coreia até o Vietnã, porém indivíduos no Oceano Atlântico já foram nomeados como *S. mitsukurii* ou *S. cf. mitsukurii*. Entender sobre a biologia reprodutiva, ecologia e estrutura populacional é de grande importância para traçar estratégias de manejo e conservação de espécies ameaçadas. Nesse contexto o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar a diversidade e estrutura populacional de *S. mitsukurii* em três populações na costa da América, com a utilização de marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Foram analisadas as amostras coletadas no oceano Pacífico, na costa da Califórnia ($n = 11$) nos Estados Unidos e em duas localidades do Atlântico nos estados brasileiros de Pernambuco ($n = 17$) e São Paulo ($n = 10$), totalizando 38 amostras. Após a construção da biblioteca genômica através da metodologia de ddRAD (*double digest Restriction Associated DNA*) e sequenciamento Illumina, foi obtido um total de 33.480.939 sequências. Após etapas bioinformáticas foram retidos 8.206 marcadores SNPs. Os índices de diversidade genética apresentaram valores de 0,077 a 0,222 para heterozigosidades observada, enquanto a heterozigosidade esperada apresentou valores de 0,098 a 0,306. Os resultados obtidos da análise de coeficiente de endogamia (F_{IS}) apresentaram valores positivos, indicando a ocorrência de endogamia. Os índices de estruturação genética obtidos através da análise de F_{ST} variou de 0,119 apresentados entre as populações da Califórnia e São Paulo, à 0,049 entre as populações de São Paulo e Pernambuco, indicando estruturação genética moderada. Indícios de estruturação genética também foi observada na análise de DAPC, que corroborou com a separação em três cluster genéticos para cada região analisada. Este é o primeiro estudo a identificar e caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional em *Squalus mitsukurii*, os resultados obtidos neste estudo indicam a existência de três estoques genéticos em *S. mitsukurii*, estudos contendo outras localidades são necessários para identificar outros estoques e conectividade entre as populações.

Abstract

Popularly known as catsharks, the small sharks of the genus *Squalus* can reach up to 1.5 m. Species of this genus are distributed worldwide, some with wide distribution and others with a high degree of endemism. However, due to their biological characteristics such as slow growth, late sexual maturity, and few offspring per litter, these sharks are increasingly threatened with extinction, mainly due to the effects of overfishing. Currently, *Squalus mitsukurii* is classified as "endangered" on the IUCN Red List of Threatened Species (International Union for Conservation of Nature). *Squalus mitsukurii* is considered a resident of East Asian waters, with a distribution from the coast of Korea to Vietnam, although individuals in the Atlantic Ocean have been named as *S. mitsukurii* or *S. cf. mitsukurii*. Understanding the reproductive biology, ecology, and population structure is of great importance for developing management and conservation strategies for threatened species. In this context, the present study aimed to characterize and identify the diversity and population structure of *S. mitsukurii* in three populations along the American coast, using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers. Samples collected in the Pacific Ocean, off the coast of California ($n = 11$) in the United States, and in two locations in the Atlantic Ocean in the Brazilian states of Pernambuco ($n = 17$) and São Paulo ($n = 10$) were analyzed, totaling 38 samples. After constructing the genomic library using the ddRAD (double digest Restriction Associated DNA) methodology and Illumina sequencing, a total of 33,480,939 sequences were obtained. After bioinformatic steps, 8,206 SNP markers were retained. Genetic diversity indices showed values of 0.077 to 0.222 for observed heterozygosity, while expected heterozygosity showed values of 0.098 to 0.306. The results obtained from the analysis of the coefficient of inbreeding (F_{IS}) showed positive values, indicating the occurrence of inbreeding. The genetic structuring indices obtained through the F_{ST} analysis ranged from 0.119 between the populations of California and São Paulo to 0.049 between the populations of São Paulo and Pernambuco, indicating moderate genetic structuring. Evidence of genetic structuring was also observed in the Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), which corroborated the separation into three genetic clusters for each analyzed region. This is the first study to identify and characterize the genetic diversity and population structure in *Squalus mitsukurii*. The results obtained in this study indicate the existence of three genetic stocks in *S. mitsukurii*, and studies containing other locations are necessary to identify other stocks and connectivity between populations.

Sumário

1. Introdução	8
2. Objetivos	12
3. Material	12
3.1 <i>Obtenção das amostras</i>	12
4. Métodos	13
4.1 <i>Obtenção de DNA</i>	13
4.2 <i>Elaboração das bibliotecas de SNPs</i>	14
4.3 <i>Ligação dos adaptadores</i>	14
4.4 <i>Indexação</i>	15
4.5 <i>Pool das amostras</i>	15
4.6 <i>Análises dos resultados</i>	15
4.6.1 <i>Detecção e filtragem de SNPs</i>	15
4.6.2 <i>Análises de diversidade genética populacional</i>	17
5. Resultados	17
6. Discussão	20
7. Referencias	23
Apêndice 1	30

1. Introdução

Os ambientes marinhos apresentam diversos ecossistemas e uma variedade de grupos de organismos, incluindo os elasmobrânquios (Santos *et al.* 2020, Martins *et al.* 2022). Os elasmobrânquios representados pelos tubarões e as raias ocupam os mais diferentes níveis da cadeia trófica (Frisch *et al.* 2016, Bengil *et al.* 2022), apresentando crescimento lento, maturidade sexual tardia e poucos filhotes por ninhada (Cortés 2000, Stevens *et al.* 2000, Natanson *et al.* 2017, Penfold & Wyffles 2019, Ebert *et al.* 2021, Whitenack *et al.* 2022).

Nas últimas décadas os elasmobrânquios sofreram um significativo declínio populacional em diversas espécies de tubarões e raias pelo mundo, aumentando consideravelmente os riscos de extinção de algumas espécies (Roff *et al.* 2018, Pacoureau *et al.* 2023, Sherman *et al.* 2023). Estima-se que 32,6% das espécies de elasmobrânquios encontram-se ameaçadas de extinção, entretanto, levando em conta as espécies que ainda se encontram como dados deficientes, este número pode ser ainda maior (Dulvy *et al.* 2021).

A pesca é um dos principais contribuintes para a diminuição das populações de tubarões (Pacoureau *et al.* 2023, Sherman *et al.* 2023), podendo ocorrer pelos efeitos da pesca direcionada (Shea & To, 2017, Yano *et al.* 2022, Sherman *et al.* 2023) e ou pesca acessória (Santos *et al.* 2022, Cronin *et al.* 2023, Sherman *et al.* 2023). Há registros que algumas espécies de tubarões do gênero *Squalus* também vem sendo super exploradas pela pesca direcionada há mais de 120 anos (Yano *et al.* 2022).

O gênero *Squalus* (Linnaeus, 1758) abriga espécies de tubarões popularmente conhecidos por cação bagre, este gênero apresenta mais de 35 espécies validas (Last *et al.* 2007, Daly-Engel *et al.* 2018, Pflieger *et al.* 2018, Ziadi-Künzli *et al.* 2020, Ebert *et al.* 2021). Estes são considerados tubarões de pequeno porte, podendo atingir até 1, 5m de comprimento, são comumente encontrados até 1000 m de profundidade, possuem hábito demersal e distribuição circunglobal (Compagno, 1984; Compagno *et al.* 2005, Ebert *et al.* 2021). Dentre as espécies do gênero, foram identificados comportamento de segregação por sexo e idade, e ainda, algumas espécies são consideradas residentes, enquanto outras realizam migrações de longa distância (Ebert *et al.* 2021).

Assim como os demais elasmobrânquios, a história de vida das espécies do gênero *Squalus* também é caracterizada por crescimento lento, maturação sexual tardia em média 15 anos e longa expectativa de vida, com indivíduos registrados com mais de 40 anos (Ebert *et al.* 2010, Ebert *et al.* 2021, Bengil *et al.* 2022), algumas espécies como *S. acanthias* podem apresentar período gestacional de até 24 meses, sendo um dos períodos mais longos registrados em vertebrados (Natanson *et al.* 2017, Ebert *et al.* 2021).

Este gênero, possui caracteres fenotípicos limitados para identificação, como contagem de vertebrae e medidas corporais, no qual se sobrepõe entre as espécies (Ebert *et al.* 2013, Viana *et al.* 2016, Veríssimo *et al.* 2017, Bellodi *et al.* 2018, Pflieger *et al.* 2018). Estudos taxonômicos e moleculares revelaram que este gênero é composto por três grandes complexos de espécies, sendo o complexo *S. suckleyi/S. acanthias*; *S. blainville/S. megalops/S. raoulensis/S. brevirostris*; e o terceiro complexo denominado complexo *S. mitsukurii*, comportando o maior número de espécies (Veríssimo *et al.* 2017, Bellodi *et al.* 2018, Ferrari *et al.* 2021).

As espécies do gênero *Squalus*, como *S. montalbani*, *S. japonicus*, *S. hemipinnis*, *S. formosus*, *S. blainville*, *S. bucephalus*, *S. quasimodo*, *S. altipinnis*, *S. melanurus*, *S. mahia*, *S. albicaudus* e *S. lobularis* encontram-se classificadas com algum grau de ameaça ou como dados deficientes na União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês *International Union for Conservation of Nature*, IUCN (Finucci & Kine 2018, Finucci & White 2018, Finucci *et al.* 2019, Graham 2019, Dulvy *et al.* 2020, Pollom & Herman 2020, Pollom *et al.* 2020, Rigby *et al.* 2020, Finucci & Pacoureaux 2021).

Squalus mitsukurii (Jordan e Snyder, 1903) é caracterizado morfologicamente por apresentar focinho arredondado e longo, um curto espinho na nadadeira dorsal e a presença de uma barra preta na parte posterior nadadeira caudal (Last *et al.* 2007, Viana *et al.* 2016, Ebert *et al.* 2021) (Figura 1). Sua descrição foi realizada a partir de um indivíduo coletado próximo ao Japão, e atualmente, é considerado residente do Pacífico, com distribuição no leste asiático, abrangendo a costa da Coreia do Norte até a costa do Vietnã (Finucci *et al.* 2020). Entretanto, indivíduos da espécie já foram registrados em várias regiões dos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, no qual foram nomeados como *S. mitsukurii* ou *S. cf. mitsukurii* (Viana *et al.* 2016)

Squalus mitsukurii apresenta expectativa de vida longa, em torno de 23 anos em machos e 26 anos em fêmeas, alcança a maturidade sexual tardiamente, em média com 09 anos e 15 anos, respectivamente (Cotton *et al.* 2011). Apresentam poucos filhotes por ninhada

com cerca de 3 a 11 filhotes por ninhada (Fischer *et al.* 2006) e apresenta o modo reprodutivo do tipo viviparidade lecitotrófica (Oddone *et al.* 2010), ou seja, há o desenvolvimento intrauterino do embrião, o embrião em desenvolvimento obtém seus nutrientes através do vitelo, que é armazenada no saco vitelínico conectado diretamente ao seu sistema digestivo (Hamlett 2011).



Figura 1. Exemplar de *Squalus mitsukurii*. Foto: Sarah Tházia Viana de Figueirêdo, 2018.

Squalus mitsukurii é capturada acidentalmente pela pesca artesanal e comercial (Ziadi-Kunzli *et al.* 2020) e em diferentes artefatos pesqueiros, como rede de arrasto demersal, espinhel, e possivelmente, rede de emalhe e rede de espera (Finucci *et al.* 2020). Segundo a lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN, *S. mitsukurii* encontra-se listada como “em perigo” (Finucci *et al.* 2020), porém no Brasil, a espécie está classificada como “dados deficientes” no Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade, do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio, 2022).

Para traçar estratégias efetivas de gestão e conservação de espécies, é importante antes compreender sobre a biologia reprodutiva, ecologia, diversidade genética e estrutura populacional das espécies (Santos *et al.* 2020, Postaire *et al.* 2022). Os objetivos de gestão muitas vezes se concentram em populações distintas ou linhagens independentes, aspectos difíceis de determinar em algumas espécies. No entanto, os métodos de genética populacional fornecem um meio de delinear padrões de distribuição geográfica de acordo com a variação molecular das populações, assim inferindo processos e hipóteses, que geram e mantêm esses padrões (Allendorf 2017, De Kort *et al.* 2021, Stronen *et al.* 2022).

A genética de populações é uma ferramenta que desempenha um papel importante no manejo e conservação de espécies ameaçadas de extinção (Frankham 2010), pois revela peculiaridades nas populações, como a endogamia, comprometendo a viabilidade

de populações naturais ao longo do tempo (Frankham *et al.* 2012). A manutenção da diversidade genética é um dos fundamentos da genética da conservação, principalmente porque esta confere plasticidade às espécies frente a uma série de variáveis ambientais e sustenta seu potencial evolutivo (Bernatchez 2016, Willi *et al.* 2022).

Nas últimas décadas, os marcadores moleculares de polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) vem demonstrando ser um marcador molecular resolutivo, permitindo inferir a diversidade e estrutura populacional com precisão em espécies não modelo, ou seja espécies que não apresentam genoma de referência (Andrews *et al.* 2016, Green *et al.* 2019, Martins *et al.* 2022, Nelson *et al.* 2022) e ainda, um eficiente marcador genético para questões relacionadas a genética da conservação (Morin *et al.* 2009, McMahon *et al.* 2014, Zimmerman *et al.* 2020).

Os SNPs são mutações pontuais no DNA que foram fixadas ao longo das gerações. Estes polimorfismos possuem ampla distribuição pelo genoma e podem ser encontrados em regiões de íntrons e éxons (Han *et al.* 2019). A utilização de marcadores moleculares do tipo SNPs em espécies não modelo, foi possível com o avanço de tecnologias de sequenciamento, como o sequenciamento de nova geração (NGS) associado com outras metodologias, como o RADseq (*Restriction-site associated DNA sequencing*), que se baseia na fragmentação do DNA, com o uso de uma ou mais enzimas de restrição, no qual permitirá uma redução do genoma da espécie a ser analisado (Baird *et al.* 2008, Peterson *et al.* 2012).

A partir da técnica original de RADseq, derivadas metodologia surgiram, como o ddRADseq (*Double digest RAD sequencing*) (Peterson *et al.* 2012). Em suma a técnica ddRAD baseia-se na utilização de duas enzimas de restrição para realizar a digestão do DNA genômico, para posteriormente a construção da biblioteca genômica e o sequenciamento massivo de representações reduzidas do genoma, tendo como finalidade a obtenção de marcadores SNPs (Andrews *et al.* 2016, Driller *et al.* 2020). A utilização do ddRADseq ganhou popularidade por apresentar ótima relação custo-benefício em relação à quantidade de dados adquiridos, rápida, de fácil replicação e principalmente pela possibilidade da aplicação em espécies não modelo (Siccha-Ramirez *et al.* 2018, Green *et al.* 2019, Devloo-Delva *et al.* 2019, Green *et al.* 2022).

Apesar da utilização de SNPs para obtenção de dados populacionais de tubarões ter se mostrado resolutiva em diferentes grupos (Green *et al.* 2019, Devloo-Delva *et al.* 2019, Green *et al.* 2022), muitas espécies ainda continuam com total ausência de informações genéticas populacionais, como *S. mitsukurii*. Portanto é necessária

maior atenção em estudos genéticos para esta espécie, que nos últimos anos, vem sofrendo com a ação antropogênica, com isso, uma melhor gestão e conseqüentemente, uma melhor ação de conservação sobre essa espécie poderá ser realizada.

7. Referencias

- Adachi AMC de L. Estrutura genética populacional do tubarão *Squalus albicaudus* (Chondrichthyes: Squaliformes) no oceano Atlântico, com base em marcadores genéticos moleculares. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/217019>
- Allendorf FW. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*. 2017;26(2):420-430. doi:[10.1111/mec.13948](https://doi.org/10.1111/mec.13948)
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe PA. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* 2016;17(2):81-92. doi:[10.1038/nrg.2015.28](https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28)
- Ariza AA, Adachi AMCL, Roque P, et al. DNA Barcoding and Species Delimitation for Dogfish Sharks Belonging to the *Squalus* Genus (Squaliformes: Squalidae). *Diversity*. 2022;14(7):544. doi:[10.3390/d14070544](https://doi.org/10.3390/d14070544)
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, et al. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. Fay JC, ed. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3376. doi:[10.1371/journal.pone.0003376](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376)
- Bedulli C, Ferrette B, Camargo S, et al. 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*. 2019;29. doi:[10.1002/aqc.3029](https://doi.org/10.1002/aqc.3029)
- Bellodi A, Porcu C, Cau A, et al. Investigation on the genus *Squalus* in the Sardinian waters (Central-Western Mediterranean) with implications on its management. *Mediterranean Marine Science*. 2018;19(2):256-272. doi:[10.12681/mms.15426](https://doi.org/10.12681/mms.15426)
- Bengil EGT. Biology and Ecology of *Squalus Blainville* (Risso, 1827) from the Eastern Mediterranean. *Thalassas*. 2022;38(2):1423-1432. doi:[10.1007/s41208-022-00482-w](https://doi.org/10.1007/s41208-022-00482-w)
- Bernard AM, Finnegan KA, Pavinski Bitar P, Stanhope MJ, Shivji MS. Genomic Assessment of Global Population Structure in a Highly Migratory and Habitat Versatile Apex Predator, the Tiger Shark (*Galeocerdo cuvier*). *Journal of Heredity*. 2021;112(6):497-507. doi:[10.1093/jhered/esab046](https://doi.org/10.1093/jhered/esab046)

Bernatchez L. On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes. *Journal of Fish Biology*. 2016;89(6):2519-2556. doi:[10.1111/jfb.13145](https://doi.org/10.1111/jfb.13145)

Biodiversidade ICM de C da. SALVE - Público. Accessed July 24, 2022. <https://salve.icmbio.gov.br>

Boza BR. Diversidade genética e análise de parentesco em tubarões da espécie *Squalus acanthias* (Chondrichthyes: Squalidae) no oceano Atlântico, por meio de SNPs Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/217582>

Campos M, Conn JE, Alonso DP, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):76. doi:[10.1186/s13071-017-2014-y](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2014-y)

Cassandra Rigby (James Cook University Q, Terence Walker (Melbourne University V, Group) BF (IUCN SSS, et al. IUCN Red List of Threatened Species: *Squalus mitsukurii*. *IUCN Red List of Threatened Species*. Published online November 21, 2019. Accessed February 9, 2023. <https://www.iucnredlist.org/species/152781967/2957982>

Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes| genomes| genetics*. 2011;1(3):171-182.

Compagno LJ. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. *FAO species catalogue*. 1984;4:vii+ 249.

Compagno LJV, Dando M, Fowler S. *Sharks of the World.*, (Princeton University Press: Princeton, NJ.). 2005.

Corrigan S, Lowther AD, Beheregaray LB, et al. 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*. 2018; 6:187. doi:[10.3389/fevo.2018.00187](https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00187)

Cortés E. Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Reviews in Fisheries Science*. 2000;8(4):299-344. doi:[10.1080/10408340308951115](https://doi.org/10.1080/10408340308951115)

Cotton CF, Grubbs RD, Daly-Engel TS, Lynch PD, Musick JA. Age, growth and reproduction of a common deep-water shark, shortspine spurdog (*Squalus* cf. *mitsukurii*), from Hawaiian waters. *Marine and Freshwater research*. 2011;62(7):811. doi:[10.1071/MF10307](https://doi.org/10.1071/MF10307)

Cronin MR, Amaral JE, Jackson AM, Jacquet J, Seto KL, Croll DA. Policy and transparency gaps for oceanic shark and rays in high seas tuna fisheries. *Fish and Fisheries*. 2023;24(1):56-70. doi:[10.1111/faf.12710](https://doi.org/10.1111/faf.12710)

Daly-Engel T, Grubbs R, Feldheim K, Bowen B, Toonen R. Is multiple mating beneficial or unavoidable? Low multiple paternity and genetic diversity in the shortspine spurdog *Squalus mitsukurii*. *Marine Ecology Progress Series*. 2010;403:255-267. doi:[10.3354/meps08417](https://doi.org/10.3354/meps08417)

Daly-Engel TS, Koch A, Anderson JM, Cotton CF, rubbs RD. Description of a new deep-water dogfish shark from Hawaii, with comments on the *Squalus mitsukurii* species

complex in the West Pacific. *Zookeys*. 2018;(798):135-157. doi:[10.3897/zookeys.798.28375](https://doi.org/10.3897/zookeys.798.28375)

De Kort H, Prunier JG, Ducatez S, et al. Life history, climate and biogeography interactively affect worldwide genetic diversity of plant and animal populations. *Nat Commun*. 2021;12(1):516. doi:[10.1038/s41467-021-20958-2](https://doi.org/10.1038/s41467-021-20958-2)

Devloo-Delva F, Maes GE, Hernández SI, et al. Accounting for kin sampling reveals genetic connectivity in Tasmanian and New Zealand school sharks, *Galeorhinus galeus*. *Ecol Evol*. 2019;9(8):4465-4472. doi:[10.1002/ece3.5012](https://doi.org/10.1002/ece3.5012)

Domingues RR, Hilsdorf AWS, Gadig OBF. The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*. 2018;19(3):501-525. doi:[10.1007/s10592-017-1038-3](https://doi.org/10.1007/s10592-017-1038-3)

Driller M, Arantes LS, Vilaça ST, et al. *Achieving High-Quality DdRAD-like Reference Catalogs for Non-Model Species: The Power of Overlapping Paired-End Reads*. *Evolutionary Biology*; 2020. doi:[10.1101/2020.04.03.024331](https://doi.org/10.1101/2020.04.03.024331)

Dulvy NK, Pacoureau N, Rigby CL, et al. Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. *Current Biology*. 2021;31(21):4773-4787.e8. doi:[10.1016/j.cub.2021.08.062](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.062)

Dulvy, N.K., Bineesh, K.K., Cheok, J., Dharmadi, Finucci, B., Sherman, C.S. & VanderWright, J. 2020. *Squalus hemipinnis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T161410A124480327. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T161410A124480327.en>. Accessed on 09 February 2023.

Ebert D, Fowler S, Compagno L. *Sharks of the World: A Fully Illustrated Guide.*; 2013.

Ebert D, White W, Goldman K, Compagno L, Daly-Engel T, Ward R. Resurrection and redescription of *Squalus suckleyi* (Girard, 1854) from the North Pacific, with comments on the *Squalus acanthias* subgroup (Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa*. 2010;2612:22-40. doi:[10.11646/zootaxa.2612.1.2](https://doi.org/10.11646/zootaxa.2612.1.2)

Ebert DA, Fowler S, Dando M. *Sharks of the World: A Complete Guide*. Princeton University Press; 2021.

Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564-567. doi:[10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x)

Ferrari A, Di Crescenzo S, Cariani A, et al. Puzzling over spurdogs: molecular taxonomy assessment of the *Squalus* species in the Strait of Sicily. *The European Zoological Journal*. 2021;88(1):181-190. doi:[10.1080/24750263.2020.1849436](https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1849436)

Finucci, B. & Kyne, P.M. 2018. *Squalus melanurus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T41860A116737441. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T41860A116737441.en>. Accessed on 09 February 2023.

Finucci, B., Derrick, D. & Pacoureau, N. 2021. *Squalus blainville*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T169229923A179510767. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-2.RLTS.T169229923A179510767.en>. Accessed on 09 February 2023.

- Finucci, B., et al. "Squalus mitsukurii". The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T152781967A2957982. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T152781967A2957982.en>. Accessed on 18 August 2022.
- Finucci, B., Kyne, P.M. & White, W.T. 2018. *Squalus bucephalus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T161703A116739715. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T161703A116739715.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Finucci, B., White, W.T., Cavanagh, R.D. & Lisney, T.J. 2019. *Squalus altipinnis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T158616A68644334. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T158616A68644334.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Frankham R, Ballou JD, Dudash MR, et al. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*. 2012;153:25-31. doi:[10.1016/j.biocon.2012.04.034](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.04.034)
- Frankham R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*. 2010;143(9):1919-1927. doi:[10.1016/j.biocon.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.011)
- Frisch AJ, Ireland M, Rizzari JR, et al. Reassessing the trophic role of reef sharks as apex predators on coral reefs. *Coral Reefs*. 2016;35(2):459-472. doi:[10.1007/s00338-016-1415-2](https://doi.org/10.1007/s00338-016-1415-2)
- Frisch, Ashley J., et al. "Reassessing the Trophic Role of Reef Sharks as Apex
- Graham, K.J. 2019. *Squalus montalbani*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T161404A68645208. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T161404A68645208.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Green ME, Appleyard SA, White W, Tracey S, Devloo-Delva F, Ovenden JR. Novel multimarker comparisons address the genetic population structure of silvertip sharks (*Carcharhinus albimarginatus*). *Mar Freshwater Res*. 2019;70(7):1007. doi:[10.1071/MF18296](https://doi.org/10.1071/MF18296)
- Green ME, Appleyard SA, White WT, Tracey SR, Heupel MR, Ovenden JR. Updated connectivity assessment for the scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) in Pacific and Indian Oceans using a multi-marker genetic approach. *Fisheries Research*. 2022;251:106305. doi:[10.1016/j.fishres.2022.106305](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106305)
- Hamlett WC. *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids, and Chimaeras*, Volume 3. CRC Press; 2011..
- Han S, Miller JE, Byun S, et al. Identification of exon skipping events associated with Alzheimer's disease in the human hippocampus. *BMC Medical Genomics*. 2019;12(1):13. doi:[10.1186/s12920-018-0453-8](https://doi.org/10.1186/s12920-018-0453-8)
- Han S, Miller JE, Byun S, et al. Identification of exon skipping events associated with Alzheimer's disease in the human hippocampus. *BMC Medical Genomics*. 2019;12(1):13. doi:[10.1186/s12920-018-0453-8](https://doi.org/10.1186/s12920-018-0453-8)
- Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 2011;27(21):3070-3071.

- Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*. 2010;11(1):1-15.
- Jorgensen S, Micheli F, White T, et al. Emergent research and priorities for shark and ray conservation. *Endang Species Res*. 2022;47:171-203. doi:[10.3354/esr01169](https://doi.org/10.3354/esr01169)
- Last P, White W, Pogonoski J. *Descriptions of New Dogfishes of the Genus Squalus (Squaloidea: Squalidae)*.; 2007.
- Last PR, White WT, Pogonoski JJ, Gledhill DC, Yearsley GK, Ward RD. Application of a rapid taxonomic approach to the genus *Squalus*. Published online 2007.
- Martins NT, Macagnan LB, Cassano V, Gurgel CFD. Brazilian marine phylogeography: A literature synthesis and analysis of barriers. *Molecular Ecology*. 2022;31(21):5423-5439. doi:[10.1111/mec.16684](https://doi.org/10.1111/mec.16684)
- McMahon BJ, Teeling EC, Höglund J. How and why should we implement genomics into conservation? *Evolutionary Applications*. 2014;7(9):999-1007. doi:[10.1111/eva.12193](https://doi.org/10.1111/eva.12193)
- Meirmans PG. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 2006;60(11):2399-2402.
- Morin PA, Martien KK, Taylor BL. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9(1):66-73. doi:[10.1111/j.1755-0998.2008.02392.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02392.x)
- Natanson LJ, McCandless CT, James K, Hoey J. Gestation period and pupping seasonality of female spiny dogfish (*Squalus acanthias*) off southern New England. *Fishery Bulletin*. 2017;115(4):473-483. doi:[10.7755/FB.115.4.4](https://doi.org/10.7755/FB.115.4.4)
- Nelson LN, Jones CM, McDowell JR. Rangewide Population Structure of the Clearnose Skate. *Transactions of the American Fisheries Society*. 2022;151(3):356-372. doi:[10.1002/tafs.10351](https://doi.org/10.1002/tafs.10351)
- Pacoureau N, Carlson JK, Kindsvater HK, et al. Conservation successes and challenges for wide-ranging sharks and rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023;120(5):e2216891120. doi:[10.1073/pnas.2216891120](https://doi.org/10.1073/pnas.2216891120)
- Paris JR, Stevens JR, Catchen JM. Lost in parameter space: a road map for STACKS. Johnston S, ed. *Methods Ecol Evol*. 2017;8(10):1360-1373. doi:[10.1111/2041-210X.12775](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12775)
- Penfold LM, Wyffels JT. Reproductive Science in Sharks and Rays. In: Comizzoli P, Brown JL, Holt WV, eds. *Reproductive Sciences in Animal Conservation*. Vol 1200. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2019:465-488. doi:[10.1007/978-3-030-23633-5_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5_15)
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. Orlando L, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37135. doi:[10.1371/journal.pone.0037135](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135)
- Pfleger MO, Grubbs RD, Cotton CF, Daly-Engel TS. *Squalus clarkae* sp. nov., a new dogfish shark from the Northwest Atlantic and Gulf of Mexico, with comments on the

- Squalus mitsukurii* species complex. *Zootaxa*. 2018;4444(2):101. doi:[10.11646/zootaxa.4444.2.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4444.2.1)
- Pirog A, Magalon H, Poirout T, Jaquemet S. Reproductive biology, multiple paternity and polyandry of the bull shark *Carcharhinus leucas*. *J Fish Biol*. 2019;95(5):1195-1206. doi:[10.1111/jfb.14118](https://doi.org/10.1111/jfb.14118)
- Pollom, R., Bennett, R., Leslie, R., McCord, M.E. & Samoilys, M. 2020. *Squalus mahia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T124357052A124545003. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T124357052A124545003.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Pollom, R., Rincon, G. & Herman, K. 2020. *Squalus albicaudus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T129495269A129495382. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T129495269A129495382.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Pollom, R., Rincon, G. & Herman, K. 2020. *Squalus lobularis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T129495487A129495492. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T129495487A129495492.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Pollom, R., Rincon, G. & Herman, K. 2020. *Squalus quasimodo*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T129495645A129495650. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T129495645A129495650.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Postaire BD, Feldheim KA, Clementi GM, et al. Small localized breeding populations in a widely distributed coastal shark species. *Conserv Genet*. 2022;23(1):51-61. doi:[10.1007/s10592-021-01398-3](https://doi.org/10.1007/s10592-021-01398-3)
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Rigby, C.L., Chen, X., Ebert, D.A., Herman, K., Ho, H., Hsu, H. & Zhang, J. 2020. *Squalus formosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T169229426A169229869. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T169229426A169229869.en>. Accessed on 09 February 2023.
- Roff G, Brown CJ, Priest MA, Mumby PJ. Decline of coastal apex shark populations over the past half century. *Commun Biol*. 2018;1(1):223. doi:[10.1038/s42003-018-0233-1](https://doi.org/10.1038/s42003-018-0233-1)
- Santos R, Novoa-Pabon A, Silva H, Pinho M. Elasmobranch species richness, fisheries, abundance and size composition in the Azores archipelago (NE Atlantic). *Marine Biology Research*. 2020;16(2):103-116. doi:[10.1080/17451000.2020.1718713](https://doi.org/10.1080/17451000.2020.1718713)
- Sherman CS, Simpfendorfer CA, Pacoureau N, et al. Half a century of rising extinction risk of coral reef sharks and rays. *Nat Commun*. 2023;14(1):15. doi:[10.1038/s41467-022-35091-x](https://doi.org/10.1038/s41467-022-35091-x)
- Siccha-Ramirez ZR, Maroso F, Pardo BG, Fernández C, Martínez P, Oliveira C. SNP identification and validation on genomic DNA for studying genetic diversity in *Thunnus albacares* and *Scomberomorus brasiliensis* by combining RADseq and long read high throughput sequencing. *Fisheries Research*. 2018;198:189-194. doi:[10.1016/j.fishres.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.09.002)

- Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*. 2000;57(3):476-494. doi:[10.1006/jmsc.2000.0724](https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0724)
- Stronen AV, Norman AJ, Vander Wal E, Paquet PC. The relevance of genetic structure in ecotype designation and conservation management. *Evolutionary Applications*. 2022;15(2):185-202. doi:[10.1111/eva.13339](https://doi.org/10.1111/eva.13339)
- Veríssimo A, Zaera-Perez D, Leslie R, et al. Molecular diversity and distribution of eastern Atlantic and Mediterranean dogfishes *Squalus* highlight taxonomic issues in the genus. *Zoologica Scripta*. 2017;46(4):414-428. doi:[10.1111/zsc.12224](https://doi.org/10.1111/zsc.12224)
- Viana STDF, Carvalho MRD, Gomes UL. Taxonomy and morphology of species of the genus *Squalus* Linnaeus, 1758 from the Southwestern Atlantic Ocean (Chondrichthyes: Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa*. 2016;4133(1):1. doi:[10.11646/zootaxa.4133.1.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4133.1.1)
- Whitenack LB, Kim SL, Sibert EC. Bridging the Gap Between Chondrichthyan Paleobiology and Biology. In: *Biology of Sharks and Their Relatives*. 3rd ed. CRC Press; 2022.
- Willi Y, Kristensen TN, Sgrò CM, Weeks AR, Ørsted M, Hoffmann AA. Conservation genetics as a management tool: The five best-supported paradigms to assist the management of threatened species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119(1):e2105076119. doi:[10.1073/pnas.2105076119](https://doi.org/10.1073/pnas.2105076119)
- Yano T, Hattori T, Shibata Y, Tanaka S. Over 120 years of landing trends in Japan, for the commercially exploited shark species, *Squalus suckleyi*. *Fisheries Research*. 2022;249:106257. doi:[10.1016/j.fishres.2022.106257](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106257)
- Ziadi-Künzli F, Soliman T, Imai H, Sakurai M, Maeda K, Tachihara K. Re-evaluation of deep-sea dogfishes (genus *Squalus*) in Japan using phylogenetic inference. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2020;160:103261. doi:[10.1016/j.dsr.2020.103261](https://doi.org/10.1016/j.dsr.2020.103261)
- Zimmerman SJ, Aldridge CL, Oyler-McCance SJ. An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. *BMC Genomics*. 2020;21(1):382. doi:[10.1186/s12864-020-06783-9](https://doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9)