

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



**Desenvolvimento de marcadores genéticos para
identificação de espécies de tubarões comercializados
no Brasil**

Marcelo Linardi Niero Rocha

Botucatu / SP

Agosto – 2013

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

**Desenvolvimento de marcadores genéticos para
identificação de espécies de tubarões comercializados
no Brasil**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências de Botucatu –
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas - Zoologia

Aluno: Marcelo Linardi Niero Rocha

Orientador: Dr. Fausto Foresti

Botucatu / SP

Agosto – 2013

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

Rocha, Marcelo Linardi.

Desenvolvimento de marcadores genéticos para identificação de espécies de tubarões comercializados no Brasil / Marcelo Linardi Rocha. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Fernando Fernandes Mendonça

Capes: 20406029

1. Tubarão - Identificação. 2. Marcadores biológicos. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Pesca - Administração.

Palavras-chave: Identificação; PCR-multiplex; Pesca; rDNA 16S.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Professor Dr. Fausto Foresti, pela convivência nesses dois anos, pela grande oportunidade de realizar esse trabalho e pelos muitos ensinamentos, tanto profissionais como pessoais. A você professor meus agradecimentos.

Aos meus pais, José Eduardo e Maria Regina, sempre me apoiando em quaisquer decisões, me incentivando e não deixando desistir dos meus sonhos. Se não fosse por vocês eu não estaria aqui.

A UNESP, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Morfologia, ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e ao CNPq, pela bolsa concedida.

Agradeço também a todas as pessoas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que me apoiaram, incentivaram, ensinaram e ajudaram direta ou indiretamente nessa conquista.

Ao meu co-orientador Dr. Fernando F. Mendonça, pelo companheirismo ao longo desses anos e pelos preciosos ensinamentos transmitidos de diversas formas.

Agradeço aos grandes amigos Luis Henrique F. Ussami (Japa), Renato H. A. Freitas (Cipó) e Bruno Ferrete (Pitera), pelas viagens, coletas, festas e principalmente por me ajudarem no início do meu trabalho e por me ensinarem diversas coisas que foram muito importantes para que conseguisse alcançar a realização dessa pesquisa.

Aos companheiros de laboratório Guilherme Costa Silva (Varvito) e Fernando Yuldi Ashikaga pelos seus ensinamentos, troca de opiniões e por me ajudarem na reta final com as análises e outras considerações importantíssimas do meu trabalho.

Por fim, agradeço à minha namorada, companheira de todas as horas, que esteve comigo durante todo o tempo desta etapa, sempre acreditando em mim e me apoiando em qualquer situação, uma verdadeira amiga que encontrei em Botucatu.

A todos, muito obrigado!

"Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a mortalidade."

Dalai Lama

SUMÁRIO

1 Introdução	2
1.1 Exploração Pesqueira	2
1.2 Identificação de Espécies	4
1.3 Identificação Molecular de Espécies	8
2 Objetivos	12
3 Materiais e Métodos.....	14
3.1 Obtenção de Amostras	14
3.2 Extração do DNA	16
3.3 Amplificação do segmento do gene 16S rDNA e sequenciamento.....	17
3.4 Desenvolvimento dos Primers espécies-específicos	19
4 Resultados	21
5 Discussão.....	31
6 Conclusões	37
7 Referências	41

Resumo

A pesca predatória vem ocasionando um enorme declínio de estoques e populações de inúmeras espécies marinhas. Tendo em vista a vulnerabilidade à exploração pesqueira da maioria das espécies de tubarões, associada às dificuldades de identificação morfológica devido às similaridades entre diversas espécies, agravada ainda, pela prática da pesca com a retirada de partes dos animais ainda antes dos desembarques, a geração de mecanismos alternativos de identificação de espécies são extremamente valiosos para oferecer uma ferramenta de controle e fiscalização da indústria pesqueira. No presente estudo foram desenvolvidos métodos de identificação simultânea, utilizando PCR – Multiplex para a identificação de espécies de tubarões com um importante valor econômico, sendo que as espécies analisadas foram divididas em seis grupos para serem aplicadas as técnicas de identificação. Com base na composição nucleotídica do gene mitocondrial ribossomal 16S de quatorze espécies de tubarões do Brasil, foram identificados os sítios polimórficos e desenhados *primers* espécie-específicos, para a utilização na identificação de espécies de tubarões espécimes desembarcados pela indústria pesqueira. A aplicação da metodologia resultou na caracterização de *primers* específicos que permitem a identificação particular de cada uma das espécies de tubarões *Alopias superciliosus*, *Alopias vulpinus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Carcharhinus porosus*, *Carcharhinus signatus*, *Galeocerdo cuvier*, *Isurus oxyrinchus*, *Isurus paucus*, *Prionace glauca*, *Rhizoprionodon lalandii* e *Rhizoprionodon porosus*. Considera-se que a correta identificação do material desembarcado, que representaria o resultado da pesca das espécies de ocorrência na região, possa permitir o estabelecimento de estatísticas confiáveis nesta área, bem como dar subsídios para um controle efetivo e rigoroso da pesca, auxiliando na elaboração de planos adequados de gestão e manejo dos recursos pesqueiros.

Palavras-chave: Pesca, Tubarões, Identificação, PCR-multiplex, DNAr 16S, Marcadores Moleculares.

Abstract

The overfishing has caused a huge decline in stocks and populations of many marine species. Given the vulnerability to overfishing of most shark species, associated with difficulties in morphological identification due to similarities between different species, aggravated by the practice of fishing with the removal of parts of animals even before the landings, the generation of alternative mechanisms for species identification are extremely valuable to offer a tool to control and monitor the fishing industry. In this study we developed methods of simultaneous identification using PCR - Multiplex for identifying shark species with an important economic value, and the species were divided into six groups for application of identification techniques. Based on the nucleotide composition of the mitochondrial 16S ribosomal gene of fourteen species of Brazilian sharks, was identified polymorphic sites and species-specific primers designed for use in identification of species of sharks landed by the fishing industry. The application of the methodology resulted in the characterization of specific primers that allow the unique identification of each shark species *Alopias superciliosus*, *Alopias vulpinus*, *Carcharhinus sickle*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Carcharhinus porosus*, *signatus* *Carcharhinus*, *Galeocerdo cuvier*, *Isurus oxyrinchus*, *Isurus paucus*, *Prionace glauca*, and *Rhizoprionodon lalandii* *Rhizoprionodon porosus*. It is considered that the correct identification of the material landed, which represent the result of fishing of the species occurring in the region, may permit the establishment of reliable statistics in this area, and make allowances for effective control and strict fishing, assisting in the preparation of proper plans and management of the fishery resources.

Key words: Fishing, Sharks, Identification, multiplex-PCR, rDNA16S, Molecular Markers.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Exploração Pesqueira

Existem relatos de exploração pesqueira desde a pré-história, sendo esta uma das atividades mais antigas exercidas pelo homem visando obter recursos alimentares a partir do meio aquático, voltada exclusivamente para fins alimentares. Com a Revolução Industrial nos séculos XVIII e XIX, a indústria pesqueira se deparou com um desenvolvimento sem precedentes, principalmente pelo surgimento dos barcos a vapor, dando início a uma nova indústria pesqueira, podendo atuar cada vez mais longe da costa e com apetrechos mais eficientes, dando início à exploração dos recursos pesqueiros em larga escala.

A pesca marinha apresenta-se como um importante recurso para a economia e o bem estar de cidades e comunidades litorâneas, proporcionando estabilidade alimentar, oportunidades de emprego, de renda e de subsistência. Segundo a FAO, estas comunidades litorâneas produziram em 2009 cerca de 80 milhões de toneladas de peixes e empregaram diretamente mais de 34 milhões de pessoas. Peixes e produtos provenientes da pesca constituem uma fonte importante e acessível de proteína de alta qualidade, especialmente para as nações mais pobres do mundo. Portanto, manter a prosperidade deste recurso em longo prazo e a sustentabilidade da pesca marítima não é só de importância política e social, mas também de importância econômica e ecológica (FAO - 2010).

Nos últimos anos os setores relacionados à pesca marinha e aquicultura tiveram um enorme desenvolvimento, passando de uma produção total de 19,3 milhões de toneladas em 1950 para 163 milhões de toneladas em 2009. Contudo, após atingir um pico em 1996, os

desembarques globais diminuíram gradualmente, caindo 10% da produção total até 2009 (FAO - 2010).

Atualmente, a pesca predatória vem se constituindo num fator preocupante para o equilíbrio das comunidades de organismos marinhos ocasionando um enorme declínio de estoques e populações de inúmeras espécies que vem sendo incluídas constantemente e de forma crescente nas Listas Vermelhas de Espécies Ameaçadas - IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais). Este declínio estaria relacionado à atuação de diversos fatores, entre as quais podem ser incluídas a sobre-exploração dos recursos pesqueiros e a destruição de habitats causada principalmente pela construção de portos, plataformas de petróleo e pela poluição gerada pelas cidades.

Em um contexto histórico, o consumo da carne de elasmobrânquios manteve-se quase que restrito às populações de pescadores tradicionais até há poucas décadas atrás. Devido à redução dos estoques pesqueiros mais tradicionais, o consumo deste tipo de carne passou a ser mais difundido e apreciado, ocorrendo, assim, um aumento substancial da pesca destes organismos. Outro fator de grande incentivo à pesca de tubarões decorre do interesse pelo consumo das nadadeiras pelos povos asiáticos. Assim, o aumento da procura de tal produto e os altos preços praticados no comércio, tem promovido a captura de tubarões em praticamente todos os mares. Dados estatísticos da FAO sobre a exploração pesqueira registraram no ano de 2007 a captura mundial de 781.000 toneladas de elasmobrânquios, sendo cerca de 496.000 toneladas de tubarões e 285.000 toneladas de raias.

Segundo Bonfil (1994), o Brasil ocupava a oitava posição na captura mundial deste recurso nesta data. Atualmente, o país ocupa a 13ª posição com o Estado de São Paulo respondendo pela captura de 75% dos elasmobrânquios explorados em toda a região sudeste.

Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade da maioria das espécies de tubarões e raias à exploração pesqueira (Castro et al., 1987; Camhi et al., 1998), trabalhos de controle e manejo da exploração das espécies deste grupo são raros, tendo como maior dificuldade a falta de informações básicas sobre captura, desembarque e sua comercialização. Tendo em vista que a maior parte do conhecimento sobre a abundância das populações de elasmobrânquios em nível mundial tem sido obtida por monitoramentos realizados junto às frotas pesqueiras industriais (Bigelow et al., 1999; Graham et al., 2001; Carbonell et al., 2003), considera-se que os dados estatísticos são incertos ou pouco confiáveis para diversas espécies e inexistentes para a maioria, devido principalmente às similaridades morfológicas entre os componentes dos diferentes grupos taxonômicos. Portanto, torna-se de extrema importância o conhecimento de quantas e quais espécies estão sendo desembarcadas pela indústria pesqueira, a fim de que se possa ter um efetivo e rigoroso controle da pesca, auxiliando na elaboração de planos de gestão e manejo dos recursos pesqueiros, uma vez que esses se encontram em declínio não só no Brasil, mas em todo o mundo, por conta da pesca sem uma fiscalização ou controle.

1.2 Identificação de Espécies

O conceito de espécie tem sido analisado sob diferentes ângulos ao longo da história, incluindo o tipológico, morfológico, biológico, por isolamento reprodutivo, filogenético, etc. Ainda que extensos debates sejam constantemente travados em relação a esses conceitos de espécie (De Queiroz, 2005; Waugh, 2007), do ponto de vista prático os taxonomistas são os profissionais responsáveis pela caracterização dessas entidades biológicas e sua classificação, tornando-as palpáveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome, proposto de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (Köhler, 2007).

A atribuição de um nome a uma entidade biológica não constitui uma simples aplicação de regras de nomenclatura, mas tem por base a elaboração de uma hipótese segundo a qual um determinado conjunto de caracteres (usualmente morfológicos) é capaz de identificar uma espécie com características biológicas próprias e história evolutiva independente de outras espécies biológicas similares. Essas hipóteses podem ser testadas de diversas maneiras e como todas as hipóteses, podem ser refutadas ou não. Adicionalmente, quando as descrições de espécies são baseadas em uma ampla base de dados, elas se tornam hipóteses científicas interessantes, permitindo a elaboração de predições explícitas sobre os atributos dos organismos (Lipscomb et al., 2003). Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies, simplesmente pelo fato de que foram os primeiros disponíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o desenvolvimento de novos métodos de estudos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade.

Os tubarões e as raias fazem parte da Classe Chondrichthyes e da Subclasse Elasmobranchii (Bigelow & Schroeder, 1953; Nelson, 1994; Compagno, 2005), que incluem peixes com esqueleto cartilagenoso. Ainda entre neste grupo dos peixes cartilagenosos estão incluídas as quimeras. Os elasmobrânquios são considerados predadores em sua grande maioria, frequentemente ocupando posições de topo das cadeias tróficas em ambientes pelágicos, demersais, abissais, costeiros, estuarinos ou dulcícolas (Compagno, 1991; Camhi et al., 1998; Holmgren & Nilsson, 1999; Wetherbee & Cortés, 2004). De acordo com o último levantamento realizado por Ebert & Compagno (2007), o grupo dos tubarões é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies. Segundo este autor, entre as raias são reconhecidas 5 ordens, 20 famílias e 574 espécies.

No Brasil, o Relatório do Programa Nacional de Levantamento Biológico (Lessa et al., 1999a) constatou a ocorrência de 82 espécies de tubarões e 45 de raias. Posteriormente, Menezes et al. (2003) e Buckup et al. (2007) indicaram que no Brasil ocorrem aproximadamente 139 espécies marinhas e 16 espécies continentais de elasmobrânquios. Algumas revisões mais detalhadas dos dados disponíveis para tubarões da costa brasileira (Gadig 1994, 2001; Soto 2001) contribuíram para a compreensão da diversidade do grupo nesta região. Mesmo assim, estima-se que o número de espécies de Condricties brasileiros certamente ainda será ampliado, considerando-se que revisões e descrições de novas espécies ainda são frequentes neste grupo.

Quanto às características morfológicas, os tubarões são extremamente semelhantes, com algumas poucas exceções. Apresentam corpo fusiforme e alongado, esqueleto cartilaginoso, 5 a 7 pares de brânquias, nadadeiras pares ao longo do corpo, boca na posição ventral e mandíbula. Vale destacar também que ocupam todos os mares e oceanos, inclusive águas continentais, sendo, contudo, predominantemente marinhos. Os tubarões mais explorados atualmente pertencem a duas ordens, Ordem Carcharhiniformes e Ordem Lamniformes. A Ordem Carcharhiniformes é o grupo mais abundante em número de indivíduos e espécies, enquanto a Ordem Lamniformes pertencem grandes tubarões, como por exemplo, o tubarão branco.

Para identificação de espécies de tubarões usam-se principalmente caracteres morfológicos tais como dentição, nadadeiras, aspecto das fendas branquiais e tamanho dos animais. Entretanto, no Brasil, essa identificação morfológica era impossível até há pouco tempo devido à prática de remoção de muitas partes dos animais como vísceras, cabeça e nadadeiras, antes do desembarque. Estas práticas eram comumente empregadas pelos pescadores para a melhor conservação da carne e para iniciar o processo de secagem das nadadeiras. A partir de 2012 o Ministério

do Meio Ambiente alterou a lei que regulamenta a pesca e comercialização de tubarões e raias no Brasil visando coibir a prática do “finning”, onde se retiram as nadadeiras dos animais, sendo as carcaças descartadas no mar. De acordo com a Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA N° 14, de 26 de Novembro de 2012, todos os espécimes de tubarões e raias capturados no litoral brasileiro devem ser desembarcados, seja em infraestrutura portuária, terminal pesqueiro nacional público ou particular, ou em qualquer outro local de desembarque utilizado pela frota nacional e estrangeira arrendada, com todas as suas barbatanas naturalmente aderidas ao corpo do animal.

Tendo em vista, pois, a dificuldade de identificação de algumas espécies de tubarão nos desembarques de pesca e à dificuldade de identificação ao menor nível taxonômico, este trabalho propõe uma metodologia de identificação para alguns grupos desses animais que são muito explorados em águas brasileiras.

Tubarões do gênero *Rhizoprionodon* são frequentemente capturados por barcos de pesca artesanal. São tubarões costeiros e tem um importante papel na cadeia trófica marinha como o controle de outras populações de peixes. As espécies do gênero *Isurus* também são muito exploradas, sendo desembarcadas com frequência pela aplicação da pesca de espinhel, mas, pelo fato de não receberem menção em nível de espécie, imprime uma conotação de importância para o desenvolvimento de ferramentas de identificação específica neste importante grupo. O gênero *Alopias*, que compreende duas espécies de tubarões pelágicos, também não recebe menção em nível de espécie, fator este que inviabiliza o controle e manejo de pesca dessas espécies. Outro grupo de importante interesse compreende as espécies de tubarões que estão sendo extremamente explorados no Norte e Nordeste do Brasil, como o tubarão cabeça-chata (*Carcharhinus leucas*, Müller & Henle, 1839) e o tubarão tigre (*Galeocerdo cuvier*, Püron & Lesueur, 1822).

Os *Carcharhiniformes*, ordem que compreende a maioria das espécies de tubarões, apresentam-se como um importante grupo. No Brasil, existem três espécies de carcharhiniformes ameaçados pela exploração pesqueira, *Carcharhinus longimanus* (Poey, 1861), *Carcharhinus porosus* (Ranzani, 1839) e *Carcharhinus signatus* (Poey, 1868), que necessitam de serem submetidas a melhores ferramentas de identificação. O último grupo de tubarões a ser relacionado, porém não menos importante é o grupo dos que são mais pescados, incluindo as espécies *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810), *Carcharhinus falciformes* (Müller & Henle, 1839), *Carcharhinus plumbeus* (Nardo, 1827) e *Galeocerdo cuvier*. Estes tubarões são muito explorados em todo mundo, muitas vezes sem identificação e sem uma quantificação a respeito das espécies, o que dificulta o estabelecimento de um equilíbrio entre a pesca e a recuperação dos estoques.

1.3 Identificação Molecular de Espécies

A natureza hereditária de qualquer organismo vivo é definida pelo seu genoma. Sendo assim, o DNA pode ser considerado uma poderosa ferramenta na diferenciação entre espécies, já que é esta molécula que essencialmente gera as distinções entre os organismos. O DNA genômico de eucariotos é encontrado no núcleo e é uma molécula linear que pode ser classificada funcionalmente em regiões codificantes e não codificantes (Griffiths et al., 2002).

Existem inúmeras vantagens quando se utiliza a identificação molecular de espécies, podendo se trabalhar com apenas uma pequena amostra da espécie a ser estudada, dispensando longos estudos de taxonomia que na maioria das vezes só podem ser realizados com o indivíduo inteiro, evitando problemas com diferenças fenotípicas que eventualmente podem ocorrer em algumas espécies.

A aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” ou PCR) por Karry Mullis na década de 80 promoveu uma revolução nesta área de aplicação da ciência e se transformou rapidamente em um dos métodos mais utilizados de análise de DNA, tendo em vista que com a PCR é possível replicar milhões de vezes “in vitro” um determinado segmento de DNA.

Há aproximadamente 30 anos, a análise de sequências de genes de DNA ribossômico foi utilizada para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (Woese e Fox, 1977). No final da década de 70 e início da década de 80, as pesquisas com DNA mitocondrial dominaram a Sistemática Molecular (Avise, 1994) e hoje constituem um dos principais sustentáculos deste tipo de investigação, com várias revistas dedicadas exclusivamente a esse campo. Entre os dados moleculares utilizados em Taxonomia e Sistemática temos as análises bioquímicas, as isozimas, dados imunológicos e, mais recentemente, as comparações de sequências de nucleotídeos (Hillis et al., 1995). Nos estudos taxonômicos, essas ‘novas’ categorias de informações têm sido sempre adicionadas aos dados morfológicos na descrição de espécies, sem a pretensão de substituí-los. Exemplos desse tipo de integração são cada vez mais comuns, como na descrição de *Gymnotus sylvius* (Albert et al., 1999), *Mugil rubrioculus* (Harrison et al., 2007) e *Moenkhausia forestii* (Benine et al., 2009).

Os exemplos citados são particularmente relevantes, pois são referentes a espécies de gêneros taxonomicamente complexos e que só puderam ser descritas após o acúmulo deste tipo de evidências, demonstrando assim a singularidade das amostras em estudo com relação a seus respectivos congêneres. Estudos moleculares com isoenzimas realizados com elasmobrânquios no Brasil referem-se a análises de isoenzimas entre diferentes populações de uma suposta única espécie de cação-anjo *Squatina argentina*. Revelaram a existência de um complexo de

três espécies, além de possibilitar a descrição das duas novas, até então tidas como espécies crípticas (Solé-Cava et al., 1983).

Sabendo da problemática de identificação das espécies de Elasmobrânquios, buscou-se no presente trabalho o desenvolvimento de marcadores moleculares aplicáveis em PCR–Multiplex a partir do gene mitocondrial 16S. Tal técnica apresenta baixo custo e é de simples execução, além de possibilitar a identificação de diversas espécies simultaneamente, utilizando *primers* espécie-específicos, ou seja, um marcador para cada espécie. A PCR-Multiplex tem sido utilizada para a identificação de elasmobrânquios utilizando o gene Citocromo oxidase I, tendo se mostrado viável na fiscalização e quantificação dos desembarques de pesca (Mendonça et al. 2009; De Franco et al. 2010).

OBJETIVOS

2 Objetivos

Objetivos gerais

Considerando-se as características biológicas, evolutivas e taxonômicas dos elasmobrânquios, a crescente exploração pesqueira e os problemas relacionados às estatísticas de captura e de controle da pesca, este estudo buscou caracterizar a diversidade genética entre espécies de tubarões da costa do Estado de São Paulo e principalmente o desenvolvimento de metodologia viável de identificação genética para diversas espécies de tubarões, fornecendo um método de avaliação e de quantificação da captura e comercialização de elasmobrânquios na costa do Estado de São Paulo.

Objetivos específicos

No sentido de ampliar o conhecimento sobre este grupo de organismos, pretendeu-se:

1. caracterizar a composição nucleotídica do gene mitocondrial DNAr 16S em 14 espécies de tubarões capturados na costa brasileira;
2. desenvolver protocolos de identificação específica utilizando o método molecular de aplicação simples PCR-multiplex para espécies de tubarões explorados pela pesca;
3. possibilitar, com a obtenção e aplicação de marcadores moleculares, o aprimoramento da estatística pesqueira e da fiscalização das capturas e do comércio de tubarões da costa brasileira, fornecendo subsídios para programas de manejo e conservação das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção de Amostras

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte da coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP e também foram coletadas nos três principais pontos de desembarque de pescado marinho do Estado de São Paulo, que também abrangem pontos de comércio de pescado localizados nos municípios de Santos (Figura 1) e Ubatuba (Figura 2) e Cananéia (Figura 3), nos anos de 2011 e 2012. As amostras coletadas, constituídas principalmente de fragmentos de tecidos dos animais, foram preservadas e mantidas em álcool 95% para garantir a integridade e qualidade dos tecidos para análises moleculares.

As amostras utilizadas no presente trabalho e as localidades de coleta encontram-se relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1: Informações das espécies analisadas, localidades de coleta e número de sequências obtidas por espécie.

Espécies	Localidades
<i>Alopias superciliosus</i>	São Paulo e Belém (BR), Flórida (USA)
<i>Alopias vulpinus</i>	São Paulo (BR)
<i>Carcharhinus falciformes</i>	Flórida (USA)
<i>Carcharhinus leucas</i>	São Paulo e Natal (BR), Florida (USA)
<i>Carcharhinus longimanus</i>	São Paulo (BR), Costa Sul Africana
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Flórida (USA)
<i>Carcharhinus porosus</i>	Belém (BR), Flórida (USA)
<i>Carcharhinus signatus</i>	Flórida (USA)
<i>Galeocerdo cuvier</i>	Pernambuco (BR)
<i>Isurus oxyrinchus</i>	São Paulo (BR), Flórida (USA)
<i>Isurus paucus</i>	São Paulo (BR)
<i>Prionace glauca</i>	São Paulo e Rio Grande do Sul (BR)
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	São Paulo (BR)
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	São Paulo (BR)



Figura 1: Ponto de comercialização de elasmobrânquios na cidade de Santos, em local de desembarque de pescado no Estado de São Paulo.



Figura 2: Ponto de comercialização de elasmobrânquios na cidade de Ubatuba, em local de desembarque de pescado no Estado de São Paulo.



Figura 3: Ponto de comercialização de elasmobrânquios na cidade de Cananéia, em local de desembarque de pescado no Estado de São Paulo.

3.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir do tecido muscular dos animais amostrados utilizando a metodologia de extração salina descrita por Aljanabi et al. (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio.

Para obtenção do DNA foi seguido o seguinte protocolo de extração:

- adicionar 290µl do tampão (30mM Tris HcL, 10mM EDTA, SDS 10%) + 10µl de proteinase K (10mg/mL) em um tubo de 1,5ml juntamente com um pequeno fragmento da amostra e levar à uma temperatura de 55°C por 2 a 3 horas;

- acrescentar 100µl de NaCl (5M) e inverter os tubos para homogeneização;
- centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C;
- transferir o sobrenadante para outro tubo de 1,5ml, cerca de 300µl;
- adicionar 600µl de etanol 100% gelado, inverter os tubos cuidadosamente para homogeneização e manter no freezer -70°C mantendo a suspensão por 20 minutos;
- centrifugar por 30 minutos a 14000 rpm a 4°C e em seguida descartar o sobrenadante;
- adicionar 1 ml de etanol 70% gelado;
- centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a 4°C e em seguida descartar o sobrenadante;
- secar por 30 minutos na estufa a 37°C;
- ressuspender a amostra em 200µl de água ultrapura autoclavada e manter em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas, para hidratação.

3.3 Amplificação do segmento do gene 16S rDNA e sequenciamento das amostras.

Foi escolhido o segmento do gene 16S rDNA devido às suas características de alto grau de conservação entre as espécies de vertebrados, sobretudo em peixes. Os marcadores de identificação de espécies foram desenvolvidos a partir das sequências geradas utilizando a porção 5' do gene 16S.

A amplificação foi feita com a aplicação de PCR, que realizada posteriormente a checagem do processo em gel de agarose; em seguida,

os segmentos obtidos foram submetidos à reação de sequenciamento. As reações de amplificação foram efetuadas em termocilador utilizando 12,5µl de solução contendo 7,95 µl de água ultra pura, 1,35 µl de solução tampão da Taq, 0,3µl de MgCl₂, 0,4 µl de *primer forward* 16S, 0,4µl de *primer reverse* 16S, 0,4µl de dNTP, 0,2µl de enzima Taq polimerase (PhT) e 1,5µl de DNA da amostra a ser amplificada. As reações de PCR para a amplificação dos fragmentos específicos seguiram as seguintes condições de tempos de ciclagem e temperatura:

1º passo (x1): 95° C por 2 minutos (desnaturação inicial).

2º passo (x35): 95° C por 40segundos (desnaturação).

50° C por 30 segundos (anelamento dos *primers*).

72° C por 1 minuto (extensão da cadeia nucleotídica).

3º passo (x1): 72° C por 7 minutos (extensão final).

A amplificação do fragmento do gene 16s rDNA contendo aproximadamente 650pb foi checada em gel de agarose 1%, sendo esta parte a região final do gene. Após eletroforese em gel de agarose, os fragmentos amplificados foram corados e visualizados em luz azul. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à reação de sequenciamento, purificação e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. As reações de sequenciamento seguiram as seguintes condições de tempos de ciclagem e temperatura:

1º passo (x1): 96° C por 2 minutos.

2º passo (x35): 96° C por 30segundos.

54° C por 15 segundos.

60° C por 4 minutos.

3º passo (x1): 12º C até ser retirada do Termociclador.

Todas as sequências utilizadas no presente trabalho foram obtidas com no mínimo uma réplica, sendo consideradas satisfatórias apenas aquelas sequências que apresentaram alta qualidade nos picos de eletroferograma, visualizadas no software “SeqScanner” (v 1.0) da Applied Biosystems.

3.4 Desenvolvimento dos *primers* espécie-específicos

Após a obtenção das sequências do segmento de rDNA 16S, foram identificados os sítios polimórficos de cada uma das espécies. As sequências foram processadas pelo software GeneRunner, sendo então desenhados os *primers* de reconhecimento espécie-específicos compatíveis para aplicação simultânea na mesma reação de PCR, de acordo com os melhores parâmetros do software. Essa etapa foi realizada manualmente, com auxílio do software especificado.

RESULTADOS

4 Resultados

Utilizando as sequências nucleotídicas do segmento do gene ribossomal 16S das quatorze espécies de tubarões provenientes de diversas localidades situadas na costa dos estados de São Paulo, Natal, Belém, Rio Grande, no Brasil; na Florida, USA e em localidades na costa oeste da África, foram relacionados os grupos para a aplicação dos marcadores em PCR-Multiplex.

Tendo sido identificados os polimorfismos e as bases nucleotídicas exclusivas de cada uma das espécies, os marcadores desenvolvidos foram divididos para a aplicação em diferentes kits de reação. Foram sequenciadas amostras de quatorze (14) espécies de tubarões, sendo elas *Rhizoprionodon lalandi* (n=6), *Rhizoprionodon porosus* (n=3), *Isurus oxyrinchus* (n=6), *Isurus paucus* (n=3), *Alopias vulpinos* (n=3), *Alopias superciliosus* (n=4), *Carcharhinus leucas* (n=5), *Carcharhinus longimanus* (n=5), *Carcharhinus porosus* (n=5), *Carcharhinus signatus* (n=3), *Carcharhinus falciformes* (n=4), *Carcharhinus plumbeus* (n=3), *Galeocerdo cuvier* (n=5) e *Prionace glauca* (n=4).

Os valores de divergência genética foram analisados utilizando o software MEGA, versão 5.22. A divergência genética média entre todos os indivíduos de todas as espécies foi de 0.058, ou seja, de 5,8% entre todos os tubarões analisados.

A divergência genética entre as espécies *Rhizoprionodon lalandi* e *Rhizoprionodon porosus* (Grupo 1) foi de 0.003 (0,3%), sendo a divergência genética do Grupo 1 para com os demais de 0.060 (6%).

A divergência genética dentro do Grupo 2 (*Isurus oxyrinchus* e *Isurus paucus*) foi de 0,027 (2,7%) entre as duas espécies e a divergência genética do Grupo 2 com os demais grupos foi de 0.111 (11%).

Para o Grupo 3 (*Alopias vulpinos* e *Alopias superciliosus*), a divergência genética dentro do grupo foi de 0.045 (4,5%). Já a divergência genética do Grupo 3 com os demais grupos foi de 0.068 (6,8%).

A divergência genética dentro do Grupo 4 (*Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*) foi de 0.026 (2,6%) entre as duas espécies. Já a divergência genética do grupo 4 com os demais grupos foi de 0.055 (5,5%).

Para as espécies *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus porosus* e *Carcharhinus signatus* a divergência genética dentro do grupo (Grupo 5) foi de 0.022 (2,2%). A divergência genética deste grupo com os demais foi de 0,053 (5,3%).

A divergência genética dentro do grupo 6 (*Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier*) foi de 0.071 (7%). A divergência genética do grupo 6 com os demais grupos foi de 0.066 (6,6%).

- Grupo 1 - *Rhizoprionodon lalandi* (n = 6) e *Rhizoprionodon porosus* (n = 3) – Ordem *Carcharhiniformes*, família *Carcharinidae*, são espécies de tubarões de pequeno porte, muito explorados nas pescarias artesanais em praticamente toda a costa brasileira, principalmente utilizando-se como instrumento de pesca as redes de emalhe. São duas espécies extremamente semelhantes morfologicamente, sendo impraticável sua identificação no momento do desembarque para efeitos de estatística e fiscalização. Para estas duas espécies foram encontradas duas regiões nas sequências do gene 16S que apresentaram polimorfismo interespecífico, conforme descrito na Tabela 2.

Na Tabela 2 estão relacionadas as informações a respeito dos *primers* desenhados com as sequências de nucleotídeos, o ponto de

anelamento, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases e a temperatura de melting de cada um dos marcadores.

Tabela 2: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Rhizoprionodon lalandi* e *Rhizoprionodon porosus*.

	12	305
<i>Rhizoprionodon lalandi</i>	G	A
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	A	G

Tabela 3: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies *Rhizoprionodon lalandi* e *Rhizoprionodon porosus*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho do primer	Temperatura de "melting"	Sequencia do primer
<i>Rhizoprionodon lalandi</i>	294	21 pb	56,5° C	5` ACC AAA AAC AGT TAA ATT AGG 3`
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	186	21 pb	62,6° C	5` TGG GTC ATT TTT CGA TAA ATG 3`

- Grupo 2 - *Isurus oxyrinchus* (n=6) e *Isurus paucus* (n=3) - Ordem *Lamniformes*, família *Lamnidae*. São tubarões de grande porte, muito explorados por pescarias oceânicas, capturados por frotas pesqueiras que utilizam como apetrecho de pesca principalmente o espinhel pelágico.

Para estas duas espécies foram encontradas duas regiões nas sequências do gene 16S que apresentaram polimorfismo interespecífico, conforme descrito na Tabela 4. Já na Tabela 5, estão contidas as informações a respeito dos marcadores, como localização do *primer* no

segmento, tamanho do marcador em pares de base, temperatura de *melting* de cada um e a sequência do marcador.

Tabela 4: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Isurus oxyrinchus* e *Isurus paucus*.

	48	110	170	198	231	261	273	327	335	395	401	442	447
<i>Isurus oxyrinchus</i>	A	AG	T	C	C	GA	C	GT	A	G	T	G	G
<i>Isurus paucus</i>	G	GA	C	T	T	TG	T	AC	G	A	A	A	A

Tabela 5: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies *Isurus oxyrinchus* e *Isurus paucus*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho primer	Temperatura de "melting"	Sequencia do primer
<i>Isurus oxyrinchus</i>	319	23 pb	54,2° C	5` AAG TGT TGT ATT TTT ATT TAT GT 3`
<i>Isurus paucus</i>	231	22 pb	54,3° C	5` CTA ATT TTT AAG TGT TTG AGA G 3`

- Grupo 3 - *Alopias vulpinos* (n=3) e *Alopias superciliosus* (n=4) - Ordem *Lamniformes*, família *Alopiidae*. Tubarões de grande porte, muito explorados por pescarias oceânicas, capturados por barcos que utilizam espinhel como apetrecho de pesca. Para estas duas espécies foram encontradas 26 regiões nas sequências do gene 16S que apresentaram polimorfismo interespecífico, conforme descrito na Tabela 6. Na Tabela 7 estão contidas as informações a respeito dos marcadores como localização do *primer* no segmento, tamanho do marcador em pares de

base, temperatura de *melting* de cada um e por fim, a sequência do marcador.

Tabela 6: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Alopias vulpinos* e *Alopias superciliosus*.

	95	110	127	158	165	167	204	213	219	234	251	262	304
<i>Alopias vulpinos</i>	TT	G	CC		G	A	T	C	A	AG	G	G	G
<i>Alopias superciliosus</i>	GG	A	TT	G	A		G	A	G	GA	A	A	A
	307	312	314	331	354	361	363	400	407	422	459	483	546
<i>Alopias vulpinos</i>	G	G	ATAT	T	A	T	A	TA	T	A	A	A	G
<i>Alopias superciliosus</i>	A	A		G	T	C	T	AG	C	G	G	G	A

Tabela 7: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies *Alopias vulpinos* e *Alopias superciliosus*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho primer	Temperatura de "melting"	Sequencia do primer
<i>Alopias vulpinos</i>	128	20 pb	62,4° C	5` TAA GAA AGG ATT GCG CTG TT 3`
<i>Alopias superciliosus</i>	383	21 pb	63° C	5` TCT CGT GAT GCC TTT CAT ACA 3`

- Grupo 4 - *Carcharhinus leucas* (n=5) e *Galeocerdo cuvier* (n=5) - Ordem *Carcharhiniformes*, família *Carcharinidae*. São tubarões de grande porte e associados a ambientes costeiros. São espécies muito capturadas pela pesca, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, sofrendo grande impacto nas populações. Para estas duas espécies foram encontradas 17 regiões nas sequências do gene 16S que

apresentaram polimorfismo interespecífico, conforme descrito na Tabela 8. Na tabela 9 estão contidas as informações a respeito dos marcadores, como localização do primer no segmento, tamanho do marcador em pares de base, temperatura de melting e por fim a sequência do marcador.

Tabela 8: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*.

	12	166	169	192	200	251	255	269	309	312	316	333	338
<i>Carcharhinus leucas</i>	A	A	T	A	AA	AA	G	C	AT	G	A	A	AGTG
<i>Galeocerdo cuvier</i>	G	T	G	G	GG	GG	A	T	TA	A	T	G	GTAA
	343	370	483	504									
<i>Carcharhinus leucas</i>	ATG	A	A	G									
<i>Galeocerdo cuvier</i>	TAA	G	G	A									

Tabela 9: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies *Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho do primer	Temperatura de "melting"	Sequência do primer
<i>Carcharhinus leucas</i>	470	21 pb	63° C	5` TCT CGT GAT GCC TTT CAT ACA 3`
<i>Galeocerdo cuvier</i>	163	22 pb	61,3° C	5` CTT GGT TCA TTG ATC AGG TAA G 3`

- Grupo 5 - *Carcharhinus longimanus* (n=5), *Carcharhinus porosus* (n=5) e *Carcharhinus signatus* (n=3) - Ordem *Carcharhiniformes*, família *Carcharhinidae*. Tubarões ameaçados em praticamente todo o mundo,

sendo que a captura destas espécies está proibida em águas brasileiras. Foram identificadas 15 posições que apresentavam polimorfismo, que estão relacionadas na Tabela 10. Na Tabela 11 estão contidas as informações a respeito dos marcadores, como localização do primer no segmento, tamanho do marcador em pares de base, temperatura de melting e por fim a sequência do marcador.

Tabela 10: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus porosus* e *Carcharhinus signatus*.

	24	174	218	236	240	246	253	264	269	308	338	342	348
<i>Carcharhinus longimanus</i>	G	A	CA	C	G	AA	GG	A	T	G	A	A	
<i>Carcharhinus porosus</i>	G	G	CA	T	A	GG	AG	A	C	G	A	A	T
<i>Carcharhinus signatus</i>	A	A	TG	C	G	AA	AA	G	T	A	G	G	
	370	483											
<i>Carcharhinus longimanus</i>	G	A											
<i>Carcharhinus porosus</i>	G	G											
<i>Carcharhinus signatus</i>	A	A											

Tabela 11: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus porosus* e *Carcharhinus signatus*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho do primer	Temperatura de "melting"	Sequência do primer
<i>Carcharhinus longimanus</i>	Pb 246	26 pb	60,9° C	5` TTT AAG TAC TTA GTA CTC AAT CGA TG 3`
<i>Carcharhinus porosus</i>	Pb 171	22 pb	62,8° C	5` ACT TGG TTC ATT GAT CAG GAA G 3`
<i>Carcharhinus signatus</i>	Pb 342	19 pb	64° C	5` TTA TGT CCT GGG AGG TGG G 3`

- Grupo 6 - *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier* – Tubarões que são muito explorados pela indústria pesqueira, sendo os mais pescados mundialmente segundo a FAO. Foram identificadas 39 posições que apresentavam polimorfismo, sendo identificadas na Tabela 12. Na Tabela 13 estão contidas as informações a respeito dos marcadores, como localização do primer no segmento, tamanho do marcador em pares de base, temperatura de melting e a sequência do marcador.

Tabela 12: Sítios polimórficos identificados nos segmento analisado do gene ribossômico 16S entre as espécies *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier*.

	46	48	51	92	95	110	166	169	175	198	200	213	230
<i>Prionace glauca</i>	T	G	C	C	T	G	A	T	A	T	A	C	A
<i>Isurus oxyrinchus</i>	C	A	T	T	G	A	A	T	G	C	A	A	G
<i>Carcharhinus falciformes</i>	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C	A
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C	A
<i>Galeocerdo cuvier</i>	T	G	C	T	T	G	T	G	G	T	G	C	A
	234	244	261	269	273	291	304	310	316	321	328	331	336
<i>Prionace glauca</i>	A	T	G	C	C	T	G	A	T	A	T	A	C
<i>Isurus oxyrinchus</i>	G	C	A	T	T	G	A	A	T	G	C	A	A
<i>Carcharhinus falciformes</i>	A	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	A	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C
<i>Galeocerdo cuvier</i>	A	T	G	C	T	T	G	T	G	G	T	G	C
	338	344	361	363	395	400	407	421	424	442	447	459	497
<i>Prionace glauca</i>	A	T	G	C	C	T	G	A	T	A	T	A	C
<i>Isurus oxyrinchus</i>	G	C	A	T	T	G	A	A	T	G	C	A	A

<i>Carcharhinus falciformes</i>	A	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	A	T	G	C	T	T	G	A	T	G	T	A	C
<i>Galeocerdo cuvier</i>	A	T	G	C	T	T	G	T	G	G	T	G	C

Tabela 13: Informações referentes aos *primers* espécie-específicos para as espécies. *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier*.

	Localização no segmento a partir do alinhamento	Tamanho do primer	Temperatura de "melting"	Sequência do primer
<i>Prionace glauca</i>	Pb 92	20pb	63° C	5` CAT CGA GGT CGT AAA CCC TC 3`
<i>Prionace glauca</i>	Pb 175	21 pb	63,9° C	5` CAT TGA TCA GGA AAT CCT GGA 3`
<i>Isurus Oxyrinchus</i>	Pb 388	22 pb	63,5° C	5` TAG GGT CTT CTC GTC TGA TGT G 3`
<i>Galeocerdo cuvier</i>	Pb 245	22 pb	63,4° C	5` CTT AGT ACT CAA TCG ATG GGG A 3`
<i>Carcharhinus falciformes</i>	Pb 305	26 pb	58,5° C	5` AAC AGT TAA ATT AGA AGT ATT GTA TG 3`
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Pb 483	24 pb	60,8° C	5` CTT TCA TAC AGG TCT TCA TTT AAG 3`

DISCUSSÃO

5 Discussão

A pesca marinha constitui-se num importante recurso para a economia e o bem estar das comunidades litorâneas, de um modo direto, bem como para toda a população, proporcionando estabilidade alimentar, oportunidades de emprego e renda. Assim, garantir a sustentação deste recurso não é uma questão apenas ecológica, mas também de importância econômica, política e social (FAO - 2010).

A pesca de elasmobrânquios no Brasil tem crescido de modo exponencial nos últimos anos. Atualmente, são desembarcadas mais de 11.000 toneladas/ano de tubarões e raias, o que corresponde a 3% do total capturado pela pesca extrativa marítima do País, conforme estimativas do Ministério do Meio Ambiente (IBAMA, 2005). Segundo Lessa et al. (1999), elasmobrânquios são capturados em praticamente todas as modalidades de pesca, tanto industrial como artesanal, com destaque para a pesca de espinhel (mono e multifilamento), rede de emalhe (de superfície e de fundo) e arrastos de fundo com portas.

São conhecidas para a costa brasileira aproximadamente 82 espécies de tubarões e 45 de raias (Lessa et al., 1999; MMA, 2006) e os representantes deste grupo são diretamente impactados no seu ambiente natural pela intensa atividade pesqueira e também pela destruição de habitats (SBEEL, 2005), o que se reflete na contínua diminuição de captura de diversas espécies. Também contribuem para essa diminuição populacional aspectos intrínsecos do ciclo de vida dos componentes deste grupo, caracterizados geralmente pela baixa fecundidade, maturação tardia, crescimento lento e alta longevidade (HOENIG; GRUBER, 1990), o que torna estes animais mais suscetíveis à sobrepesca.

Atualmente a pesca predatória vem ocasionando um enorme declínio de estoques e populações de inúmeras espécies marinhas, que vem sendo incluídas de modo crescente na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Tal declínio está relacionado com a atuação de diversos fatores, entre os quais a exploração dos recursos pesqueiros sem nenhuma prudência, controle e fiscalização, o que caracteriza uma atividade de pesca muito mais devastadora em nível de estoques e populações; também atua nesta direção a destruição de habitats, causada principalmente pela construção de portos, plataformas de exploração de petróleo e pela poluição gerada pelas cidades. Por outro lado, com o declínio de estoques de peixes mais tradicionais, o consumo da carne de tubarões passou a ser mais difundida em todo o mundo. Outro fator de grande incentivo à pesca de tubarões é o consumo asiático das nadadeiras, associada à prática do *finning*, onde são removidas apenas as nadadeiras dos animais, sendo a carcaça jogada no mar, causando um grande impacto às populações de tubarões.

Neste contexto considera-se que é extremamente importante o conhecimento a respeito de quais espécies estão sendo exploradas, assim como dados referentes a quantos indivíduos de cada espécie estão sendo retirados do ambiente, para possibilitar um efetivo e rigoroso controle da pesca. Tais informações são de grande auxílio na elaboração de planos de gestão e manejo dos recursos pesqueiros, tendo em vista que estes encontram em declínio. Com relação à identificação das espécies de tubarões nos principais pontos de desembarque pesqueiro em todo o país, esta atividade apresenta-se atualmente inviabilizada ou com grandes dificuldades para ser bem conduzida, quer seja pela própria semelhança morfológica entre as espécies deste grupo, como também devido à prática da remoção de partes dos animais antes do desembarque que são cruciais para a sua identificação, quando são utilizados apenas os aspectos morfológicos.

A preocupação com a sustentabilidade de estoques e populações de tubarões tem crescido não só no Brasil, mas de modo especial em outras partes do mundo, diante da crescente exploração pesqueira, da exploração de barbatanas e de outros produtos neste grupo de organismos. Segundo a FAO, esta preocupação tem levado ao desenvolvimento de planos e estratégias para conservação destas espécies. Neste sentido, a procura por metodologias mais adequadas de identificação das espécies têm aberto boas possibilidades de resultados que, a médio e longo prazos poderão resultar em atitudes e programas efetivos de manejo e conservação.

Os marcadores moleculares desenvolvidos para a identificação de espécies de tubarões apresentados nesse estudo têm em vista uma correta identificação, principalmente daquelas espécies que são extremamente exploradas e necessitam com urgência de planos de manejo e fiscalização, situação esta ainda precária no país.

Devido à similaridade genética observada no gene 16S entre algumas das espécies estudadas e visando garantir a especificidade dos marcadores desenvolvidos em PCR-multiplex, foram definidos grupos taxonômicos para identificações simultâneas. O primeiro grupo de marcadores proposto foi destinado à caracterização das espécies do gênero *Rhizoprionodon*, estando estes tubarões representados em cerca de 50% das capturas efetivadas com embarcações de pequena escala no Brasil. Essas duas espécies consistem em tubarões de pequeno porte, diretamente ligados a ambientes costeiros, que são capturados nas pescarias industriais e artesanais que utilizam como principais apetrechos de pesca as redes de emalhe, espinhel pelágico ou redes de espera. Esses animais são capturados muito jovens na maioria das vezes, o que pode inviabilizar a recuperação de populações destas espécies simplesmente pelo fato destes animais não conseguirem atingir

uma idade de maturação sexual pelo menos uma vez, não colaborando assim com a introdução de novos indivíduos na população.

O segundo grupo de marcadores, visou à identificação de duas espécies do gênero *Isurus*, sendo as espécies componentes deste gênero relacionadas em segundo lugar em volume de desembarque em pescarias oceânicas, depois do tubarão-azul *Prionace glauca*. *Isurus oxyrinchus* e *I. paucus* são tubarões de grande porte que estão ligados a ambientes pelágicos, sendo assim capturados pelas pescarias oceânicas que utilizam principalmente os espinhéis como apetrecho de pesca. São espécies de importância econômica, já que representam uma alta porcentagem da biomassa total dos tubarões que são capturados.

O terceiro grupo de marcadores visou à identificação das espécies *Alopias superciliosus* e *A. vulpinus*, tubarões estes que são explorados pela pesca oceânica de espinhel. Constituem, juntamente com as demais espécies pelágicas, elementos de importante interesse econômico. Contudo, o conhecimento a respeito destas espécies é ainda limitado, sendo que os dados biológicos disponíveis são, na sua maioria provenientes do acompanhamento realizado pela indústria pesqueira.

Para os tubarões *Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*, definidos como Grupo 4, os marcadores visaram fornecer informações em conjunto de duas espécies amplamente capturadas pela pesca, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país, o que tem promovido grande impacto na estrutura das populações locais. Estas espécies são geralmente de grande porte e estão diretamente ligadas ao ambiente costeiro.

Para o quinto grupo de marcadores moleculares de identificação foram incluídas as espécies *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus porosus* e *Carcharhinus signatus*, tubarões altamente ameaçados em águas brasileiras, sendo assim proibida sua pesca em todo território

nacional. No caso do estabelecimento de melhores resultados de identificação das espécies que se apresentam como resultado da pesca nos pontos de desembarque, a importância da aplicação da metodologia genética é saber se estas espécies continuam a ser pescadas, tendo em vista a proibição estabelecida pela legislação.

O sexto grupo deste estudo de marcadores visou à identificação das espécies que são as mais pescadas atualmente em todo o mundo segundo a FAO, sendo elas *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier*. A identificação molecular visou obter ferramenta eficiente para a realização de uma estimativa da atividade pesqueira destas espécies, através de dados por espécie, o que é de extrema importância tendo em vista que estas são muito exploradas não só em águas brasileiras, mas em todo o mundo.

Considera-se que um requisito importante para implantação de medidas de manejo e conservação desse grupo de animais é a disponibilidade de informações confiáveis a respeito da captura e do comércio das espécies em níveis confiáveis de identificação. De modo efetivo, as ferramentas moleculares desenvolvidas são muito importantes para a realização do controle qualitativo e quantitativo de forma efetiva, caracterizando o que está sendo capturado pela indústria da pesca e o estado de estruturação dos conjuntos populacionais das espécies. Pode ser prevista uma revolução nos programas de conservação e manejo das espécies, com o estabelecimento de melhores estruturas de controle e orientação da fiscalização nos entrepostos e pontos de desembarque de pesca, seja ela artesanal ou industrial.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

A aplicação da metodologia genética resultou na caracterização de *primers* específicos que permitem a identificação particular de cada uma das espécies de tubarões, bem como conjuntos ou grupos de espécies, de forma a agilizar o processo de caracterização em amostragens envolvendo espécies diversificadas da fauna da costa brasileira e de regiões pelágicas do oceano Atlântico.

Foram objeto de estudo as espécies de tubarões *Alopias superciliosus*, *Alopias vulpinus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Carcharhinus porosus*, *Carcharhinus signatus*, *Galeocerdo cuvier*, *Isurus oxyrinchus*, *Isurus paucus*, *Prionace glauca*, *Rhizoprionodon lalandii* e *Rhizoprionodon porosus*, que foram analisadas em seis grupos.

O número de sequências nucleotídicas obtidas foi de 5, 3, 4, 5, 5, 3, 5, 3, 5, 6, 3, 4, 6 e 3, respectivamente, para as espécies relacionadas acima. Os *primers* obtidos a partir de segmentos do DNA ribossômico 16S caracterizaram-se como espécie-específicos, havendo uma variação no número de nucleotídeo dos primers, sendo de 19 nucleotídeos em *Carcharhinus signatus* e de 26 em *Carcharhinus falciformes* e *Carcharhinus longimanus*.

Entre espécies de um mesmo grupo, o menor valor de divergência genética para um grupo foi de 0.003 (0,3%), verificado entre as espécies *Rhizoprionodon lalandi* e *Rhizoprionodon porosus* (Grupo 1), sendo que na comparação deste grupo com os demais foi de 0.060 (6%). Com valores mais estremados de comparação deste parâmetro na amostra analisada aparece o grupo 6 (*Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus plumbeus* e *Galeocerdo cuvier*),

em que a divergência entre as espécies foi de 0.071 (7,0%) e, nas comparações deste grupo com os demais, foi de 0.066 (6,6%).

Apareceram com valores intermediários nas comparações os grupos 2 (*Isurus oxyrinchus* e *Isurus paucus*), com 0,027 (2,7%) e 0.111 (11%), respectivamente; o Grupo 3 (*Alopias vulpinos* e *Alopias superciliosus*), com 0.045 (4,5%) e 0.068 (6,8%), respectivamente; o Grupo 4 (*Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*), com 0.026 (2,6%) e 0.055 (5,5%), respectivamente; e o Grupo 5 (*Carcharhinus longimanus*, *Carcharhinus porosus* e *Carcharhinus signatus*), com a 0.022 (2,2%) e 0,053 (5,3%), respectivamente. O valor de divergência genética encontrado entre todos os indivíduos de todas as espécies foi de 0.058, ou seja, de 5,8% entre todos os tubarões analisados.

A eficácia do DNA mitocondrial para a identificação de peixes é fortemente validada por Ward et al. (2005) que analisou 207 espécies, entre elas 61 espécies de elasmobrânquios, sendo observado uma divergência genética média de 15.46% entre famílias, 9.93% entre gêneros e 0.39% entre espécies, utilizando o gene Citocromo oxidase I. Mendonça et al. (2009) analisaram sequências nucleotídicas também deste mesmo gene em 18 espécies de tubarões sendo observado uma divergência bastante significativa mesmo entre espécies de mesmo gênero, porém, mantendo um forte nível de similaridade dentro do mesmo táxon onde foram observadas divergências médias de 1,2%. Tais afirmações são também corroboradas pelo presente trabalho que apresenta diferentes níveis de divergência genética entre espécies, incluindo as de mesmo gênero, mas com alto grau de conservação entre indivíduos da mesma espécie. Assim, a viabilidade da aplicação da PCR-multiplex para a identificação de espécies de tubarões com alta funcionalidade e especificidade é sustentada também pela observação de que nenhum sinal polimórfico foi detectado entre os sítios de ligação dos primers espécie-específicos desenhados neste trabalho.

Este trabalho reforça a aplicação das técnicas de multiplex-PCR utilizando o gene 16S como um método seguro de caracterização da exploração pesqueira global e ainda, sobre outro aspecto e considerando um crescente comércio mundial de derivados de tubarões, protocolos de baixo custo como estes viabilizam também um método de certificação, agregando valores aos produtos.

Estudos envolvendo amostragens de produtos comercializados e de origem selvagem podem proporcionar uma maior compreensão a respeito da exploração de um recurso e sua gestão. A urgência do estabelecimento de planos de conservação para os tubarões torna imperativo o desenvolvimento de mecanismos de controle e fiscalização da captura e comércio das espécies mais ameaçadas, além da contínua avaliação das demais que podem também estar mostrando sinais, mesmo que ainda sutis de exploração excessiva. Assim, a criação de marcadores moleculares mais eficientes, com maior abrangência de espécies e de aplicação mundial deve ser uma busca constante.

REFERÊNCIAS

6 Referências

- ALJANABI, S.M., MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25: 4692-4693
- AVISE, JC. 1994 *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall.
- BIGELOW, H. B., SCHROEDER, W. C. 1953. *Fishes of the Western North Atlantic. Part two. Sawfishes, Guitarfishes, Sharks and Rays*. New Haven. Foundation for Marine Research, Yale University, Number I. 588p
- BIGELOW, K.A., BOGGS, C.H., HE, X. 1999. Environmental effects on swordfish and blue shark catch rates in the US North Pacific longline fishery. *Fish. Oceanogr.*, 8: 178-198.
- BONFIL, R. 1994. Overview of world elasmobranch fisheries. *FAO Technical Paper* n. 341, 119p.
- CAMHI, M., FOWLER, S., MUSICK, J., BRAUTIGA, M., FORDHAM, F. S. 1998. *Sharks and their relatives*. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, no. 20. 39p.
- CASTRO, J.I. 1987. The Position of Sharks in Marine Biological Communities An Overview. In: Cook, S. (edit.). *Sharks. An Inquiry into Biology, Behavior, Fisheries and Use*. Portland.Oregon, State University Extension Service, 11-17.
- COMPAGNO, L.J.V. 2005. Checklist of living Chondrichthyes. In Hamlett W.C. (ed.) *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc, pp. 501–548.
- COMPAGNO, L.J.V. 1999. Checklist of living Elasmobranchs. In: HAMLETT, W. C. (Ed.). *Sharks, Skates and Rays: the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore: The John Hopkins University Press, p. 471-498.
- COMPAGNO, L.J.V. 1984. *FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the World: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2 - Carcharhiniformes*. *FAO Fish. Synop.*, v. 125, n. 4/2, p. 251-655.

DE FRANCO, B., MENDONÇA, F.F., HASHIMOTO, D.T., PORTO-FORESTI, F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. 2009. Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelli*, *R. percellens*, and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. *Mol Ecol Resour.* Doi 10.1111/j.1755-0998.2009.02728.x

DE QUEIROZ, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(1) 6600-6607.

Estatística da Pesca Brasil (2002-2007). Grandes Regiões e Unidades da Federação. 2007. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros.

GADIG, O.B.F. 1994. Fauna de tubarões da costa norte/nordeste do Brasil (Chondrichthyes, Elasmobranchii). João Pessoa. Dissertação de Mestrado. Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba. 230p.

GRIFFITHS, A.J.F. 2002. Introdução à Genética. 7ª ed. RJ: Ed. Guanabara-Koogan S.A.

HILLIS, D.M., MORITZ, C., MABLE, B.K. 1996. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates Incorporation.

HILLIS, D.M. 1995. Approaches for assessing phylogenetic accuracy. *Syst. Biol.* 44:3–16.

HOENIG, I.P., GRUBER, S.H. 1990. Life-History Patterns in the Elasmobranchs: Implications for Fisheries Management. NOAA Technical Report 90.

HOENIG, J.M., GRUBER, S.H. 1990. Life-history patterns in Elasmobranch Implication for Fisheries Management. NOAA Technical Report NMFS, n. 90, p. 1-15.

IBAMA. 2005. Estatística da pesca 2004. Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília: Ibama. 136 p.

IBAMA. 2008. Estatística da pesca 2006. Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília: Ibama. 174 p.

IUCN. 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 março. 2013.

KÖHLER, F. 2007. From DNA taxonomy to barcoding - how a vague idea evolved into a biosystematic tool. Zool Reihe, 83:44-51.

LESSA, R., SANTANA, F.M., RINCÓN, G., GADIG, O.B.F., EL-DEIR, A.C.A. 1999. Biodiversidade de Elasmobrânquios no Brasil. In: Relatório e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Zona Costeira e Marinha. Disponível em:<<http://www.bdt.org.br/workshop/costa>>.

LIPSCOMB, D., PLATNICK, N., WHEELER, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. Trends Ecol Evol, 18:65-66.

MMA. 2006. Programa REVIZEE: Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva: relatório executivo. Brasília: MMA/SQA. 280 p.

Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios – SBEEL. 2005. Plano de Ações para Conservação e Manejo dos Estoques dos Recursos Pesqueiros. [s.L.]: SBEEL. 100 p.

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

SOLÉ-CAVA A.M., LEVY, J., VOOREN, C. 1983. Isozymic differentiation of two sibling species of Squatina (Chondrichthyes) in South Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 75, p. 354-358.

WAUGH, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays, 29:188-197.

WOESE, C.R., FOX, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA, 97:8392–8396.