



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**Identificação e estimativa pesqueira de tubarões na
costa de São Paulo (Província Argentina) utilizando
marcadores genéticos**

Luis Henrique Fregadolli Ussami

Botucatu / SP

- 2015 -



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Identificação e estimativa pesqueira de tubarões da costa de São Paulo (Província Argentina) utilizando marcadores genéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Autor: Luis Henrique Fregadolli Ussami

Orientador: Dr. Fausto Foresti

Botucatu / SP

- 2015 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ussami, Luiz Henrique Fregadolli.

Identificação e estimativa pesqueira de tubarões na costa de São Paulo (Província Argentina) utilizando marcadores genéticos / Luiz Henrique Fregadolli Ussami. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

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

Palavras-chave: Citocromo Oxidase subunidade I; PCR-multiplex; identificação genética; pesca de tubarões.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pela orientação, dedicação à pesquisa em Genética de Peixes, enorme contribuição para a minha formação, apoio e grande incentivo. Um exemplo de pesquisador. Mais uma vez, obrigado por acreditar em mim!

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

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP, pela possibilidade de realizar este trabalho.

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

Ao Renato e Marcelo pela ajuda nas coletas realizadas no município de Santos, Cananéia e Ubatuba e aos amigos Guilherme (Varvito), Fernando Yuldi e Cristian, um agradecimento especial por terem me ajudado na análise e interpretação dos meus resultados.

Ao grupo de Elasmobrânquios, Fernando, Carolina, Bruno (Guiodai), Bruno (Pitera), Sâmia, Camila, Natalia e Millke pela disponibilidade de ajudar sempre, em qualquer situação necessária.

À minha família: pai Yoshio, mãe Maria Edneia e meu irmão Junior, pelo apoio e fé que tiveram em mim. Sem vocês este trabalho não seria possível.

À CAPES e CNPq pela concessão da Bolsa de Estudos que permitiu a minha dedicação exclusiva ao trabalho, enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Resumo

Tubarões e raias estão atualmente entre os vertebrados mais ameaçados de extinção. Tal fato se deve principalmente à exploração pesqueira que permanece sem medidas eficientes de controle em quase todo o planeta, inclusive no Brasil. Considerando-se que cada espécie responde de forma independente às pressões ambientais e principalmente às ações humanas, é de fundamental importância para o desenvolvimento de planos de manejo adequado das suas populações e o ordenamento da exploração sustentável destes recursos que se proceda à caracterização da biodiversidade local, a avaliação das espécies mais capturadas e identificação dos táxons e populações mais suscetíveis à pesca. Contudo, especialmente para os elasmobrânquios, tais parâmetros são de difícil acesso, sobretudo devido às similaridades morfológicas entre as espécies e ainda, devido à prática pesqueira de remoção de partes dos animais como a cabeça e nadadeiras antes dos desembarques, inviabilizando a identificação da maioria das espécies. Segundo os registros de captura de elasmobrânquios elaborados pelo IBAMA nos últimos anos, apenas cerca de 20% dos indivíduos recebem alguma menção quanto à espécie, muitas vezes um nome popular que pode estar relacionado a mais de uma espécie biológica em diversos casos, sendo o restante do produto classificado apenas como cações. A utilização de ferramentas moleculares nos estudos da composição da biodiversidade tem proporcionado sua aplicação em diversas áreas, incluindo na identificação das espécies, no estudo de suas relações evolutivas e no auxílio de programas para a sua conservação. A identificação molecular com a utilização de técnicas do tipo PCR-multiplex e sequências barcode, que identificam características genéticas particulares de cada táxon estão atualmente sendo desenvolvidos e utilizados no reconhecimento das espécies, possibilitando a identificação simultânea de diversas amostras. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies ocorrentes no processo da pesca e avaliar a captura e comercialização de tubarões na região do Litoral do Estado de São Paulo. Foram obtidas 4944 amostras de material coletado no período entre 2011 e 2013 em três pontos de desembarque de pescado no litoral paulista, nas localidades de Ubatuba, Santos e Cananéia, sendo as técnicas da PCR-multiplex e do DNA barcode utilizando parte da sequência do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I utilizadas em 2224 amostras, que possibilitaram a identificação de 1971 amostras. A partir desses dados foram observadas as frequências relativas das espécies para avaliação de captura e comercialização de tubarões nos nestes pontos de desembarque. No ponto de Santos foi possível identificar a presença de onze diferentes espécies, sendo *P. glauca*, *S. zygaena*, *S. lewini*, *R. lalandii*, *R. porosus*, *I. oxyrinchus*, *I. paucus*, *C. falciformes*, *C. signatus*, *C. taurus* e *M. canis*; no ponto de Ubatuba foi registrada a ocorrência de oito diferentes espécies nos desembarques, sendo *P. glauca*, *I. oxyrinchus*, *R. lalandii*, *R. porosus*, *C. taurus*, *G. cuvier*, *S. zygaena* e *S. lewini*, enquanto no município de Cananéia foram encontradas oito diferentes espécies, *R. lalandii*, *R. porosus*, *S. lewini*, *S. zygaena*, *C. falciformes*, *G. cuvier*, *P. glauca* e *I. oxyrinchus*. A demanda de produtos de elasmobrânquios foi mais expressiva no ponto de Santos, o que mostra que esta localidade mereceria maior atenção em relação aos programas de manejo e conservação das espécies mais exploradas. A técnica de PCR-multiplex mostrou-se viável e adequada na identificação das amostras. Além de auxiliar de modo efetivo na caracterização dos produtos

da exploração pesqueira nesta região, o uso de técnicas moleculares de identificação viabiliza estatísticas mais perfeitas e abrangentes, determinando os níveis de exploração por espécie e permitindo a aplicação de planos adequados de manejo e ordenação da exploração pesqueira.

Abstract

Sharks and rays are currently among the most threatened vertebrate to extinction. This is due mainly to the fact that overfishing remains without effective control measures in almost the entire planet, including Brazil. Considering that each species responds independently to environmental pressures, and mainly to human actions, it is of fundamental importance for the development of appropriate management plans and programming the sustainable exploitation of these resources, to proceed to the characterization of local biodiversity, in the assessment of the species caught, in the correct identification of taxa and the most susceptible populations to fishing activities. However, especially for elasmobranches, such parameters are difficult to access, especially due to morphological similarities between species and also because of the fishing practice of removing parts such as the head and fins before landings, making it impossible to identify the most species. According elasmobranches capture records prepared by IBAMA in recent years, only about 20% of individuals receiving some identification indication, often only a popular name that can be related to more than one biological species, with the remainder fishing product classified just as sharks. The use of molecular tools in studies of the composition of biodiversity has provided its application in various areas, including in the identification of the species, in the study of their evolutionary relationships, and in assisting programs for their conservation. The use of molecular identification techniques as the PCR-multiplex type, and barcode sequences using part of the mitochondrial gene sequence Cytochrome Oxidase subunit I that permit to identify particular genetic characteristics of each taxon, are currently being used in the species recognition allowing simultaneous identification of different samples. In the present work, the objective of the study was to identify the species occurring in the fishing process and evaluate the capture and trade of sharks in the coastal region of São Paulo. 4.944 samples were obtained from material collected in the period between 2011 and 2013 in three fish landing points on the coast, in the towns of Ubatuba, Santos and Canaanite, and the techniques of PCR-multiplex and DNA barcode were used in 2224 samples, which allowed the identification of 1971 samples. From these data the relative frequency of species for capture valuation and marketing of sharks in these landing points was observed. At the Santos point it was possible to identify the presence of eleven different shark species, *P. glauca*, *S. zygaena*, *S. lewini*, *R. lalandii*, *R. porosus*, *I. oxyrinchus*, *I. paucus*, *sickle C.*, *C. signatus*, *C. taurus* and *M. canis*; in the point of Ubatuba the occurrence of eight different species was recorded during the landings, which included *P. glauca*, *I. oxyrinchus*, *R. lalandii*, *R. porosus*, *C. taurus*, *G. Cuvier*, *S. zygaena* and *S. lewini*; while in the Cananeia point were found eight different species, *R. lalandii*, *R. porosus*, *S. lewini*, *S. zygaena*, *sickle C.*, *G. Cuvier*, *P. glauca* and *I. oxyrinchus*. Demand for elasmobranch products were more significant at the point of Santos, showing that this location would deserve greater attention in relation to the control and management programs concerning to the most exploited species. The PCR-multiplex technique proved to be feasible and appropriate to identify the samples. Besides helping to effectively characterize the products of fisheries exploitation in this region, the use molecular techniques in the identification of species enables the elaboration of more perfect and comprehensive fishing statistics, indicating viable exploitation rates, ordering the fishing exploitation and allowing the application of appropriate management plans.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 08 |
| 1.1 Elasmobrânquios..... | 11 |
| 1.1.1 Tubarões costeiros..... | 13 |
| 1.1.2 Tubarões Pelágicos..... | 13 |
| 1.2 Exploração Pesqueira..... | 15 |
| 1.2.1 Pesca com Espinhel | 17 |
| 1.2.2 Pesca com Redes..... | 18 |
| 1.3 Identificação Molecular de Espécies..... | 19 |
| 2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 Delineamento do Trabalho..... | 26 |
| 3.1.1 Montagem do banco de dados..... | 26 |
| 3.1.2 Amostragem e locais de coleta..... | 28 |
| 3.1.3 Identificação molecular dos espécimes..... | 29 |
| 3.1.3.1 Extração de DNA..... | 29 |
| 3.1.3.2 Amplificação e sequenciamento..... | 29 |
| 3.1.3.3 Identificação por PCR Multiplex..... | 31 |
| 3.1.3.4 Identificação por DNA Barcoding..... | 32 |
| 4. RESULTADOS..... | 34 |
| 4.1 Resultado das coletas..... | 35 |
| 4.2 Identificação molecular cruzada..... | 35 |
| 4.3 Banco de dados..... | 41 |
| 4.4 Identificação molecular..... | 44 |
| 4.4.1 Identificação por multiplex. | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.2 Identificação por DNA Barcode..... | 45 |
| 4.4.2.1 Definição genética das espécies (análise de ABGD)..... | 45 |
| 4.4.2.2 Definição genética das espécies (análise de GMYC)..... | 46 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 47 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 57 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 60 |
| 7. ANEXOS..... | 71 |
| Anexo I..... | 72 |
| Anexo II..... | 73 |
| Anexo III..... | 74 |
| Anexo IV..... | 75 |
| Anexo V..... | 76 |
| Anexo VI..... | 78 |

Introdução



1 Introdução.

Os peixes sempre tiveram um grande apelo estético, esportivo e alimentar para o ser humano e devido a isso, vêm sendo estudados sob diversos aspectos desde há muito tempo (Castro e Menezes, 1998). Um estudo de revisão da fauna de peixes marinhos do Brasil, abrangendo a área entre o Cabo Orange (4°30'N) até o arroio Chuí (34°45'S) e considerando as 200 milhas náuticas da Zona Econômica Exclusiva, mostrou que estão presentes nessa área cerca de 1.297 espécies de peixes pertencentes principalmente a três Classes, que são Myxini, Chondrichthyes e Actinopterygii, incluindo representantes de 36 Ordens (Menezes et al., 2003). Apesar de ser reconhecida como uma importante região de endemismo marinho e de ter sido recentemente considerada como uma das áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade marinha do Oceano Atlântico (McKenna e Allen, 2002), as porções identificadas como tropical e subtropical do Atlântico Sul ocidental, que abrangem majoritariamente a Zona Econômica Exclusiva brasileira, ainda permanece apenas parcialmente conhecida com relação à composição e à distribuição geográfica de sua fauna de peixes (Menezes et al., 2003). Contudo, deve ser considerado o fato de que grandes esforços tenham sido empreendidos nos últimos anos no sentido de aumentar os conhecimentos sobre os organismos ali existentes (Figueiredo et al., 2002).

A fauna brasileira de elasmobrânquios é rica e diversa, com cerca de 170 espécies registradas, sendo composta por 90 espécies de tubarões e pouco mais de 80 de raias (Gadig, 2001) e destas, pelo menos 60 são espécies marinhas (Menezes *et al.*, 2003). Na região abrangida pela Província Argentina é reconhecida a ocorrência de 6 ordens, 22 famílias, 43 gêneros e 89 espécies de tubarões e 5 ordens, 11 famílias, 32 gêneros e 70 espécies de raias (Rosa e Gadig, 2014). Estes poucos representantes são diretamente impactados em seu ambiente natural principalmente pela intensa atividade pesqueira e destruição de habitats (SBEEEL, 2005), o que se reflete na contínua diminuição de captura de diversas espécies e alterações populacionais expressivas. A ictiofauna de elasmobrânquios do Estado de São Paulo se apresenta como uma composição das ocorrências da Província Argentina, com expressiva abundância faunística e diversidade de espécies (Castro, 1998).

Até há pouco tempo, a captura de elasmobrânquios em todo o mundo podia ser considerada quase totalmente como eventos incidentais, decorrentes de pesca local ou de captura associada, embora sempre tenha havido comercialização em pequena escala da carne e de subprodutos deste grupo de organismos. Historicamente consideradas de baixo valor econômico, várias espécies de elasmobrânquios tornaram-se atualmente alvo de intensiva

pesca comercial, em substituição à captura de peixes ósseos cujos estoques estão em declínio. Por outro lado, o tradicional baixo valor econômico de tubarões e raias tem resultado na falta de incentivos e recursos financeiros destinados à pesquisa, o que sempre deixou em segundo plano o interesse pelo conhecimento dos componentes deste grupo de organismos e a correta identificação das espécies e das populações. Nas últimas décadas, contudo, a captura e comercialização de elasmobrânquios se tornou mais frequente e intensiva, principalmente impulsionadas pelo comércio global de partes específicas do corpo destes animais como as nadadeiras dos tubarões, com grande apelo comercial e geralmente destinadas ao consumo na Ásia. Ao contrário do preço da carne de tubarão, que apresenta geralmente valores inferiores aos dos peixes marinhos comercializados, as nadadeiras podem atingir uma representação comercial expressiva. Com valores tão atrativos, a pesca destes animais passou a ser atividade de expressivo interesse e tem ocorrido de forma generalizada em todo o mundo, sendo a causa de declínio populacional significativo apresentado por diversas espécies (Bonfil, 1994). A regulamentação estabelecida sobre o comércio destes animais no Brasil tem procurado controlar a captura e comercialização e, deste modo, a frota industrial pesqueira tem sido determinada a cumprir rigorosos protocolos para o desembarque do pescado que incluem o controle e registro de todas as espécies capturadas.

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) os dados estatísticos 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 de raias. Ainda segundo a FAO, o Brasil é responsável pela captura de cerca de 12.000 toneladas anuais de tubarões e 5.000 toneladas de raias (FAO, 2009), sendo que a partir do ano 2000 passou a ser considerado pela IUCN (International Union for Conservation of Nature e Natural Resources) como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, estando incluído na categoria “Major Shark Fishing State”. Deste grupo também fazem parte os EUA, África do Sul, Costa Rica, Austrália e Oman (Lack e Sant, 2006). Segundo o IBAMA, nas atividades de captura realizadas no Brasil apenas cerca de 20% dos indivíduos recebem alguma menção quanto à identificação ao nível de espécie, feita muitas vezes apenas pelo nome popular que em diversos casos pode estar relacionado a mais de uma espécie, sendo o restante dos produtos classificado apenas como cações.

Tal problemática é ainda maior principalmente em decorrência do uso de uma prática comum na pesca de elasmobrânquios identificada como *finning*, que é a retirada das nadadeiras, cabeças e vísceras dos animais durante a captura, sendo desembarcadas apenas as peças identificadas como charutos. Esta prática interfere diretamente na identificação

morfológica dos indivíduos, impedindo a correta caracterização e quantificação da pesca por espécie. Assim, as estatísticas pesqueiras deste grupo são incertas para diversas espécies e inexistentes para muitas outras. Apreensões de lotes de nadadeiras têm sido feitas constantemente pelo IBAMA ao longo da costa brasileira, principalmente devido à irregularidades tais como a falta de identificação específica dos tubarões capturados e, frequentemente, ao aproveitamento apenas das nadadeiras, com o descarte do restante do corpo dos animais.

A composição da ictiofauna do litoral do Estado de São Paulo, componente da Província Argentina, apresenta-se como uma área de transição faunística do Atlântico Sul que sofre a influência das águas quentes da Corrente do Brasil e das águas frias da Corrente das Malvinas (Castro, 1998). Esta fauna contém, além dos extremos meridionais e setentrionais de distribuição de espécies tropicais, também formas de áreas temperadas, sendo composta por cerca de 10% de espécies endêmicas e sendo praticamente todas de hábitos demersais (Figueiredo, 1977; Figueiredo e Menezes, 1978, 1980, 2000; Menezes e Figueiredo, 1980, 1985).

1.1 Elasmobrânquios

Tubarões e raias formam o grupo dos Elasmobrânquios e estão entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo, com uma história de vida que se iniciou há cerca de 400 milhões de anos, ainda no período Devoniano (Castro, 1987). Atualmente distribuem-se em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, sendo que a maioria dos animais deste grupo vive no ambiente marinho. Muitos utilizam regiões estuarinas como áreas de berçário, outros entram em rios e há espécies que são endêmicas e vivem em água doce. Habitam desde áreas próximas às praias, recifes, ilhas, em zonas pelágicas situadas entre 0 e 200 metros de profundidade, batiais (de 200 a 2000 metros) e até abissais, situadas a mais de 2000 metros de profundidade. Algumas espécies são bentônicas, como as raias da família Rajidae e os cações-anjo da família Squatinidae; outras, como o tubarão-anequim (*Isurus oxyrinchus*) são pelágicas, restringindo a maior parte de suas atividades às camadas superficiais do oceano (Compagno et al. 2005).

Os tubarões geralmente apresentam corpo alongado e fusiforme, com nadadeiras peitorais destacadas da cabeça e cinco a sete pares de fendas branquiais situadas nas laterais da cabeça. As raias, superordem Batoidea, representam a mais derivada superordem dentre os elasmobrânquios (Compagno, 1977, 1999), sendo caracterizadas pelo corpo achatado dorsoventralmente, com olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça. A boca é ventral,

com cinco pares de aberturas branquiais na maioria das formas, localizadas também na superfície ventral.

A taxonomia da superordem ainda precisa ser mais bem estudada, pois não há uma concordância nas relações entre as ordens. Um grande número de diferentes interpretações existe na literatura científica baseada em caracteres morfológicos, estudos moleculares e de citogenética convencional. Alguns destes trabalhos consideram o grupo das raias como grupo irmão dos tubarões e outros classificam as raias como um subgrupo pertencente aos tubarões modernos (Bigelow e Schroeder, 1953; Compagno, 1977; Stingo, 1979; Dunn e Morrisey, 1995; Carvalho 1996; Peach e Rouse, 2004; Rocco et al., 2007).

As relações existentes entre as raias e os tubarões ainda são discutidas por muitos autores, sendo que, contudo, parece haver concordância sobre o fato de que os Batoidea constituem um grupo monofilético. Várias linhas morfológicas de evidências parecem suportar a derivação deste grupo a partir dos tubarões (de Carvalho, 1996; Shirai, 1996), mas estudos imunológicos e moleculares corroboram a hipótese dos Batoidea como grupo separado dos tubarões (Lawson et al., 1995; Douady et al., 2003).

A biodiversidade dos elasmobrânquios, de uma forma geral, ainda é pouco conhecida. De acordo com o último levantamento realizado por Ebert & Compagno (2007), este grupo é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies, enquanto entre as raias são reconhecidas 5 ordens, 20 famílias e cerca de 574 espécies (Compagno, 1999, 2005). Em águas brasileiras é reconhecida a ocorrência de cerca de 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias marinhas (Menezes et al., 2003). Na região compreendida entre Cabo Frio, no Rio de Janeiro até a Península de Valdés, na Argentina, são encontradas aproximadamente 61 espécies de tubarões, agrupadas em 6 ordens e 19 famílias (Gadig, 2001) e 43 espécies de raias, componentes de 1 ordem e distribuídas em 8 famílias (Menezes et al., 2003).

Embora alguns centros de pesquisa estejam envolvidos em estudos mais recentemente, muito pouco ainda se sabe principalmente sobre a distribuição e ecologia da maioria das espécies de tubarões e raias encontrados na costa brasileira, sendo que devido existência de atividades de pesca pouco organizadas e ausência de programas de controle mais elaborados, diversas espécies destes grupos já podem ter suas populações bastante reduzidas ou até mesmo extintas. Dos elasmobrânquios atualmente existentes, apenas seis famílias tiveram sua origem antes do período Cretáceo (Cappetta, 1987). Como exemplo, a espécie de raia-viola *Rhinobatos horkelli* (Rhinobatidae), com ocorrência registrada desde a costa do Estado da Bahia até o Uruguai, é o representante da família mais antiga das raias atuais, com idade paleontológica de mais de 120 milhões de anos (Cappetta, 1987). Tais referências

demonstram a complexidade do grupo e a necessidade de estudos concentrados visando conhecimentos básicos e informações que possam ser utilizadas para o melhor manejo da pesca e a conservação de espécies e populações.

1.1.1 Tubarões costeiros

No Brasil, o conhecimento sobre as espécies de elasmobrânquios costeiros é ainda insipiente. Entretanto, se comparado às informações disponíveis sobre as formas oceânicas ou mesmo do talude continental, os dados existentes são relativamente melhores. Contudo, as informações disponibilizadas sobre tubarões costeiros do Brasil ainda não são adequadas e suficientes para a implementação de medidas que possibilitem o manejo das pescarias, sendo este conhecimento na maioria dos casos ainda restrito a poucas espécies.

São identificadas como costeiras todas as espécies de elasmobrânquios que ocorrem desde a zona entre-marés até o limite batimétrico de 200 metros, que usualmente define a plataforma continental, incluindo-se zonas estuarinas e formações recifais. Dentro desta concepção podem ser identificadas também espécies de elasmobrânquios consideradas de ocorrência restrita à região costeira e também aquelas com apenas parte de seu ciclo vital nessa área. Neste caso também são consideradas as espécies comuns à plataforma continental e insular. Algumas espécies, como *Carcharhinus obscurus* e *Sphyrna zygaena*, por outro lado, apresentam ciclo de vida que sugere a presença de neonatos e jovens na região costeira, enquanto os adultos ocupam a área oceânica (Motta et al., 1996)

1.1.2 Tubarões Pelágicos

Tubarões pelágicos formam um grupo relativamente pequeno que representa cerca de 6% de todas as espécies de peixes cartilagosos e possuem uma baixa diversidade em relação aos Chondrichthyes costeiros. São espécies geralmente muito ativas, nadam grandes distâncias, habitam a coluna d'água e não estão intimamente associadas com o fundo do oceano. Os componentes das ordens Squaliformes e Lamniformes se apresentam com a maior diversidade entre as espécies oceânicas, enquanto os membros da ordem Carcharhiniformes provavelmente possuem maior biomassa. As ordens Carcharhiniformes, Rajiformes e Squaliformes possuem a maior diversidade entre as espécies semipelágicas, uma vez que não há registro de quimeras (Chimaeriformes) oceânicas ou semipelágicas, sendo que a maioria das espécies habita as plataformas continentais e insulares (Compagno 2008).

A grande maioria das espécies oceânicas vive toda ou grande parte de sua vida longe de grandes massas continentais. Contudo, algumas habitam áreas próximas às plataformas

continentais e insulares, em profundidades de cerca de 200 metros, podendo habitar também áreas costeiras para se alimentar, procriar ou participar de atividades de interações sociais. As espécies semipelágicas penetram áreas oceânicas, mas concentram-se principalmente nas proximidades das grandes massas continentais, junto à plataforma continental (Compagno 2008). Com relação à sua distribuição, as espécies oceânicas podem ser epipelágicas, encontrando-se confinadas às regiões superficiais do oceano, em regiões abrangendo desde a superfície até profundidades de 200 metros; mesopelágicas, quando habitam áreas de pouca luminosidade abaixo da zona epipelágica, em profundidades que variam entre 200 e 1000 metros; ou batipelágicas, quando habitam áreas sem luz a mais de 1000 metros de profundidade, podendo alcançar até 2000 metros (Compagno 2008).

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

1.2 Exploração Pesqueira

Historicamente, o consumo da carne de tubarões e raias manteve-se quase que restrito às populações ribeirinhas até a poucas décadas. Contudo, com a redução dos estoques pesqueiros mais tradicionais, o consumo deste tipo de carne passou a ser mais difundido e

apreciado. Outro expressivo fator de incentivo à pesca de elasmobrânquios foi evidenciado pelo consumo asiático de nadadeiras de tubarões que, devido aos preços praticados no comércio, tem promovido a captura de tubarões em praticamente todos os mares. Dados estatísticos sobre a exploração pesqueira da FAO têm registrado significativo aumento na captura de elasmobrânquios para abastecimento do mercado de pescado e também, de modo específico, do comércio de nadadeiras. Embora ocupando a oitava posição na captura mundial deste recurso, o Estado de São Paulo responde pela captura de 75% dos elasmobrânquios explorados em toda a região sudeste do Brasil de acordo com Bonfil (1994). Entretanto, segundo o relatório da VIII Reunião do Grupo Permanente de Estudos (GPE) sobre Atuns e Afins, esse é o único Estado da região que possui registros de captura de elasmobrânquios (SBEEL, 2005). Por outro lado, os dados estatísticos existentes não abrangem a pesca artesanal, o que pode ser constatado nas informações sobre a produção pesqueira de toda a faixa litorânea brasileira. Nos registros de captura de elasmobrânquios dos últimos anos elaborados pelo IBAMA (2007), apenas cerca de 20% dos indivíduos recebem alguma menção de identificação ao nível de espécie, muitas vezes com a citação apenas do nome popular, o que, certamente tem causado grandes deficiências na quantificação e qualificação do produto da pesca, além de desqualificar dados estatísticos das capturas. Neste sentido deve ser ressaltado também que a deficiência de informações sobre a biologia básica das espécies, com restrição de dados sobre a correta identificação, reprodução, crescimento, distribuição e comportamento certamente contribui para mascarar as alterações populacionais que têm sido detectadas em um grande número de espécies.

Em um contexto global, um grande número de espécies tem sido incluído na lista vermelha das espécies ameaçadas proposta pela “International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN” (Camhi et al., 1998) devido principalmente à pesca predatória que recai sobre os componentes deste grupo. Nesse sentido, estudos realizados no Brasil serviram de base para a inclusão, nessa lista, de espécies ameaçadas em águas brasileiras, inclusive espécies endêmicas, a saber: a raia-viola (*Rhinobatos horkelli*), o tubarão-quati (*Isogomphodon oxyrinchus*), tubarão boca de velha listrado (*Mustelus fasciatus*), o peixe-serra (*Pristis spp.*), tubarão-mangona (*Carcharias taurus*), tubarão bico de cristal (*Galeorhinus galeus*) e o cação-anjo (*Squatina spp.*) (Lessa et al., 1999).

Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade da maioria das espécies de tubarões e raias frente à exploração pesqueira (Castro et al., 1987; Camhi et al., 1998), trabalhos de controle e manejo da exploração das espécies deste grupo ainda são pouco expressivos, tendo como maior entrave a falta de informações básicas corretas sobre captura,

desembarque e comercialização. 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). Contudo, a estatística ainda é incerta para diversas espécies e inexistente para muitas outras, devido principalmente às similaridades morfológicas entre as espécies e grupos e, na maioria dos casos, à prática de pesca onde são retiradas partes importantes para identificação dos animais antes do desembarque.

Atendendo ao mercado asiático, as nadadeiras são cortadas e acondicionadas separadamente e para a melhor conservação da carne são retiradas e descartadas as cabeças e vísceras dos indivíduos, sendo desembarcadas apenas as peças conhecidas como charutos, no caso dos tubarões. Esta prática interfere diretamente na identificação morfológica dos indivíduos, impedindo a sua caracterização e a quantificação da pesca por espécie, sendo a maior parte dos elasmobrânquios desembarcados classificados na estatística pesqueira mundial apenas como cação ou raia (Mendonça et al., 2009a). Considerando-se que cada espécie responde de forma independente às pressões exercidas pelo ambiente e, neste caso, às alterações causadas principalmente pela ação do homem, é de fundamental importância para o desenvolvimento de planos de recuperação e ordenamento de uma exploração sustentável a determinação de quais são as espécies mais capturadas, em que regiões da costa elas ocorrem com maior frequência e quais populações já apresentam problemas de decréscimo populacional e maior risco de extinção.

No ambiente natural, as maiores ameaças aos elasmobrânquios são representadas pela atividade pesqueira, pela destruição dos habitats e pela poluição do ambiente marinho, que podem se apresentar como problemas para a administração da pesca e conservação dos estoques. Somam-se a estes fatores as limitações ligadas à estratégia de vida das espécies (Camhi et al. 1998). As características do ciclo de vida do tipo K-Estrategista apresentado por grande número de espécies deste grupo de organismos tornam os Chondrichthyes frágeis e suscetíveis à sobreexploração, pois geralmente apresentam crescimento lento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e alta longevidade (Hoenig & Gruber 1990). Tais características constituem fatores limitantes para uma reação rápida das espécies à mortalidade excedente imposta aos estoques pela sobrepesca, em decorrência da estreita relação entre estoque e recrutamento (Holden 1974; Holden 1977).

Os modelos utilizados na gestão da pesca tradicional de teleósteos não se aplicam aos elasmobrânquios, tornando o gerenciamento destes recursos extremamente complexo. Em escala mundial, as dificuldades de manejo dos estoques de elasmobrânquios aparecem

principalmente em decorrência da falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações. A atividade pesqueira envolve o paradoxo de que tubarões e raias têm baixo valor econômico, o que lhes confere baixa prioridade quando se consideram aspectos de pesquisa e da conservação, ao passo que a demanda por subprodutos como as nadadeiras é muito alta, estimulando o aumento da exploração (Bonfil 1994). Assim, principalmente devido à intensa atividade pesqueira, verifica-se que novas espécies de elasmobrânquios são incluídas a cada dia em todo o globo na lista vermelha das espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN (Camhi et al. 1998).

1.2.1 Pesca com Espinhel

Atualmente, cerca de 60% do peso total desembarcado como resultante das pescarias oceânicas de atuns e peixes afins com espinhel tipo "longline" tradicional (multifilamento) corresponde a tubarões (Amorim, 1998). Nas capturas de espinhel monofilamento (q.v. Evangelista et al., 1998 e Marin et al., 1997) dirigidas para espadarte (*Xiphias gladius*), os desembarques de peças de elasmobrânquios representariam cerca de 20% do volume total. Essa modalidade de pesca é desenvolvida geralmente além da plataforma continental ou sobre bancos por embarcações nacionais ou estrangeiras arrendadas. Este volume de pesca não é de aceitação tranquila, pois estudos recentes apresentados pelo Programa de observadores de bordo do Uruguai realizados frente à região de Rio Grande demonstraram que a captura em número dos tubarões pode alcançar até 63,9% do total (Marin et al., 1997). Experimentos realizados com o Navio Oceânico Atlântico Sul da FURG, como parte do projeto ARGO, também indicam uma participação numérica muito maior do que 20%, com fortes variações sazonais. Nessas modalidades de pesca é comum a prática do "finning" dos tubarões, ou seja, a retiradas e utilizadas apenas das nadadeiras dos exemplares, sendo o corpo descartado no mar (IBAMA, 1998). Desse modo, os desembarques não refletem a participação das espécies nas capturas, registrando-se apenas o desembarque de peças sem identificação precisa (Bonfil, 1994). Essa prática, comum nas frotas sediadas no Brasil que se caracterizam principalmente por serem contratadas por arrendamento, não contribui de forma efetiva para o conhecimento da biodiversidade do grupo. Além de impossibilitarem a correta identificação das espécies e o estabelecimento de estatísticas confiáveis, tornam pouco eficientes atitudes de regulamentação e controle da pesca, do mesmo modo que dificultam a tomada de medidas de conservação e manejo adequado das populações e estoques.

1.2.2 Pesca com Redes

Uma frota de emalhe de superfície e fundo tem operado no Brasil em várias localidades, com atividades de pesca nas regiões de Rio Grande (RS), Itajaí (SC), Santos (SP), Cabedelo (PB) e Natal (RN). Na ausência de legislação pertinente no Brasil até 1998, redes de até 7500 metros foram utilizadas no emalhe de superfície e de até 25000 metros no emalhe de fundo em Itajaí e Rio Grande. O tamanho destes instrumentos de pesca está muito além dos valores recomendados internacionalmente (2500 metros), sendo este apetrecho considerado predatório e causador de sabidas interações para a fauna periférica, atingindo diversas espécies que incluem mamíferos e tartarugas marinhas, grupos legalmente protegidos (Marquez et al., 1998; Kotas et al., 1995).

A redução das capturas, com a consequente perda de rentabilidade, levou ao abandono deste apetrecho em curto espaço de tempo no Nordeste do país, sendo que a maioria das embarcações até então utilizadas foi substituída por outras artes de pesca, embora estas ainda persistam em um número não quantificado na região do Estado da Paraíba. Atualmente pode ser constatado que a pesca de emalhe de fundo ainda é também realizada em Rio Grande durante todo o verão com a utilização de redes que, não raro, são maiores do que atualmente é permitido. Experimentos realizados por Kotas et al. (1995) demonstraram que no período de 1993 a 1996 a espécie *Sphyrna lewini*, alvo das capturas com este tipo de instrumento de pesca em Santa Catarina começou a dar sinais de decréscimo populacional devido à sobrepesca.

Recentemente foram incluídas na lista de espécies ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo as seguintes espécies alvo da pesca de emalhe costeiro: *Carcharias taurus*, *Carcharhinus brevipinna*, *C. limbatus*, *C. obscurus*, *C. plumbeus*, *Pristis perrotteti*, *P. pectinata* e *Ginglymostoma cirratum*, em uma clara demonstração do elevado impacto dessa arte de pesca sobre as populações de elasmobrânquios do Sudeste do país (q.v. Decreto Lei 42.838; Diário Oficial do Estado de São Paulo, vol. 108, no. 5 de 5/2/98). A partir de 1998, através da Portaria do IBAMA no. 121 de 24/8/1998 tornou-se ilegal o uso ou transporte de redes maiores do que 2500 metros, tanto para o emalhe de superfície (deriva) como para o emalhe de fundo. Todavia, não se tem notícia até o momento da efetiva implementação dessa portaria, com a devida fiscalização das redes.

1.3 Identificação Molecular de Espécies

Muitos conceitos de espécie foram propostos ao longo da história, incluindo aquelas referentes a abordagens tipológicas, morfológicas, biológicas, por isolamento reprodutivo,

filogenéticas, entre outras. Ainda que extensos debates sejam constantemente travados em relação a esses conceitos de espécie (De Queiroz, 2005; Waugh, 2007), do ponto de vista prático são os taxonomistas os principais profissionais responsáveis pela caracterização dessas entidades biológicas e sua classificação, tornando-as palpáveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome específico formulado de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (Köhler, 2007).

A atribuição de um nome não constitui uma simples aplicação de regras de nomenclatura, mas sim na elaboração de uma hipótese segundo a qual um determinado conjunto de caracteres, usualmente morfológicos, é capaz de identificar uma entidade denominada espécie, com características biológicas próprias e história evolutiva independente de outras entidades biológicas similares. Esta hipótese pode ser testada de diversas maneiras. Adicionalmente, quando a descrição das espécies é baseada em uma ampla base de dados, elas se tornam hipóteses científicas interessantes, permitindo a elaboração de previsões 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 as primeiras ferramentas disponíveis aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o desenvolvimento de novos métodos de estudos, outras metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade, sendo que há aproximadamente 30 anos, com o advento das técnicas moleculares, a análise de sequências de genes de DNA ribossômico passou a ser utilizada para investigar as relações evolutivas em níveis taxonômicos superiores (Woese e Fox, 1977). A partir deste novo tempo, as pesquisas utilizando sequências do DNA mitocondrial dominaram a Sistemática Molecular, com ênfase inicial para o período do final da década de 70 e início da década de 80 (Avise, 1994) e hoje está metodologia constitui um dos principais sustentáculos deste tipo de investigação, com um úmero crescente de revistas científicas dedicadas exclusivamente à esse campo como *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *Molecular Biology and Evolution* e *Journal of Molecular Evolution*, entre outras.

Entre os dados moleculares utilizados nas áreas de taxonomia e de sistemática, concorrem de modo associativo as análises citogenéticas, bioquímicas, os padrões de isozimas e dados imunológicos e, mais recentemente, os dados moleculares, tendo por base as sequências de nucleotídeos do DNA (Hillis et al., 1996). Nos estudos taxonômicos, essas 'novas' categorias de dados têm sido sempre associadas aos dados morfológicos, sem

pretender substituí-los e exemplos desse tipo de integração são cada vez mais comuns, como na descrição de *Gymnotus sylvius* (Albert et al., 1999), na descrição de uma nova espécie de tainha, *Mugil rubrioculus* (Harrison et al., 2007) e a descrição de novas espécies de *Moenkhausia* (Benine et al., 2009), entre muitas outras. Tais exemplos são particularmente relevantes, pois são referentes à identificação e descrição taxonômica de novas espécies e de gêneros de peixes bastante complexos, que foram descritas após o acúmulo de evidências citogenéticas e moleculares, que demonstravam a singularidade das amostras em estudos comparativos aos seus respectivos congêneres.

Entre os elasmobrânquios, análises populacionais utilizando isozimas de uma suposta única espécie de cação-anjo *Squatina argentina*, de ocorrência no sul do país, revelaram a existência de um complexo de três espécies, possibilitando a descrição das duas novas formas até então tidas como espécies crípticas (Solé-Cava et al., 1983). Este fato é extremamente relevante, considerando-se que há mais de 25 anos atrás os representantes deste gênero já eram considerados ameaçados em águas brasileiras.

Embora ferramentas moleculares tenham fornecido uma ampla gama de novas oportunidades para estudar questões em Biologia Evolutiva, como nos processos de especiação e em Sistemática Filogenética, só recentemente foi proposto que um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) seria suficiente, em muitos metazoários, para identificá-los a nível de espécie (Hebert et al., 2003a, 2003b). O uso dessa metodologia, denominada *DNA barcode*, ganhou relevância com a criação do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) em 2004, cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra representando sequências parciais de DNA do gene COI, com o objetivo de facilitar o processo de automação na identificação das espécies e proporcionar uma melhor compreensão e interpretação da biodiversidade global (ver o sítio www.barcoding.si.edu para maiores detalhes). A consulta à literatura disponível mostra que outros segmentos gênicos também têm sido sugeridos para esse mesmo fim, como dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (Vences et al., 2005), além de uma lista de genes com características de identificação específica de variações entre indivíduos (Lahaye et al., 2008), porém, por questões de padronização e pelo seu aparente melhor desempenho, o CBOL adotou como sequência padrão o fragmento citado do gene COI. Contudo, considera-se que a associação de metodologias e de marcadores pode e deve sempre ser utilizada para uma identificação correta das espécies.

Essencialmente, o que os usuários da metodologia de *DNA barcode* pretendem é tornar possível a individualização das formas biológicas e facilitar a descoberta e

identificação de novas espécies (Moritz & Cicero, 2004). Os estudos realizados com esta metodologia têm sido extremamente satisfatórios, apresentando um grau de resolução taxonômica maior que 95% (Hebert et al., 2003a, 2003b). DeSalle et al. (2005), reforçam a proposição do estabelecimento de uma ponte entre as pesquisas moleculares e morfológicas, visando desta forma gerar o aprimoramento do processo de identificação de espécies. Tal envolvimento metodológico certamente deverá ampliar o conhecimento sobre a diversidade de mecanismos envolvidos na origem das espécies e sua diferenciação, sendo de suma importância, portanto, a condução conjunta destes trabalhos por especialistas em Biologia Molecular e Taxonomia.

Exemplos significativos da propriedade do uso de *DNA barcode* para a identificação de espécies estão se tornando cada vez mais frequentes na literatura. Entre as referências disponíveis com peixes pode-se citar o trabalho pioneiro de Lindstrom (1999) referente à identificação molecular de larvas de gobiídeos; o trabalho de Callejas e Ochando (2001), com a identificação molecular de oito espécies de *Barbus* da Península Ibérica de difícil identificação com o uso de marcadores morfológicos; o trabalho de Comesaña et al., (2003), onde os autores descrevem a identificação de espécies de linguado de interesse comercial; o trabalho de Pegg et al., (2006), com a utilização da técnica de *DNA barcode* para identificar larvas de peixes coletadas na Grande Barreira de Recifes da Austrália e os trabalhos de identificação de faunas, como o apresentado por Ward et al., (2005) referente à identificação de peixes marinhos da Austrália e o de Hubert et al., (2008), realizado com peixes de água doce do Canadá. Deve ser ressaltado que outras aplicações possíveis desta metodologia apresentam-se cada vez mais diversificadas, como o uso da identificação molecular dos organismos componentes da dieta dos indivíduos, nos estudos de conteúdo estomacal (Symondson, 2002).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares aplicados à identificação de espécies tem se mostrado de grande importância, sobretudo para a quantificação da exploração de populações naturais, avaliação e fiscalização do comércio de espécies sob a proteção governamental, assim como pode prover ferramentas para a certificação de produtos processados, agregando valor à sua comercialização. Trabalhos que visam à identificação genética de produtos oriundos da pesca estão sendo mais frequentes na literatura, com alguns deles direcionados especificamente ao grupo dos tubarões (Blanco et al., 2008; Magnussen et al., 2007; Clarke et al., 2006; Shivji et al., 2005). Um trabalho mais recente foi apresentado por Mendonça et al., (2009), no qual foi desenvolvida e aplicada uma metodologia de identificação simultânea para nove espécies de tubarões fortemente explorados pela pesca na

costa brasileira, sendo algumas delas de distribuição e exploração global. Este método baseia-se na utilização de protocolos simples de PCR-multiplex e/ou PCR-RFLP, a partir da composição nucleotídica do gene Citocromo Oxidase I (COI). Outros dois trabalhos recentes, também buscaram a identificação genética das raias *Rhinobatos horkelli*, *R. percelens* e *Zapteryx brevirostris*, utilizando estas mesmas ferramentas (Mariguela et al., 2009; De Franco et al., 2009). Dentre as espécies de raias, *R. horkelli* é considerada em risco de extinção e sua pesca é proibida em toda a costa brasileira. Contudo, as dificuldades para distinção morfológica desta espécie com relação às demais espécies de raias que ocorrem em simpatria, principalmente após a remoção de partes como as cabeças dos indivíduos capturados, tem tornado a aplicação da legislação vigente impraticável ou ineficiente. Desta forma, estes marcadores genéticos moleculares podem ser utilizados efetivamente na fiscalização da pesca e dos desembarques de pescado, contribuindo para a identificação correta e objetiva das espécies, além de possibilitar o desenvolvimento de bancos de DNA para avaliações populacionais e estabelecimento de planos efetivos de manejo e conservação dos estoques pesqueiros.

O conhecimento atual e utilização das ferramentas moleculares têm proporcionado sua aplicação em diversas áreas, que incluem desde a identificação da biodiversidade, o estudo das relações evolutivas entre os componentes dos sistemas ecológicos e, principalmente na última década, o auxílio no desenvolvimento de programas visando ao melhor manejo das populações e o fornecimento de informações que possibilitem o estabelecimento de programas adequados de conservação. Assim, este estudo está iniciando a caracterização da diversidade genética das espécies de tubarões e raias da costa do Estado de São Paulo, componente de área oceânica identificada como Província Argentina, por meio da aplicação de marcadores genéticos moleculares, procurando desenvolver e aplicar métodos forenses de identificação dos componentes deste sistema. Considera-se que as informações obtidas poderão fornecer subsídios para uma avaliação mais consistente sobre as espécies de elasmobrânquios desta região, a intensidade de captura nas atividades de pesca e o comércio destes organismos na costa do Estado de São Paulo. Espera-se ainda que a identificação correta das espécies torne possível o desenvolvimento de um banco genético das espécies de tubarões e raias da região, que possa ser de utilidade para a correta identificação das espécies, contribuindo para a proposição de medidas que promovam a conservação das espécies de tubarões e raias nesta região, sobretudo daquelas mais ameaçadas de extinção.

Objetivos



2 Objetivos

Considerando as características biológicas, evolutivas e taxonômicas dos elasmobrânquios, a crescente exploração pesqueira e os problemas relacionados à sua quantificação e controle nas atividades da pesca, este estudo busca caracterizar a diversidade das espécies de tubarões da costa do Estado de São Paulo com a aplicação de ferramentas moleculares. Procurar-se-á desenvolver e utilizar métodos genéticos de identificação molecular das espécies de tubarões capturadas, visando estabelecer marcadores espécie-específicos que possam auxiliar na correta identificação e caracterização das espécies e, em decorrência dos dados obtidos, avaliar a captura e comércio de elasmobrânquios na costa deste Estado com dados por espécie, obtidos durante os procedimentos de desembarque dos produtos. Estas informações permitirão identificar também a possível existência de espécies crípticas.

Por outro lado, a obtenção e catalogação das amostras deverão resultar no estabelecimento de um banco genético contendo material preservado das espécies capturadas para estudos populacionais moleculares, visando o ordenamento de informações para subsidiar programas de manejo adequados de exploração sustentável dos estoques pesqueiros das espécies de tubarões nesta região.

2.1 Objetivos específicos

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

1. desenvolver marcadores moleculares específicos que permitam a identificação dos produtos de desembarque de pescado relacionado ao comércio de elasmobrânquios;
2. caracterizar a composição nucleotídica do gene mitocondrial COI como candidato ao desenvolvimento de marcadores eficientes para a identificação de espécies de tubarões da costa do Estado de São Paulo, componente da Província Argentina;
3. avaliar e identificar a possível ocorrência de espécies crípticas;
4. avaliar a captura e comercialização de tubarões com dados por espécie nos importantes centros de desembarque da costa do Estado de São Paulo, em localidades da Baixada Santista, Ubatuba e Cananéia, utilizando os marcadores moleculares desenvolvidos;
5. criar e organizar um banco genético das espécies de tubarões de ocorrência na costa do Estado de São Paulo, com vistas à realização de estudos populacionais moleculares.

Material e Métodos



3 Material e Métodos

3.1 Delineamento do trabalho

As atividades referentes ao trabalho foram antecedidas por três etapas fundamentais:

- a) Sequenciamento e análises de amostras das espécies de tubarão que são mais abundantes no litoral brasileiro para a montagem do banco de dados comparativo.
- b) Coleta de material biológico de Elasmobrânquios capturados nos principais entrepostos pesqueiros do litoral paulista.
- c) Identificação molecular das amostras por duas técnicas fundamentais, sendo a primeira o PCR multiplex com *primers* espécie-específicos. Em seguida, para as amostras não identificadas pelo PCR multiplex, foi utilizada uma segunda técnica que consistiu na análise de DNA barcode. Com esta técnica, as sequências de todas as amostras foram comparadas com as informações do banco de dados das espécies que ocorrem no litoral brasileiro (banco de dados gerado na etapa a).

A partir do estabelecimento dos marcadores moleculares e dos métodos a serem aplicados nas análises, foram processadas as amostras obtidas nos locais de coleta.

3.1.1 Montagem do banco de dados.

O banco de dados foi montado a partir de amostras previamente identificadas morfológicamente e classificadas por especialistas, sendo que alguns exemplares foram fixados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da UNESP. Nem todos os exemplares puderam ser depositados em coleções biológicas muitas vezes devido ao tamanho dos indivíduos que podem chegar a vários metros de comprimento. Nesse sentido, a fim de garantir a repetibilidade e a maior consistência e confiabilidade para o banco de dados, foi realizado o sequenciamento de três segmentos gênicos de cada amostra, sendo estes referentes ao COI, ao Citocromo B, (Cit B) e ao sítio de DNAr 16S (16S). Esses seguimentos foram blastados no GenBank buscando possível afinidade e identificação com sequências depositadas e cujos *vouchers* estivessem depositados em coleções biológicas.

Foram assumidas cinco diferentes modalidades de identificação para atribuir nomes específicos às amostras que compunham o banco de dados, sendo 1) ID Total - quando todos os seguimentos gênicos de uma determinada amostra indicavam afinidade de 100% com uma espécie e essa era a mesma indicada pela identificação morfológica, sendo que neste caso de

identificação total a amostra era relacionada diretamente à espécie; 2) ID Morfológica – quando as sequências dos três genes analisados não mostrassem compatibilidade de 100% com alguma sequência presente no GenBank, cujo voucher estivesse depositado em coleções biológicas, sendo neste caso assumida a nomenclatura atribuída pela identificação morfológica; 3) ID Molecular - quando um ou mais segmentos gênicos apresentaram identidade com sequência presente no GenBank, sendo esta proveniente de indivíduos presentes em coleção. Nesse caso, mesmo que a identificação morfológica apontasse para uma espécie diferente, foi adotado o nome do exemplar presente em coleções biológicas, garantindo assim que os dados pudessem ser checados. 4) ID Parcial - quando nem todos os tipos de identificação (morfológica, COI, 16s, CitB) possuíam 100% de similaridade com alguma espécie. Nesse caso foi adotado o nome do exemplar presente nas identificações positivas; e 5) ID Incongruente – quando foram encontradas diferentes indicações de nomes, sendo neste caso adotado o nome atribuído pela maioria das identificações. Um resumo dos critérios adotados para a nomeação das amostras do banco de dados está apresentado na Figura 1. As sequências de COI dos indivíduos presentes em nosso banco de dados serviram como base comparativa para a atribuição de nomes para todas as amostras obtidas nos desembarques comerciais.

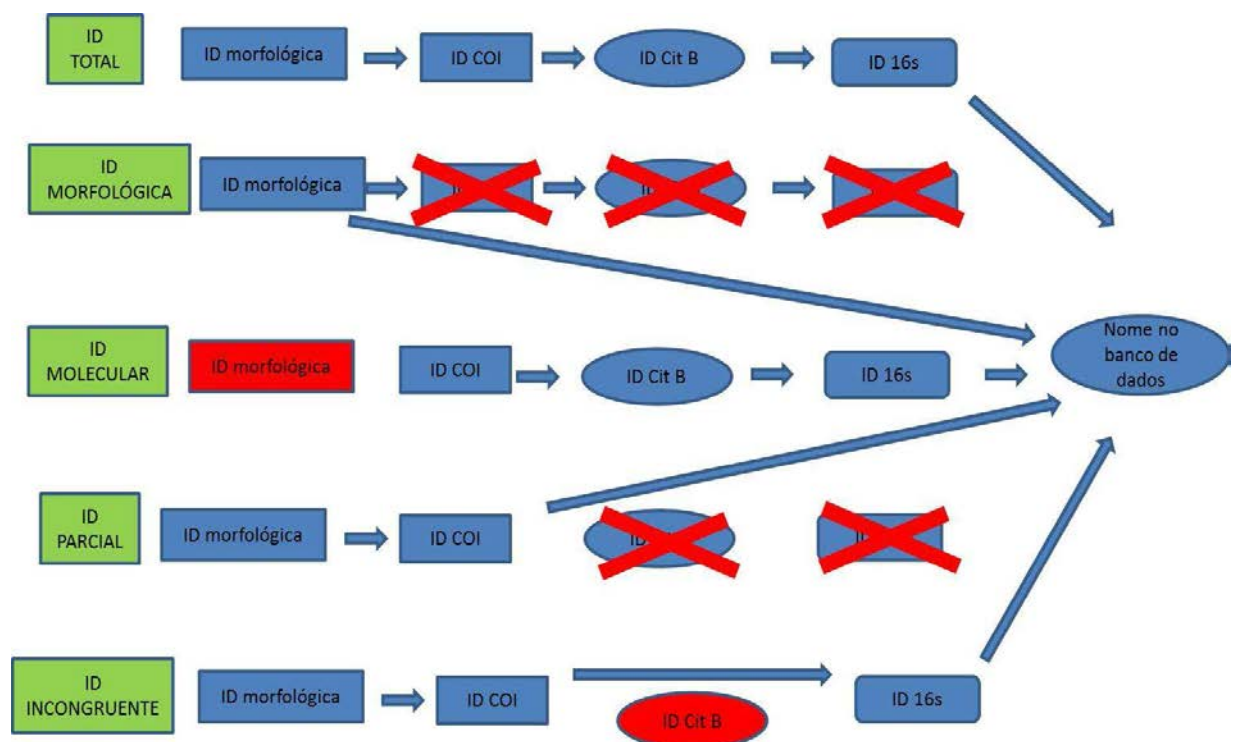


Figura 1 - Esquema da representação dos padrões de identificação adotados no trabalho para a montagem do banco de dados utilizados no presente estudo.

3.1.2 Amostragem e locais de coleta

As amostras foram obtidas em desembarques de frotas artesanais, obtidas por petrecho de redes e de frotas industriais, obtidas por petrecho de espinhel, em localidades situadas nos municípios de Cananéia (litoral sul do Estado de São Paulo), Santos (região central do litoral do Estado de São Paulo) e Ubatuba (litoral extremo norte do Estado de São Paulo), que representam uma porção do litoral da região do talude Sudeste-Sul do Brasil (Figura 2).

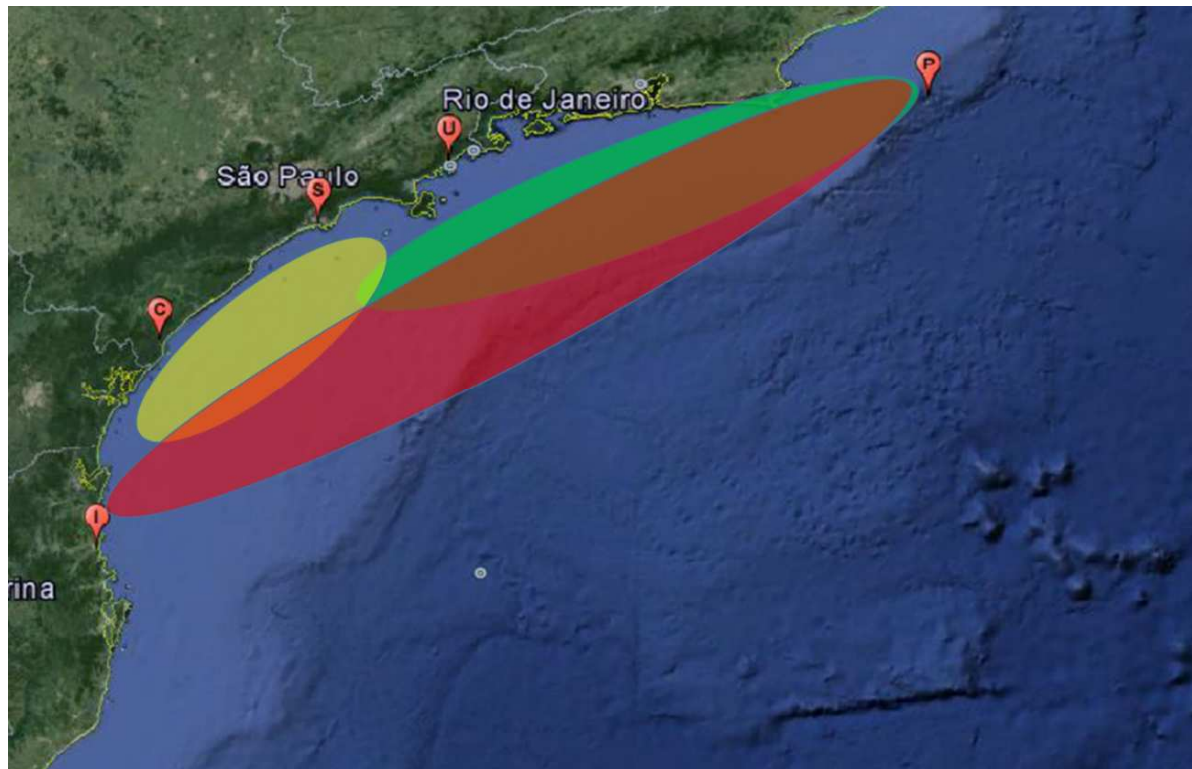


Figura 2 - Porção da plataforma Sudeste-Sul do Brasil, abrangendo região do litoral compreendida desde o Estado do Rio de Janeiro até o Estado do Rio Grande do Sul. São discriminados os pontos de coleta no litoral do Estado de São Paulo, identificados por Cananéia, representado pelo marcador (C) ($24^{\circ}49'50''\text{S}/47^{\circ}54'58''\text{O}$) e pela elipse amarela representando a área de atuação dos barcos pesqueiros desde Santos até a Ilha do Mel, PR; por Santos, representado pelo marcador (S) ($23^{\circ}46'30''\text{S}/46^{\circ}19'38''\text{O}$), com atuação dos barcos que atuam na área representada pela elipse vermelha; e Ubatuba (U) ($23^{\circ}11'18''\text{S}/45^{\circ}04'01''\text{O}$) no litoral norte, com barcos atuando na área representada pela elipse verde.

Na plataforma Sudeste-Sul do Brasil, que abrange a região do litoral compreendida desde o Estado do Rio de Janeiro até o Estado do Rio Grande do Sul, estão discriminados os pontos de coleta de amostras identificados por Cananéia ($24^{\circ}49'50''\text{S}/47^{\circ}54'58''\text{O}$), com

região de atuação dos barcos pesqueiros representada pela elipse amarela, com área desde Santos (SP) até a Ilha do Mel, PR; por Santos, considerado o maior ponto de desembarque pesqueiro (23°46'30"S/46°19'38"O) e com região de atuação dos barcos pesqueiros desde as plataformas petrolíferas no Rio de Janeiro (P) (22°51'10"S/40°36'20"O) até Itajaí (I) (26°44'14"S/48°36'02"O), área representada pela elipse vermelha; e Ubatuba, no litoral norte (23°11'18"S/45°04'01"O), representada pela elipse verde, com área de atuação dos barcos pesqueiros desde Santos (23°46'30"S/46°19'38"O) até a região das plataformas petrolíferas no RJ (P) (22°51'10"S/40°36'20"O).

As coletas de amostras foram realizadas no período de abril de 2011 a janeiro de 2013, totalizando 4892 amostras de diferentes espécies de tubarões, sendo 2330 provenientes de Cananéia, 1337 de Ubatuba e 1225 de Santos. As amostras de tecido extraídas dos exemplares foram preservadas em etanol 95%. Alguns dos espécimes coletados foram fixados inteiros em formol 10%, conservados em álcool 70% e identificados com os respectivos números de *voucher*, sendo utilizado o número 48004 para a espécie *Mustelus canis* e de 48005 a 48007 para *Rhizoprionodon* sp. Estes exemplares encontram-se depositados e referenciados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu.

3.1.3 Identificação molecular dos espécimes

3.1.3.1 Extração de DNA

O DNA total foi extraído com a utilização de protocolos de três metodologias distintas, sendo a primeira referente à extração salina descrita por Aljanabi *et al.*, (1997); na segunda foram utilizados kits de extração como Phire® Animal Tissue Direct PCR, seguindo as instruções do fabricante e a terceira utilizou o processo de extração por placas com filtro (AcroPrep™96Filter Plates, Pall Life Sciences), conforme descrito por IVANOVA *et al.*, (2006).

3.1.3.2 Amplificação e sequenciamento

A amplificação de todos os seguimentos do DNA mitocondrial foi realizada utilizando reações em cadeia de polimerase (PCR) com os *primers* descritos na Tabela 01, utilizando 12,5µl de solução contendo 8,7 µl de água ultra-pura autoclavada, 1,7 µl de tampão 1X KAPA Taq Tampão B PCR (que inclui MgCl₂), 0,20 µl de dNTP, 0,20 µl de MgCl₂, 0,25 µl de *primer Forward* (gene específico) a 10µM, 0,25 µl de *primer Reverse* (gene específico) a 10 µM, 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (Kapa Taq DNA Polimerase), e 1 µl de DNA. A

PCR foi realizada seguindo o seguinte programa: denaturação inicial a 98°C durante 4 minutos, seguida de etapa de 35 ciclos dos passos de denaturação a 98°C durante 5 segundos, 55°C durante 5 segundos para anelamento e extensão a 72°C durante 30 segundos. Após esses ciclos foi realizada a extensão final durante 2 minutos a 72°C. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando Bluegreen®, sob luz azul.

Os segmentos gênicos resultantes foram purificados com ExoSap e submetidos a uma reação de sequenciamento com 2µl de pré-mix (fornecido no kit - Dye-Terminator), 2µl de produto de PCR purificado (gene específico) e 2µl de cada *primer*, os mesmos utilizados para a amplificação e cada segmento gênico. Esta solução foi em seguida submetida às seguintes condições de tempos de ciclagem e temperatura, sendo os passos 2 a 4 repetidos 30 vezes: 1) 96° por 2 minutos para desnaturação inicial; 2) 96° por 30 segundos para desnaturação; 3) 56° por 15 segundos de anelamento dos *primers*; e 4) 60° por 1 minuto de extensão da cadeia nucleotídica final. Em seguida, o produto dessa reação foi purificado com lavagens sucessivas com Etanol, preparando-o para a checagem da composição nucleotídica em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystem®)

Na Tabela 1 estão relacionados os *primers* utilizados para as amplificações e sequenciamento dos segmentos gênicos. O Seguimento do COI foi utilizado tanto para a montagem do banco de dados quanto para a identificação das amostras por DNA barcode.

Tabela 1 - Lista dos *primers* utilizados na montagem do banco de dados.

| <i>Identificação do primer</i> | <i>Sequência dos primer</i> | <i>Autor do primer</i> |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Fish F1 | 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' | <i>Ward et al., (2005)</i> |
| Fish R1 | 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' | <i>Ward et al., (2005)</i> |
| 16s F | 5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' | <i>Palumbi et al., (1996)</i> |
| 16s R | 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' | <i>Palumbi et al., (1996)</i> |
| Cit-b F | 5'-CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA-3' | <i>Branicki et al., (2003)</i> |
| Cit-b R | 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA-3' | <i>Branicki et al., (2003)</i> |

3.1.3.3 Identificação por PCR Multiplex

Para identificação das espécies foi utilizada inicialmente a metodologia de PCR-Multiplex, sendo que como *primers* espécie-específicos foram utilizados os mesmos obtidos por Mendonça *et al.*, (2009), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* espécie-específicos utilizados no presente trabalho, seguindo indicação de Mendonça *et al.*, (2009).

| <i>Espécie</i> | <i>Primer</i> | <i>Fragmento (pb)</i> |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| <i>Isurus oxyrinchus</i> | 5' CTT CCA CTT GGC TGG GTA TCT CG 3' | 280 |
| <i>Rhizoprionodon porosus</i> | 5' CCC ATT AGC TAG TAA TA 3' | 340 |
| <i>Rhizoprionodon lalandii</i> | 5' TCA ACC TGG ATC TCT TTT AGG T 3' | 620 |

As reações de amplificação foram realizadas incluindo o *primer* Fish F, utilizado como controle positivo da reação, e o *primer* Fish R, além de outros 3 *primers* espécie-específicos para identificação, além do DNA genômico de cada uma das amostras.

Na realização das reações foram utilizados os seguintes componentes: 12,5µl de solução contendo 8,5 µl de água ultra-pura autoclavada, 1,7 µl de tampão 1X KAPA Taq Tampão B PCR (que inclui MgCl₂), 0,20 µl de dNTP a 10 µM, 0,25 µl de *primer* Fish F a 10µM, 0,25 µl de *primer* Fish R a 10 µM, mais 0,20 µl de cada um dos *primers* espécie-específicos descrito por Mendonça *et al.*, (2009), 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (Kapa Taq DNA Polimerase) e 1 µl de DNA das espécies. Esta solução foi em seguida submetida às seguintes condições de tempos de ciclagem e temperatura, sendo os passos 2 a 4 repetidos 30 vezes: 1) 95° por 5 minutos para desnaturação inicial; 2) 95° por 30 segundos para desnaturação; 3) 50° por 30 segundos de anelamento dos *primers*; 4) 72° por 1 minuto de extensão da cadeia nucleotídica e 5) 72° por 7 minutos de extensão final.

Após a reação de PCR-Multiplex é feita a checagem do produto amplificado em gel de agarose (2%), coloração utilizando Bluegreen® sob luz azul para a visualização de fragmentos com tamanhos característicos para cada espécie e possibilitando a identificação simultânea de diversas amostras (Figura 3).

3.1.3.4 Identificação por DNA Barcoding

Construção da matriz de dados.

As sequências consenso do gene COI para cada amostra foram estabelecidas com a aplicação do programa Geneious Pro 5.4.2 (Drummond et al. 2010). No mesmo programa foram realizados alinhamentos utilizando o algoritmo MUSCLE com os parâmetros de *defout*, sendo posteriormente realizadas correções manuais de erros de alinhamento evidentes, buscando identificar também possíveis erros de sequenciamento e *stop codons*.

Teste *barcoding gap*

As análises pelo programa ABGD foram realizadas via acesso remoto ao servidor no site <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> (acesso Maio/2014), seguindo o *default* do programa como sugerido por Puillandre et al. (2012a) e Kekkonen e Hebert (2014) com o modelo Kimura-2P. ABGD é um procedimento automático de identificação que forma *clusters* de sequências de possíveis espécies, com base em distâncias par-a-par e nas diferenças entre as variações intra e inter-específicas (*barcoding gap*) (Puillandre et al., 2012a; Puillandre et al., 2012b).

Análise de GMYC

Para a análise de GMYC é necessário estimar uma árvore ultramétrica com comprimentos de ramos. Para isso, foi realizada uma reconstrução filogenética pelo método Bayesiano com a aplicação do programa Beast 2.0.1. (Rambaut et al. 2014). Essa árvore foi construída pelo modelo de relógio *relaxed lognormal clock* usando o modelo de *birth-death processes* como prior. Para tanto, foram realizadas duas corridas simultâneas (duas Monte Carlo Markov Chains - MCMC) com 10^6 gerações cada e as árvores foram salvas a cada 1000 gerações. O resultado das duas corridas foram somados após o *burning* de 20% realizado no TreeAnnotator 1.5.3. A árvore ultramétrica foi convertida para o formato *newick* no programa Figtree 1.31. A análise de GMYC propriamente dita foi realizada no programa R (R Development Core Team 2013) com o SPLITS package (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits/>) pelo método de Single Thersold em parametro padrão.

Desenho de *primers* espécie-específicos.

Para o desenho dos *primers* espécie-específicos foi utilizado o Programa Gene Runner 3.0.5., buscando formular segmentos com aproximadamente 22 pares de bases (pb), com T melting=58 °C (± 2), de modo que não formassem dímeros, *harpings* e *loops* internos. Esses *primers* foram agrupados em três conjuntos, com o intuito de separar qualquer uma das 17 espécies de tubarões mais abundantes na costa atlântica. Neste procedimento, os *primers*

espécie-específicos de cada conjunto são separados por pelo menos 100 pb (± 20), sendo esta uma distância adequada para a visualização em eletroforese em gel de agarose.

Os conjuntos de *primers* têm por finalidade a identificação dos indivíduos de modo análogo ao processo utilizado pelas chaves dicotômicas morfológicas. Tal procedimento possibilita discriminar qualquer uma das espécies de tubarões mais pescados no atlântico com no máximo 2 reações de PCR multiplex.

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 Resultado das coletas

Foram realizadas 8 coletas que resultaram numa amostragem de cerca de 4944 indivíduos do grupo dos elasmobrânquios provenientes de capturas realizadas na região indicada na Figura 2 e relacionadas na Tabela 3. Nesta tabela está representada a nomenclatura dada pelos pescadores assim que ocorre o desembarque. Sabe-se, contudo, que ao utilizar nomes populares, as identificações específicas podem ficar prejudicadas pelo fato de um mesmo nome reunir indivíduos de mais de uma espécie, ou ainda ora por uma espécie apresentar mais de um nome popular decorrente principalmente de sua captura em diferentes localidades. Identificação das amostras

Observa-se nessa primeira identificação que existe ao menos 14 espécies de tubarões capturados, cabendo ressaltar que 86% dos espécimes capturados não foram identificados morfológicamente, nem pela nomenclatura popular e tampouco pela nomenclatura científica. Este resultado é bastante significativo por demonstrar o grau de desconhecimento sobre as espécies pescadas na costa brasileira.

Do total de amostras analisadas, 1225 indivíduos foram coletados na localidade Santos, sendo que dos 312 indivíduos relacionados no período frio 225 foram coletados por redes e 87 por espinhel, enquanto dos 913 coletados no período quente, 726 foram coletados por redes e 187 por espinhel. Em Ubatuba foram coletadas 1337 amostras, sendo que dos 472 indivíduos capturados na época frio, 67 foram coletadas por espinhel e 405 por redes, enquanto no período quente foram coletadas 865 amostras, sendo todas coletadas por espinhel. No porto de Cananéia foram coletados 2330 indivíduos, sendo que das 1426 amostras coletadas no período quente, 317 foram coletadas por espinhel e 1109 por redes, enquanto no período frio foram coletadas 904 amostras, sendo todas coletadas por redes.

4.2 Identificação molecular cruzada

No total foram amostradas 14 espécies de tubarões na costa do Estado de São Paulo, além de um grande número de exemplares que não puderam ser identificados morfológicamente (Tabela 3). Por outro lado, os valores de captura tiveram grande variação quanto à região e mostraram-se diretamente relacionados à arte de pesca utilizada e à estação do ano, conforme demonstrado na Tabela 4 e nas Figuras 4 e 5. Estas ilustrações evidenciam o fato de que as espécies *Rhysoprionodon lalandi*, *R. porosus* e *Isurus oxyrinchus* são

Tabela 3 - Dados das coletas realizadas por período e tipo de amostragem [rede de emalhe (Em) e espinhel (Es)].

| Nome Popular | Abril/11 | Julho/11 | | Outubro/11 | | Janeiro/12 | | Abril/12 | | Julho/12 | | Outubro/12 | | Janeiro/13 | | Total |
|--|------------------|----------|-------------------|------------|-----|------------|-----|----------|----|----------|----|------------|-----|------------|-----|-------------|
| | Am | Am | Ap | Am | Ap | Am | Ap | Am | Ap | Am | Ap | Am | Ap | Am | Ap | |
| Cação-não-identificado visualmente | 462 | 445 | 8 | 375 | 206 | 451 | 308 | 208 | 2 | 359 | 70 | 275 | 253 | 637 | 187 | 4246 |
| Cação-azul (<i>P. glauca</i>) | | | | | 8 | | 2 | | | | | | 5 | | | 15 |
| Cação-mangona (<i>C. taurus</i>) | 3 ^m | | 2 | | 5 | | | | | | | | 1 | | | 11 |
| Cação-anequim (<i>I. oxyrinchus</i>) | 2 ^m | 1 | 57+1 ^m | | 290 | | 3 | 1 | | | | | 88 | | | 443 |
| Cação-cambeva (<i>Sphyrna</i> sp.) | 8+5 ^m | 2 | | | 5 | | | | 12 | | | | 29 | 73 | 2 | 124 |
| Cação-machote | 6+5 ^m | 1 | | | | | | | | | | | | | | 12 |
| Cação-rola-rola (<i>Rhizoprionodon</i> sp.) | 5 ^m | | | | 5 | | 3 | | | | | | | | | 13 |
| Cação-azeitero | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| Cação-bahia | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | 2 |
| Cação-galha-preta | 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | 2 |
| Cação-martelo (<i>S. lewini</i>) | | | | | 3 | | | | | | | | | | | 3 |
| Cação-martelo (<i>S. zygaena</i>) | | | | | 2 | | | | | | | | | | | 2 |
| Cação-tigre | | | | | 2 | | 4 | | 1 | | | | | | | 7 |
| Cação-anjo (<i>Squatina</i> sp.) | | 39 | | | 21 | | | | | | | | 2 | | | 62 |
| Cação-bico-doce (<i>Mustelus</i> sp.) | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| Total | | | | | | | | | | | | | | | | 4944 |

Am = amostra adquirida no mercado de peixe local;

Ap = amostra adquirida junto a pescador amador.

realmente as espécies mais pescadas na região, tal como mostrado em Mendonça et al. (2009b), seguidas por *Sphirna lewini*. *Sphirna lewini* é um caso especial, uma vez que pode ser coletada quase constantemente durante todo o ano, consideração esta independente da arte de pesca utilizada. Essa constatação poderia estar diretamente relacionada ao modo de vida pelágico costeiro de *S. lewini*. Por outro lado, também foram capturadas em menor abundância espécies como *S. zygaena*, *Prionace glauca* e *Carcharhinus falciformes*. É conhecido que *Prionace glauca* e *Carcharhinus falciformes* têm preferência por águas mais quentes e *Sphyrna zygaena* teve sua captura por redes de emalhar, sendo que a grande maioria dos indivíduos capturados era constituída de jovem e neonatos. As espécies *Galeocerdo cuvier*, *Isurus paucus*, *Carcharias taurus*, *Carcharhinus signatus* e *Mustelus canis* foram menos abundantes nas capturas, sendo consideradas como fauna acompanhante (*by catch*) (Tabela 6).

Tabela 4 - Caracterização das amostras de tubarões coletadas nos municípios de Ubatuba, Santos e Cananéia entre 2011 e 2013, identificadas por marcadores genéticos específicos pela técnica de PCR-Multiplex (preto) e de sequenciamento (vermelho).

| <i>Espécies</i> | <i>Costeiro</i> <i>Quente</i> | <i>Costeiro</i> <i>Frio</i> | <i>Pelágico</i> <i>Quente</i> | <i>Pelágico</i> <i>Frio</i> | <i>Total</i> | <i>Total %</i> |
|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------|----------------|
| <i>R. lalandii</i> | 567 | 472 | 0 | 0 | 1039 | 52,71% |
| <i>R. porosus</i> | 130 | 118 | 0 | 0 | 248 | 12,58% |
| <i>S. lewini</i> | 11 | 149 | 14 | 3 | 177 | 8,98% |
| <i>S. zygaena</i> | 4 | 28 | 0 | 0 | 32 | 1,63% |
| <i>C. falciformis</i> | 0 | 0 | 87 | 6 | 93 | 17,70% |
| <i>I. oxyrinchus</i> | 0 | 0 | 344 | 5 | 349 | 4,72% |
| <i>P. glauca</i> | 0 | 0 | 13 | 10 | 23 | 1,17% |
| <i>G. cuvier</i> | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0,51% |
| <i>I. paucus</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0,26% |
| <i>C. taurus</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0,26% |
| <i>M. canis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0,13% |
| <i>C. signatus</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0,13% |

Nas Figuras 4 e 5 está representada a abundância de captura e consequente obtenção de amostras por períodos do ano (quente e frio), demonstrando aos valores de amostragem para cada espécie. *Rhizoprionodon lalandii* apresentou resultados melhores valores de captura no período quente com 567 indivíduos amostrados, enquanto que 472 amostras foram obtidas no período frio. Da espécie *Rhizoprionodon porosus* foram amostrados 130 indivíduos no período quente, sendo 118 amostras obtidas no período frio. Já espécie *Sphyrna lewini* apresentou valor de amostragem de 24 indivíduos no período quente e 152 indivíduos no período frio, do mesmo modo que para a espécie *Sphyrna zygaena* a maior abundância de amostras também ocorreu neste período, com 4 indivíduos capturados no período quente e 28 amostrados no período frio. A espécie *Isurus oxyrinchus* teve uma representação de 344 amostras para o período quente e apenas 5 amostras para o período frio, enquanto a espécie *Carcharhinus falciformes* teve uma amostragem de 87 indivíduos no período quente e 6 no período frio. A amostragem da espécie *Prionace glauca* mostrou valores de 13 indivíduos no período quente e 10 amostras no período frio. Entre as espécies não identificada ou de pouca representatividade na amostragem, os valores foram destacados em vermelho na Tabela 4, com 1 amostra no período quente e 9 amostras no período frio.

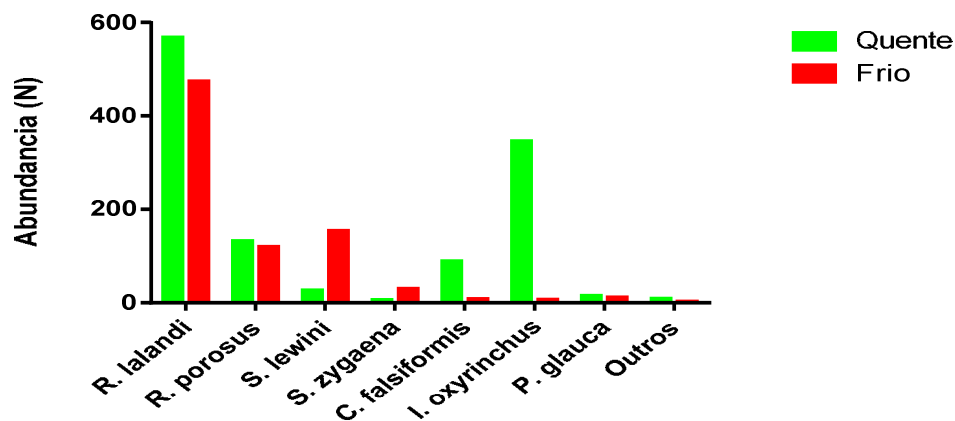


Figura 4 - Abundância absoluta das espécie capturadas e comercializadas no Estado de São Paulo em números de indivíduos identificados nas estações do ano primavera e verão que é o período quente (barras verdes) e outono e inverno como período frio (barras vermelhas).

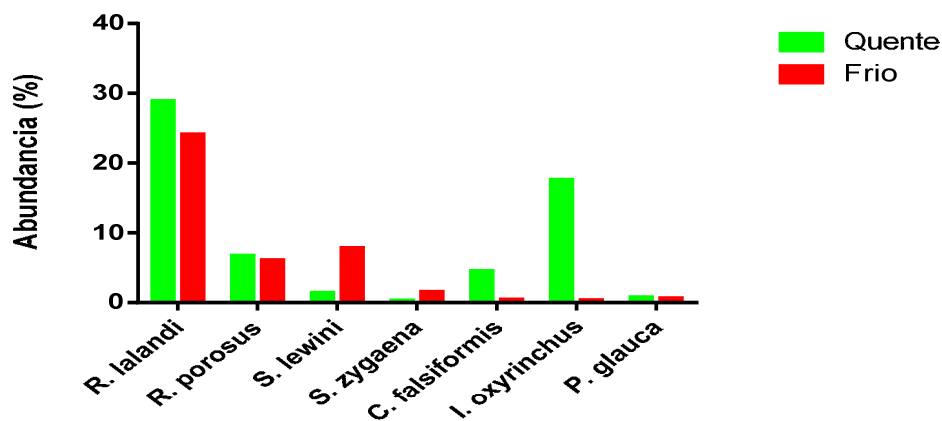


Figura 5 - Abundância absoluta em porcentagem das espécies capturadas e comercializadas no Estado de São Paulo, onde as barras verdes representam o porcentual de captura nos períodos quentes e as barras vermelhas representam a captura nos períodos frios, demonstrando a influência do período de captura na abundância de espécies e espécimes.

Dentre as amostras de Cananéia, foram identificadas oito espécies, sendo *Rhizoprionodon lalandii* a mais abundante (614 amostras ou 65,88%), seguida por *Rhizoprionodon porosus* (154 amostras ou 16,52%), *Carcharhinus falciformes* (87 amostras ou 9,33%), *Sphyrna Lewini* (64 amostras ou 6,87%), *Sphyrna zygaena* (6 amostras ou 0,64%), *Isurus oxyrinchus* (3 amostras ou 0,32%), *Prionace glauca* (2 amostras ou 0,21%) e *Galeocerdo cuvier* (2 amostras ou 0,21%). (Tabela 07)

Em Ubatuba foram identificadas oito espécies e *Isurus oxyrinchus* foi a mais abundante (331 amostras ou 58,58%), seguida por *Rhizoprionodon lalandii* (155 amostras ou 27,44%), *Sphyrna lewini* (33 amostras ou 5,85%), *Rhizoprionodon porosus* (31 amostras ou 5,49%), *Sphyrna zygaena* (6 amostras ou 1,07%), *Prionace glauca* (6 amostras), *Galeocerdo cuvier* (2 amostras) e *Carcharias taurus* (1 amostra) (Tabela 8)

Já no município de Santos foram identificadas 11 espécies de tubarões capturados por métodos de pesca oceânica como espinhel e também obtidas de pesca artesanal. Nessa localidade a espécie que apresentou maior abundancia foi *Rhizoprionodon lalandii* (272 amostras ou 57,15%), seguida por *Sphyrna lewini* (80 amostras ou 16,80%), *Rhizoprionodon porosus* (64 amostras ou 13,45%), *Sphyrna zygaena* (20 amostras ou 4,20%), *Prionace glauca* (16 amostras ou 3,36%), *Isurus oxyrinchus* (14 amostras ou 2,94%), *Carcharhinus falciformes* (6 amostras ou 1,26%), *Isurus paucus* (2 amostras ou 0,42%), *Carcharias taurus*

(1 amostra ou 0,21%), *Mustelus canis* (1 amostra ou 0,21%) e *Carcharhinus signatus* (1 amostras ou 0,21%). (Tabela 9).

Tabela 5 - Caracterização das amostras identificadas em Cananéia utilizando PCR-Multiplex e DNA Barcode, discriminando as artes de pesca e estação do ano.

| Espécie | Método de Identificação | | N° Total | Estação do ano | | Arte de pesca | |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------|----------------|------|---------------|----------|
| | Multiplex | Sequenciam | | Quente | Frio | Redes | Espinhel |
| <i>R. lalandii</i> | 577 | 37 | 614 | 372 | 242 | 614 | 0 |
| <i>R. porosus</i> | 125 | 29 | 154 | 80 | 74 | 154 | 0 |
| <i>S. lewini</i> | 0 | 64 | 63 | 6 | 58 | 64 | 0 |
| <i>S. zygaena</i> | 0 | 6 | 6 | 0 | 6 | 6 | 0 |
| <i>C. falciformes</i> | 0 | 87 | 87 | 87 | 0 | 0 | 87 |
| <i>P. glauca</i> | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| <i>G. cuvier</i> | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| <i>I. oxyrinchus</i> | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 |

Tabela 6 - Caracterização das amostras identificadas em Ubatuba utilizando PCR-Multiplex e DNA Barcode, discriminando as artes de pesca e estação do ano.

| Espécie | Método de Identificação | | N° Total | Estação do ano | | Arte de pesca | |
|----------------------|-------------------------|------------|----------|----------------|------|---------------|----------|
| | Multiplex | Sequenciam | | Quente | Frio | Redes | Espinhel |
| <i>R. lalandii</i> | 135 | 17 | 155 | 0 | 155 | 155 | 0 |
| <i>R. porosus</i> | 19 | 11 | 31 | 0 | 30 | 30 | 0 |
| <i>S. lewini</i> | 0 | 33 | 33 | 10 | 23 | 23 | 10 |
| <i>S. zygaena</i> | 0 | 6 | 6 | 0 | 6 | 6 | 0 |
| <i>I. oxyrinchus</i> | 305 | 28 | 333 | 333 | 0 | 0 | 333 |
| <i>P. glauca</i> | 0 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| <i>G. cuvier</i> | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| <i>C. taurus</i> | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |

Tabela 7 - Caracterização das amostras identificadas em Santos utilizando PCR-Multiplex e sequenciamento, discriminando as artes de pesca e estação do ano.

| Espécie | Método de Identificação | | Nº | Estação do ano | | Arte de pesca | |
|-----------------------|-------------------------|------------|-------|----------------|------|---------------|----------|
| | Multiplex | Sequenciam | Total | Quente | Frio | Redes | Espinhel |
| <i>R. lalandii</i> | 0 | 272 | 196 | 76 | 155 | 272 | 0 |
| <i>R. porosus</i> | 0 | 64 | 50 | 14 | 30 | 64 | 0 |
| <i>S. lewini</i> | 0 | 80 | 8 | 72 | 23 | 73 | 7 |
| <i>S. zygaena</i> | 0 | 20 | 4 | 16 | 6 | 20 | 0 |
| <i>C. falciformis</i> | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| <i>I. oxyrinchus</i> | 0 | 14 | 9 | 5 | 0 | 0 | 14 |
| <i>P. glauca</i> | 0 | 16 | 6 | 10 | 0 | 0 | 16 |
| <i>I. paucus</i> | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>C. taurus</i> | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>M. canis</i> | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>C. signatus</i> | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

4.3 Banco de dados:

A identificação prévia de 27 espécies naturais foi feita com base nas características morfológicas e em sequências gênicas específicas provenientes de espécies constantes do banco de dados existente. Tais informações e o tipo de identificação utilizado estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Representação das identificações utilizadas na montagem do banco de dados.

| Espécie | Código GenBank | Identificação morfológica | Identificação por COI | Identificação por 16S | Identificação por Cit b | Tipo de Identificação |
|--------------------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Sphyrna zygaena</i> (SPZ) | FJ519527.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Sphyrna tudes</i> (SPD) | | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Sphyrna tiburo</i> (SPJ) | FJ519645.1 | OK | OK | | OK | Parcial |
| <i>Sphyrna lewini</i> (SPL) | JQ365581.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Sphyrna mokarran</i> (SPM) | FJ519641.1 | OK | OK | | | Parcial |
| <i>Carcharhinus longimanus</i> (OCS) | FJ519617.1 | OK | OK | OK | | Parcial |

| | | | | | | |
|---|------------|----|----|----|----|---------|
| <i>Carcharhinus signatus</i> (CCS) | FJ519163.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Carcharhinus plumbeus</i> (CCP) | FJ519558.1 | OK | OK | OK | | Parcial |
| <i>Carcharhinus limbatus</i> (CCL) | JQ365260.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Galeocerdo cuvier</i> (TIG) | FJ519913.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Negaprion brevirostris</i> (NGB) | FJ519231.1 | OK | OK | | | Parcial |
| <i>Carcharhinus leucas</i> (CCE) | FJ519108.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Rhizoprionodon lalandii</i> (RHL) | JQ365529.1 | OK | OK | | | Parcial |
| <i>Prionace glauca</i> (BSH) | FJ519242.1 | OK | OK | OK | | Parcial |
| <i>Rhizoprionodon terraenovae</i> (RHT) | FJ519582.1 | OK | OK | OK | | Parcial |
| <i>Rhizoprionodon porosus</i> (RHP) | FJ519273.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Carcharhinus acronotus</i> (CCN) | FJ519557.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Carcharhinus falciformes</i> (FAL) | FJ519080.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Carcharhinus perezi</i> (CPZ) | | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Carcharhinus porosus</i> (CCR) | FJ519157.1 | OK | OK | OK | | Parcial |
| <i>Carcharhinus brevipinna</i> (CCB) | GU804990.1 | OK | OK | OK | | Parcial |
| <i>Carcharhinus obscurus</i> (DUS) | JF493066.1 | OK | OK | | | Parcial |
| <i>Carcharias taurus</i> (CCT) | JF493075.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Isurus oxyrinchus</i> (SMA) | JX124792.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Alopias vulpinus</i> (ALV) | JF492809.1 | OK | OK | OK | OK | Total |
| <i>Alopias superciliosus</i> (BTH) | | OK | OK | | OK | Total |
| <i>Isurus paucus</i> (LMA) | FJ519628.1 | OK | OK | OK | OK | Total |

Para as análises foram utilizadas somente sequências com grau de similaridade intraespecífica acima de 98%, conforme apresentado na Tabela 4, estas sequencias foram rodadas no Mega6 para a obtenção da variabilidade genética. A maior distância genética entre todas as espécies foi de 26,54%, observada entre *Isurus paucus* (LMA) e *Carcharhinus porosus* (CCR). Entre os Lamniformes foi de 13,34%, identificada entre *Carcharias taurus*

(CCT) e *Alopias vulpinus* (ALV) e *Alopias superciliosus* (BTH) e de 19,98% entre *Pseudocarcharias kamoharai* (PSK) e *Isurus oxyrinchus* (SMA) e *Isurus paucus* (LMA).

Entre os Carcharhiniformes foi observada uma variação genética nos gêneros Sphyrnidae e Carcharhinidae, sendo de 9,12% entre *Sphyrna tudes* (SPD) e *Sphyrna lewini* (SPL) e de 9,56% entre *Sphyrna lewini* (SPL) e *Sphyrna zygaena* (SPZ) e *Sphyrna tiburo* (SPJ). Entre as espécies deste gênero também foi observada uma variação genética de 6,38% entre *Sphyrna tudes* (SPD) e *Sphyrna tiburo* (SPJ) e de 11,59% entre *Sphyrna tudes* (SPD) e *Sphyrna mokarran* (SPK); já a espécie *Sphyrna zygaena* (SPZ) teve uma variação de 9,41% na comparação com *Sphyrna mokarran* (SPK) e de 10,55% com *Sphyrna zygaena* (SPZ) e *Sphyrna tiburo* (SPJ). A espécie *Sphyrna mokarran* (SPK) mostrou valor de variação de 10,47% para com *Sphyrna tiburo* (SPJ).

No gênero Carcharhinus, a variação genética encontrada na espécie *Rhizoprionodon terraenovae* (RHT) foi de 10,59% para com as espécies *Carcharhinus perezi* (CPZ) e *Galeocerdo cuvier* (TIG); e de 9,97% para *Carcharhinus porosus* (CCR) e *Carcharhinus signatus* (CCS). Já a variação genética entre *Rhizoprionodon terraenovae* (RHT) e *Carcharhinus acronotus* (CCN), *Carcharhinus falciformes* (FAL), *Carcharhinus plumbeus* (CCP), *Prionace glauca* (BSH), *Carcharhinus brevipinna* (CCB), *Carcharhinus longimanus* (OCS) e *Carcharhinus obscurus* (DUS) foi de 8,98%; entre *Rhizoprionodon terraenovae* (RHT) e *Rhizoprionodon lalandii* (RHL) a variação genética foi de 3,09% e entre *Rhizoprionodon terraenovae* (RHT) e *Rhizoprionodon porosus* (RHP) foi de 0,48%. A espécie *Rhizoprionodon porosus* (RHP) mostrou uma variação genética de 10,70% para com a espécie *Carcharhinus perezi* (CPZ); de 9,71% para *Carcharhinus porosus* (CCR) e *Carcharhinus signatus* (CCS) e de 9,05% entre *Rhizoprionodon porosus* (RHP) e *Carcharhinus acronotus* (CCN), *Carcharhinus falciformes* (FAL), *Carcharhinus plumbeus* (CCP) e *Prionace glauca* (BSH). Com relação à espécie *Rhizoprionodon lalandii* (RHL), foram observados valores de variação genética de 11,23% para com a espécie *Galeocerdo cuvier* (TIG), de 8,19% para com *Carcharhinus signatus* (CCS) e 8,75% para com as espécies *Carcharhinus falciformes* (FAL), *Carcharhinus plumbeus* (CCP), *Prionace glauca* (BSH), *Carcharhinus brevipinna* (CCB), *Carcharhinus longimanus* (OCS) e *Carcharhinus porosus* (CCR). Já a espécie *Carcharhinus limbatus* (CCL) mostrou valores de variação genética de 6,40% para com as espécies *Rhizoprionodon terraenovae* (RHT), *Rhizoprionodon lalandii* (RHL) e *Galeocerdo cuvier* (TIG) e de 2,58% para *Prionace glauca* (BSH); enquanto valores de 1,87% foram encontrados entre *Carcharhinus limbatus* (CCL) e *Carcharhinus falciformes* (FAL), *Carcharhinus plumbeus* (CCP) e *Carcharhinus signatus* (CCS); de 1,44% para entre

Carcharhinus acronotus (CCN) e *Carcharhinus longimanus* (OCS) e de 0,03% para com *Carcharhinus brevipinna* (CCB).

A espécie *Carcharhinus perezii* (CPZ) teve uma variação de 10,50% para com *Galeocerdo cuvier* (TIG), enquanto a espécie *Galeocerdo cuvier* (TIG) teve uma variação de 8,90% para com *Carcharhinus obscurus* (DUS). Já *Carcharhinus longimanus* (OCS) apresentou valores de variação genética de 1,72% para com *Carcharhinus obscurus* (DUS) e *Carcharhinus perezii* (CPZ). Porém, a maior distância entre as espécies do gênero *Carcharhinus* foi de 12,70% entre *Sphyrna tiburo* (SPJ) e *Galeocerdo cuvier* (TIG), *Carcharhinus plumbeus* (CCP) e *Rhizoprionodon porosus* (RHP), enquanto a menor foi de 0,03% entre *Carcharhinus limbatus* (CCL) e *Carcharhinus brevipinna* (CCB).

4.4 Identificação molecular

Do número total de amostras, cerca da metade (2441) foi submetida à identificação molecular, sendo que destas as análises foram realizadas com sucesso em 1971. Em todas as amostras coletadas nos pontos de Cananéia e Ubatuba foi aplicada a técnica de Multiplex. E aquelas que não tiveram suas identificações confirmadas por esta técnica (436), foram submetidas ao procedimento de sequenciamento. Todas as amostras de Santos foram submetidas diretamente à técnica de sequenciamento, sendo que, contudo, nessa amostragem não foram utilizadas as amostras da espécie *Squatina sp.* pela falta de sequências no GenBank discriminando as espécies para a montagem do banco de dados para identificação genética.

4.4.1 Identificação por multiplex.

A técnica de PCR multiplex demonstrou grande eficiência na identificação das espécies, discriminando 1160 amostras com 99% de precisão, já que não houve a presença de falsos positivos. Por outro lado, a eficiência de aplicação desta metodologia não foi total, uma vez que foram detectados alguns casos de falso negativo. Algumas amostras que não haviam sido distinguidas pela técnica de PCR multiplex foram sequenciadas e identificadas como *Rhizoprionodon lalandi*, *R. porosus* e *Isurus oxyrinchus*. Contudo, com a utilização da técnica de PCR multiplex foram identificadas 712 amostras de *R. lalandii*, 144 amostras de *R. porosus* e 305 amostras de *I. oxyrinchus* (Figura 6).

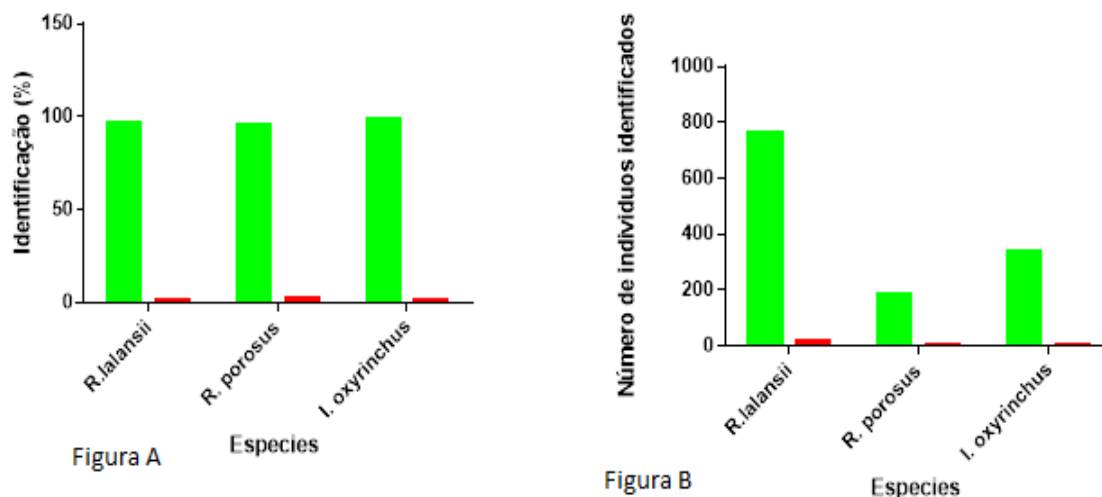


Figura 6 - Figura 6A representa a confiabilidade da PCR-multiplex, onde as barras em verde apresentaram 99% de identificação para as espécies, enquanto as barras em vermelho representam as amostras que não foram identificadas. A Figura 6B demonstra o número de amostras identificadas (barra verde) por esta metodologia, totalizando 712 amostras identificadas e 48 amostras não identificadas (barra vermelha) para *R. lalandii*; 144 amostras identificadas e 44 amostras não identificadas para *R. porosus* e 305 amostras identificadas e 28 amostras não identificadas para *I. oxyrinchus*.

4.4.2 Identificação por DNA Barcode.

Foram obtidas sequências barcode com comprimento médio de 600pb para 12 espécies. Após a edição das sequências foi montada a matriz com 306 caracteres, sendo 176 conservados, 130 variáveis e destes, 13 com mutações exclusivas. Não foram observados *stop-codons*, inserções ou deleções dentre as sequências. A composição nucleotídica da matriz final foi de 25,1% de adenina, 16,8% de guanina, 24,8% de citosina e 33,2% de timina.

4.4.2.1 Definição genética das espécies (análise de ABGD).

A análise de ABGD utilizando parâmetros padrões revelou a presença de 33 grupos de espécies, porém apenas 27 destas são constituídos por *clusters* de amostras. Esta informação é importante, pois amostras isoladas que são indicadas como entidades biológicas podem muitas vezes tratar-se de sequências de má qualidade. Nesse caso adotou-se uma postura conservadora, considerando-se apenas a identificação das amostras que não apresentaram sequências exclusivas, ou seja, as 27 possíveis espécies.

4.4.2.2 Definição genética das espécies (análise de GMYC).

A análise de *branch lengths* confirmou a existência de linhagens mitocondriais distintas, uma vez que explorando as linhagens através do tempo é possível identificar o momento onde ocorre a mudança entre nós intra e interespecíficos (Threshold Time=0.008689167) como sugerido em Pons et al. (2006). A análise de GMYC identificou 20 ML unidades evolutivas independentes (UEI) (intervalo de confiança entre 15 a 28), sendo que todas as entidades são compostas por mais de um indivíduo.

Discussão



5 DISCUSSÃO

Estudos envolvendo a utilização de marcadores moleculares na identificação de tubarões tem sido relatados em diversos trabalhos (Ward *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009), demonstrando grande eficiência e aplicabilidade. Com este objetivo e utilizando técnicas de PCR-multiplex com o uso do gene COI, o mesmo utilizado no presente estudo, Mendonça *et al.*, (2009) descreveram este método para caracterizar a exploração da pesca de diferentes espécies de tubarões. Do mesmo modo, Ward *et al.* (2005) analisaram 61 espécies de elasmobrânquios, tendo observado uma divergência genética média de 15.46% entre famílias, 9.93% entre gêneros e 0.39% entre espécies, Mendonça *et al.* (2009a) também analisou sequencias nucleotídicas do mesmo gene em 18 espécies de tubarões tendo, contudo, observado divergência genética bastante significativa de 1,2% entre espécies de mesmo gênero. Estas afirmações são corroboradas pelos resultados obtidos no presente trabalho onde também foram identificados níveis expressivos de divergência genética media que atingiram valores de 22,33% entre famílias, de 8,78% entre gêneros foi e de 0,03% entre espécies do mesmo gênero; porém, um alto grau de conservação foi observado entre indivíduos da mesma espécie.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram também que a utilização de mais de dois *primers* em ensaios de PCR-Multiplex se constitui num método rápido e confiável para discriminar com uma eficiência de 99% de confiabilidade três espécies que apresentam distribuição geral em todo o litoral do Estado de São Paulo e têm sido intensivamente pescadas. Tal metodologia se mostra extremamente eficiente na correta identificação das espécies, principalmente nos casos em que as características morfológicas que poderiam servir como parâmetros efetivos de diferenciação se apresentam muito semelhantes ainda mais considerando as condições que os espécimes apresentam no momento do desembarque, sem cabeça e nadadeiras. Esses dados também reforçam e estão em concordância com os resultados obtidos em estudo realizado por Pank *et al.* (2000), que identificaram com a aplicação da técnica de PCR-Multiplex duas espécies de tubarões de grande representatividade nas capturas mas morfológicamente muito semelhantes, *Carcharhinus obscurus* e *C. plumbeus*. Esta técnica se caracteriza por ser rápida, eficiente e de baixo custo, diferindo dos métodos que exigem etapas de restrição enzimática e sequenciamento que encarecem sua aplicação (Heist e Gold, 1998; Mendonça *et al.*, 2009).

Algumas desvantagens atualmente encontradas na aplicação desta metodologia incluem a limitação do atual conjunto de marcadores específicos das espécies disponíveis,

bem como a possibilidade dos marcadores não serem 100% precisos para as espécies. Assim, no presente trabalho foram também utilizadas outras técnicas de identificação de espécies como a do DNA barcoding, que utiliza *primers* universais para amplificar parte do gene COI. Esta metodologia analisa a variação das sequências dentro da espécie e, em nível muito mais elevado, entre as espécies. As sequências são submetidas às comparações no BOLD (Barcode of Life Data System) (Ratnasingham e Hebert, 2007), onde estas são alinhadas e comparadas com as sequências depositadas no sistema, numa abordagem que visou complementar o processo de identificação das espécies de tubarões para as quais não foi possível realizar a identificação por PCR-Multiplex.

Do número total de amostras (4944) resultantes do processo de obtenção de material proveniente de indivíduos capturados na região de estudo, cerca da metade (2441) das amostras foi submetida à identificação molecular, tendo resultado como êxito em 1971 amostras. Todas as amostras coletadas nos pontos de Cananéia e Ubatuba foram submetidas à técnica de Multiplex para identificação e aquelas que não tiveram suas identidade confirmada por esta técnica (470), foram submetidas ao procedimento de sequenciamento, com a aplicação da técnica de barcode. A técnica de sequenciamento foi aplicada de modo direto nas amostras provenientes de Santos, ficando fora das análises apenas a espécie *Squatina sp.* pela falta de sequências no Genbank.

A utilização da técnica de PCR multiplex demonstrou grande aplicação na identificação das espécies de tubarão, discriminando 1160 amostras com 99% de precisão, uma vez que não houve a presença de falsos positivos. Por esta metodologia puderam ser identificadas 712 amostras de *R. lalandii*, 144 amostras de *R. porosus* e 305 amostras de *I. oxyrinchus* (Figura 3). A eficiência de aplicação desta metodologia só não foi total pelo fato de terem sido detectados alguns casos de falso negativo. Contudo, para aquelas amostras em que a caracterização não pode ser resolvida pela técnica de PCR multiplex, o material genético foi sequenciado e comparado às referências do barcode, tendo sido identificadas como *Rhizoprionodon lalandi*, *R. porosus* e *Isurus oxyrinchus*. Nos casos de identificação pelo barcode, foram utilizadas sequências de DNA da região mitocondrial com comprimento médio de 600pb para 12 espécies que revelaram uma composição nucleotídica da matriz final de 25,1% de adenina, 16,8% de guanina, 24,8% de citosina e 33,2% de timina.

Pela análise geral de todas as atividades de captura e obtenção de amostras é possível notar a intensa relação de ocorrência das espécies e a época de captura. A Figura 4 mostra que as diferenças na relação entre estação do ano e proporção de captura são pouco

representativas para as espécies de *Rhizoprionodon*, demonstrando que a arte de pesca pode ser um fator importante para o manejo dessas espécies nesta região de coleta. Para *Sphyrna lewini* esta relação se mostra completamente diferente, com maior concentração de captura no período frio, enquanto que para *Isurus oxyrinchus* a maior concentração de captura ocorre no período quente. Portanto, qualquer atividade relacionada ao controle da pesca e manejo destas espécies visando sua conservação deveria considerar os elementos principais da relação estabelecida entre os equipamentos de pesca e as épocas de captura.

O ponto de coleta com maior número de espécies e amostras obtidas foi o de Santos, onde a demanda de produtos dos elasmobrânquios se mostrou maior talvez pelo fato do porto deste município ser relativamente maior quando comparado com os dos outros municípios amostrados. Este fato mostra que este ponto de desembarque merece uma maior atenção em relação às estatísticas de captura das espécies mais exploradas nesta região de pesca, podendo estabelecer processos que promovam a correta identificação dos indivíduos capturados, entre os quais certamente estariam espécies ameaçadas.

Em todos os locais de coleta foi identificada a utilização de instrumentos de pesca artesanal (redes) e industrial (espinhel), denotando abundância de espécies tanto costeiras quanto oceânicas, de acordo com as artes de pesca utilizadas. Neste sentido, o ponto de coleta Santos teve maior representação de espécies como *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformes*, *Isurus palcos* e *Carcharhinus signatus*, consideradas espécies oceânicas, além de *Sphyrna lewini*, considerada uma espécie oceânico-costeira; porém, nas amostras também foram identificadas espécies costeiras como *Rhizoprionodon lalandii*, *Rhizoprionodon porosus*, *Sphyrna zygaena*, *Mustelus canis* e *Carcharias taurus*.

No ponto de coleta do município de Ubatuba, as amostras identificadas mostraram também um panorama tanto de pesca artesanal como de pesca industrial, com espécies oceânicas e costeiras. As análises específicas revelaram a ocorrência de espécies como *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *Galeocerdo cuvier*, *Carcharias taurus*, *Rhizoprionodon lalandii*, *Rhizoprionodon porosus*, *Sphyrna zygaena* e *Sphyrna lewini*. Do mesmo modo, o local de coleta do município de Cananéia apresentou um panorama tanto para pesca industrial como de pesca artesanal, sendo caracterizada a ocorrência de espécies como *Rhizoprionodon lalandii*, *Rhizoprionodon porosus*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna zygaena*, *Carcharhinus falciformes*, *Galeocerdo cuvier*, *Prionace glauca* e *Isurus oxyrinchus*. A análise das amostras revelou que houve diferença na captura de espécies por localidade, principalmente entre aquelas que mostraram diferenças quanto aos apetrechos e tipos de pesca utilizados, uma vez

que as espécies oceânicas são freqüentes nas pescarias industriais e as espécies costeiras são freqüentes em pescarias artesanais.

As espécies que puderam ser identificadas no presente trabalho correspondem a dois grupos de elasmobrânquios que se apresentam como muito explorados, os Lamniformes e os Carcharhiniformes, que representam uma grande parcela das espécies capturadas no Brasil. A ordem Lamniformes agrupa os tubarões oceânicos epipelágicos de grande porte, representando grande porcentagem das capturas efetuadas no Brasil e também em diversas regiões do mundo, podendo ser destacados os valores de captura da espécie *Isurus oxyrinchus* pela frota de espinhel (Costa et al., 1996).

Já a ordem Carcharhiniformes foi representada nas capturas pelos tubarões das famílias Carcharhinidae e Sphyrnidae, sendo *Prionace glauca* (Carcharhinidae) a espécie mais capturada no ambiente pelágico pela frota de espinhel principalmente no Brasil (Hazin e Lessa 2005). Os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* (Carcharhinidae) representam mais de 50% dos pequenos tubarões capturados na zona costeira pela frota artesanal (Motta et al., 2006). Os valores de captura referentes à família Sphyrnidae foram representados no presente trabalho pelas espécies *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena*, que assim como *Prionace glauca* são os principais alvos da pesca nas águas oceânicas das regiões Sudeste e Sul do Brasil (Vooren, 2005), tanto em ambientes costeiros, onde indivíduos jovens são também capturados e processados, quanto nos ambientes oceânicos, onde são capturados indivíduos adultos e de maior porte. Pelo fato destas espécies terem ocorrência em todo litoral de São Paulo, a captura é geralmente feita com redes de emalhar de superfície, nas áreas localizadas entre a plataforma externa e o talude, onde a distribuição espacial de *S. zygaena* é semelhante à de *S. lewini*. Deve ser considerado que a pressão de pesca tende a afetar a distribuição das espécies e também diminuir a capacidade de recuperação dos estoques, o que certamente implica em maior vulnerabilidade para sua extinção (Vooren 2005). O presente trabalho também identificou a abundância das espécies *S. lewini* e *S. zygaena* nesta área de estudo, evidenciando maior ocorrência para a espécie *S. lewini* nos três pontos de amostragem estudados em relação a *S. zygaena*.

Por se tratar de uma espécie oceânico-costeira (Sadowsky, 1965; Gadig, 1994) *Sphyrna lewini* é muito visada pelo mercado de exportação devido ao alto valor comercial de suas nadadeiras, além do fato de que a carne dos neonatos tem boa aceitação no mercado interno, principalmente nos Estados de São Paulo e Santa Catarina. Foi observado que nos desembarques totais das frotas de emalhe de superfície referentes à pesca de elasmobrânquios, os valores de peso para a espécie *Sphyrna lewini* representaram 77,8% em

1993 e 28,5% em 1995 (SBEEL, 2005), identificando um processo crescente e determinante de diminuição e esgotamento dos estoques desta espécie. Tal situação foi confirmada pelos resultados do presente trabalho que identificaram durante o estudo das amostras coletadas novos valores de baixa na abundância de *Sphyrna lewini*, tendo esta espécie representado apenas 8,71% da captura total. O mesmo processo parece estar ocorrendo com a espécie *Sphyrna zygaena*, que apresentou valor de captura de 1,63% da pesca total. Tais valores estatísticos surpreendentes e alarmantes poderiam ser decorrentes do fato de que estas espécies, assim como ocorre nas capturas de grandes tubarões-martelo, serem objeto da prática do *finning*, fazendo com que as estatísticas sejam referentes às carcaças desembarcadas, determinando o registro de valores incorretos sobre as quantidades de indivíduos pescados e desembarcados (Kotas, 2004). As estatísticas de desembarque no sul do Brasil se referem a *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena* em conjunto (Vooren, 2005).

Em análise da pesca com rede de emalhar de superfície na região Sudeste e Sul do Brasil, Kotas (2004) observou que 76% do total da produção era representada por *Sphyrna lewini* em relação a *Sphyrna zygaena*. Capturas com rede de emalhar de deriva ao longo da região Sul do Brasil revelaram que em um curto espaço de tempo, os estoques do tubarão-martelo deram sinais de diminuição dos estoques devido à sobrepesca (Kotas *et al.*, 1995). A ampla distribuição de ocorrência apresentada por *Sphyrna lewini* em todas as localidades do presente estudo deve-se principalmente ao fato de ser oceânico-costeira e, neste caso pode apresentar resultados em todas as artes de pesca utilizadas nesta área. Neste sentido, em estudos relacionados a abundância das espécies nesta área, Kotas (2004) observou que os resultados da pesca são bastante abrangentes, uma vez que apesar da pesca ser direcionada principalmente para os tubarões-martelo, existe também captura acidental representativa de outras espécies de elasmobrânquios como *Rhizoprionodon lalandii* e *Rhizoprionodon porosus*.

Os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* constituem-se num importante recurso econômico para a pesca, onde representam frequentemente cerca de 50 a 60% dos cações capturados (Motta, 2001). Tais evidências demonstram a grande ocorrência das espécies deste gênero na pesca costeira na plataforma continental, sendo, contudo, estas informações classificadas como deficientes pela IUCN por falta de dados sobre sua biologia. Neste sentido, deve então ser ressaltado que maior atenção deveria ser direcionada ao estudo e distribuição destas espécies, mostrando a importância de um correto monitoramento das espécies e do uso sustentável destes recursos. Em estudos realizados sobre a fauna de tubarões da costa norte e nordeste do Brasil, Gadig (1994) afirma que *Rhizoprionodon*

porosus é mais abundante nessas regiões, sendo *Rhizoprionodon lalandii* mais comum no sudeste. Essas afirmações foram corroboradas por trabalhos realizados em alguns pontos da faixa costeira no sudeste brasileiro (Ferreira, 1988; Silva e Gadig, 1994) e também pelo presente trabalho, onde foi encontrada uma abundância maior para *Rhizoprionodon lalandii* do que para *Rhizoprionodon porosus* nesta área.

De acordo com Lessa et al., (1999), a pesca artesanal com redes é responsável por boa parte da captura de elasmobrânquios ao longo de toda a plataforma continental brasileira, aparecendo as espécies do gênero *Rhizoprionodon* como as mais comuns nestas pescarias. Esta referência foi corroborada pelos dados do presente trabalho, tendo sido observado como resultado da amostragem uma maior abundância das espécies deste gênero nos locais onde foram realizadas pescas artesanais, representando 65,29% do total de capturas de tubarões no Estado de São Paulo. Segundo (Namora, 2001), *Rhizoprionodon lalandii* tem sido a espécie mais capturada pela pesca artesanal nesta região litorânea, representando quase 60% da captura total de cações, sendo seguida pela espécie *Rhizoprionodon porosus* com 16% da captura total. No presente estudo os resultados apresentados comprovaram alta frequência de ocorrência destas espécies no desembarque de pesca artesanal, sendo que *Rhizoprionodon lalandii* representou valor correspondente de captura total de 52,71%, enquanto para *Rhizoprionodon porosus* foi encontrado valor de 12,71%. Tais valores também corroboram os dados relatados por Sadowsky (1971), Gonzalez (1995) e por Motta et al., (2006), que obtiveram resultados semelhantes quando relataram a presença de *Rhizoprionodon lalandii* e *R. porosus* nas capturas de elasmobrânquios nesta mesma região.

Já para as espécies oceânicas, Vooren (2000) estimou que a frota atuneira atuante nas regiões Sudeste e Sul do Brasil foi responsável pela captura de 186.000 exemplares de tubarões em 1997, dos quais se tem relato estatístico apenas de cerca de 30.000 indivíduos capturados, sendo que 156.000 foram descartados através do *finning*. Este número indica que 83% dos tubarões capturados não chegaram a ser desembarcados, o que implica que a estatística pesqueira não representou a produção real deste período.

O tubarão mako, *Isurus oxyrinchus* é uma espécie oceânica com hábitos epipelágicos e ocorre em águas tropicais e temperadas em todo o planeta, sendo frequentemente encontrado em águas entre 16°C e 22° C (Compagno, 2001; Stevens, 2008). Esta espécie ocorre em toda a costa do Brasil, principalmente nas áreas oceânicas onde é frequentemente capturada pelos barcos espinheleiros. Trabalho realizado por Montealegre-Quijano (2005), em Itajaí-SC com capturas com espinhel pelágico, ocorreu a presença de *Isurus oxyrinchus*, sendo a segunda espécie de tubarão mais capturada depois do tubarão azul *Prionace glauca*, indicando grande

ocorrência desta espécie na costa Sul do país. O presente estudo constatou uma abundância da espécie *I. oxyrinchus* muito maior do que para *P. glauca*, devido a atuação de barcos espinheleiros em Ubatuba destinados a pesca desta espécie de tubarão na região do RJ. *Isurus oxyrinchus* representa uma porcentagem importante das capturas dos grandes tubarões oceânicos epipelágicos e se destaca entre as espécies capturadas pela frota de espinhel, tendo os valores de captura saltado de 13 toneladas em 1975 para 138 toneladas em 1990, com base nas embarcações que operam no Sudeste e Sul do Brasil (Costa et al., 1996). Tais informações parecem coincidir com os dados obtidos no presente trabalho, uma vez que os pontos de amostragem das coletas que foram realizadas em barcos que realizaram a pesca oceânica mostraram valor representando 17,71% da captura total.

De acordo com Clarke et al., (2006), *Carcharhinus falciformes* representou 3,5% do total de tubarões comercializados em Hong Kong, sendo esta abundância justificada pelo hábito pelágico e por ser uma espécie de grande interesse econômico, relacionada entre as três principais espécies no comércio internacional de nadadeiras (Clarke et al., 2006). As oscilações na captura de tubarões do gênero *Carcharhinus* no sudeste do Atlântico está relacionada com a pesca de atuns e com a estratégia da frota brasileira para a captura alvo segundo Hazin et al., (2007), visando apenas esporadicamente a captura desses tubarões. Já a espécie *Carcharhinus signatus* é comumente pescada na região nordeste da costa brasileira por redes de emalhar, sendo uma das espécies alvo das atividades de captura, chegando a atingir cerca de 90% da produção total dessa pescaria em bancos oceânicos da cadeia norte (Lessa et. al., 1999a). Por outro lado, segundo Kotas (2004) a captura desta espécie na região sudeste-sul está relacionada com a fauna acompanhante na pescaria de espinhel direcionada para a captura de espadarte (*Xiphias gladius*).

Segundo Amorim et al., (2011) entre os períodos de 1975 e 1995, a frota atuneira sediada em São Paulo utilizou o espinhel de meia-água, que foi sendo substituída nos anos pela pesca com o espinhel de superfície. A análise dos dados da atividade pesqueira no Atlântico Norte entre 1992 e 1995 sugere que um complexo de espécies do gênero *Carcharhinus*, entre as quais *C. falciformis*, *C. signatus* e *C. plumbeus* diminuiu significativamente na ordem de valores de 70% (Bonfil, et al., 2007). As espécies *C. falciformis* e *C. signatus* são bastante abundantes durante a primavera, principalmente pela preferência por águas quentes (Compagno, 1999), sendo o fato do baixo número de indivíduos capturados de ambas as espécies durante este período possivelmente explicado pela expressiva diminuição da frota atuneira ocorrida no sudeste do país, que passou de 16 barcos em 1993 para apenas 3 em 2009 (Amorim et al., 2011). No presente estudo verificou-

se que o valor comparado de captura de *Carcharhinus falciformis* foi de 4,72% e apenas uma amostra de *Carcharhinus signatus* foi registrada pelos barcos da frota industrial de espinheleiros atuneiros, uma vez que tanto *C. falciformis* quanto *C. signatus* estão classificadas na IUCN como quase ameaçadas e vulneráveis à pesca (Bonfil et al., 2007; Samanta et al., 2011).

Compagno (1984) relata que *Galeocerdo cuvier* é uma espécie costeira e insular; seu parto ocorre durante os períodos de primavera e verão. Esta espécie não tem sido muito frequentemente relatada entre os produtos de pesca na região Sudeste-Sul, sendo mais comum a sua captura nas regiões Norte e Nordeste do país. No presente estudo a amostragem de indivíduos desta espécie também foi pouco frequente, com apenas 4 indivíduos capturados durante os períodos da primavera e do verão, sem qualquer referência de capturas durante os períodos de outono e inverno.

Segundo dados da NPOA (2005), a espécie *Carcharias taurus* praticamente desapareceu nos desembarques efetuados em portos pesqueiros das regiões Sudeste e Sul, ocorrendo apenas e eventualmente capturas ocasionais na pesca de arrasto e espinhel, condizendo com a baixa abundância verificada. Considera-se que tal fato seja devido à ocorrência de intensa sobrepesca nestas regiões costeiras, o que levou à classificação desta espécie como extremamente ameaçada de extinção na região Sul (Branstter e Musik, 1994). No presente trabalho foram identificadas apenas duas amostras desta espécie durante o período de amostragem, devendo ser considerado que *C. taurus* tem sua proibição de pesca e da comercialização expedidas por tempo indeterminado, segundo a SBEEL (2005).

Entre as espécies da família Triakidae, do grupo dos Carcharhiniformes, a espécie *Mustelus canis* tem distribuição geográfica ampla e com a maior abundância conhecida na região Nordeste, principalmente em profundidades abaixo de 100 metros (Lessa et al., 1999; Gadig et al., 2001). Nas regiões Sudeste e Sul, a espécie apresenta uma distribuição mais homogênea, sendo frequentemente capturada sobre a plataforma continental (Lessa et al., 1999; BRASIL, 2006), principalmente por redes de emalhar de fundo, que nestas regiões tem como objetivo principal a pesca de elasmobrânquios (Motta, 2006). Esta espécie aparece como quase ameaçada na classificação da lista vermelha da IUCN (Conrad 2005)

A lista oficial de espécies ameaçadas de peixes foi publicada em duas Instruções Normativas do MMA (MMA, 2004, 2005), sendo constantes desta relação 12 espécies de Chondrichthyes ameaçadas de extinção e oito espécies sobre-exploradas ou ameaçadas de sobre-exploração. A partir de 2009, o MMA, através do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), deu início a um novo processo de atualização da

Lista Oficial das Espécies Ameaçadas da Fauna Brasileira e, como uma das metas, indicou a avaliação ou reavaliação do estado de conservação de todas as espécies de Chondrichthyes que ocorrem nas regiões costeiras brasileiras.

O presente estudo constatou a presença de doze espécies que estão incluídas na Lista Vermelha da *Internacional Union for Conservation of Nature* (IUCN), sendo que seis encontram em situação de Vulnerável à Pesca (*S. lewini*, *S. zygaena*, *C. signatus*, *I. oxyrinchus*, *I. paucus* e *C. taurus*); quatro aparecem como Quase Ameaçadas (*C. falciformis*, *G. cuvier*, *P. glauca* e *M. canis*), aparecendo ainda *R. lalandii* com dados deficientes e *R. porosus* como pouco preocupante. Dentro deste contexto, contudo, deve ser considerado que as espécies *S. lewini*, *S. zygaena*, *C. falciformis* e *C. taurus*, que se apresentam como espécies estritamente proibidas para a pesca pelo IBAMA, continuam a ser capturadas pela frota pesqueira.

Considerações Finais



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente trabalho refletem a situação pouco ordenada de captura e do processamento dos produtos de pesca das espécies de Elasmobrânquios que ocorrem na costa brasileira e, de modo específico, nas regiões Sudeste e Sul do país, consideradas como componentes da Província Argentina. Neste sentido, e de modo específico para este grupo de organismos, os parâmetros determinantes de estatísticas corretas e confiáveis sobre o número de espécies existentes, sua correta identificação, suas características biológicas e os resultados dos processos de exploração dos estoques naturais ficam prejudicados também pelo fato de que a similaridade morfológica entre as espécies e a utilização de práticas pesqueiras de remoção de partes do corpo dos animais antes do desembarque contribui para inviabilizar a identificação da maioria das espécies. A falta de identificação científica das espécies leva a situações frequentes de reconhecimento e denominação dos exemplares pelo nome popular, que em muitos casos pode relacionar mais de uma espécie biológica. Assim, a excessiva exploração dos estoques, aliada a certas características biológicas de grande número de espécies deste grupo identificadas por um ciclo de vida do tipo K-estrategista, identifica-os como frágeis e suscetíveis à sobreexploração, pois geralmente apresentam crescimento lento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e alta longevidade.

Considerando este contexto, torna-se de fundamental importância o controle e monitoramento contínuo das capturas de elasmobrânquios, para garantir que a pesca não exceda a capacidade de reposição dos estoques. Entretanto, o controle dessas capturas na maioria dos países é deficitário, principalmente por se tratar de identificação baseada em dados morfológicos e também pelo fato das espécies ocuparem grandes áreas de dispersão, que ultrapassam a legislação estabelecida em muitos países. Busca-se, então, formular critérios mais confiáveis de identificação das espécies, a aplicação de legislação dinâmica e efetiva no controle da pesca e a ampliação do conhecimento sobre a biologia das espécies e dos estoques ainda disponíveis.

Nesse sentido o presente projeto visou à utilização de protocolo viável e de baixo custo para a caracterização das espécies de tubarões da região de pesca que envolve os principais pontos de desembarque de pescado no Estado de São Paulo. Neste estudo foram utilizados marcadores moleculares, associados a características morfológicas das espécies que permitissem identificar, ao longo de um período de amostragem feita a partir da obtenção material disponível nos pontos de desembarque e também proveniente diretamente da frota pesqueira nesta região. Foram utilizados protocolos das técnicas de PCR-multiplex e de

barcode na identificação das espécies, a partir de marcadores produzidos diretamente das espécies ou de informações existentes no GenBank.

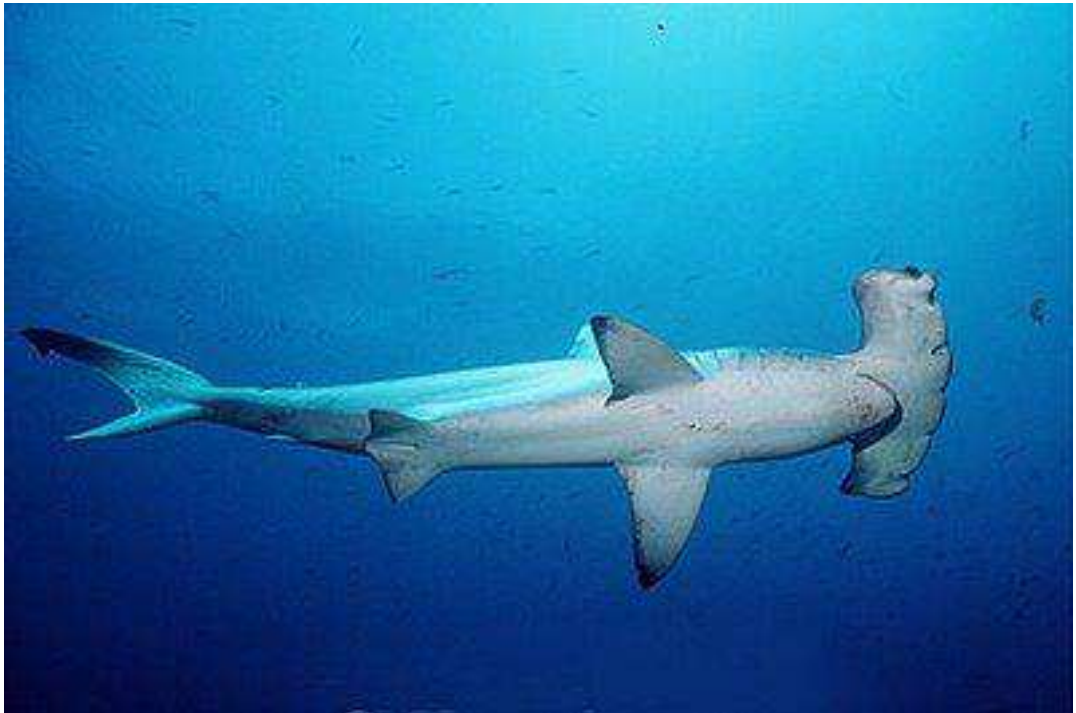
As análises das amostras permitiram a identificação molecular de 12 espécies de tubarões que foram utilizadas para uma análise quantitativa do volume total desembarcado. Conclui-se que o método do código de barras de DNA apresentou-se como uma técnica precisa e rápida para a identificação dos componentes da pesca de tubarões, revelando aspectos relacionados à captura legal e ilegal de espécies. Considera-se que tal metodologia pode ser utilizada de modo generalizado, fornecendo informações precisas sobre as espécies e podendo colaborar com a melhora na obtenção dos dados estatísticos da pesca.

A ordem Carcharhiniformes apresentou-se como a mais representativa, com 1618 amostras identificadas em todos os locais amostrados. Já *Rhizoprionodon lalandii* foi a espécie identificada com maior ocorrência no litoral do Estado de São Paulo, representando 52,71%, da captura total na pesca artesanal.

Apesar da comprovada eficácia dos métodos de genética molecular, sua aplicação em projetos de monitoramento, conservação e gestão da pesca marítima ainda é raro. Tal técnica, além de viabilizar também a identificação das espécies de tubarões a partir da carne comercializada, se mostrou de fácil aplicabilidade e baixo custo, o que possibilita sua utilização nos programas de manejo dos estoques explorados na costa brasileira.

Os resultados apresentados acrescentam informações que podem ser de importância para o conhecimento da biologia dessas espécies e para a gestão da pesca nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, uma vez que esta área apresenta o maior volume de desembarque da pesca extrativa marinha do país. Além disso, considera-se que, dada a carência de dados para a maioria das espécies pertencentes a este grupo, as informações aqui apresentadas possam contribuir para a formulação de programas que permitam o manejo adequado dos estoques e a conservação das espécies de tubarões nesta região.

Referências



7 REFERÊNCIAS

- Albert JS, Fernandes-Matioli FM, Almeida-Toledo LF (1999). New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia*, 1999(2): 410-421.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- Amorim AF, Arfelli CA; Fagundes L (1998). Pelagic elasmobranchs caught by longliners of Southern Brazil during 1974-1997: an overview. *Marine and Freshwater Research* 49: 621–632.
- Amorim AF, Arfelli CA, Domingues RR, Piva-Silva N, Minte-Vera CV (2011). *Coryphaena hippurus* and *Acanthocybium solandri* incidental catch of South and Southeast Brazil (1971-2009) by São Paulo tuna longliners. *Collective volume of Scientific Papers, ICCAT*, 66(5): 2140-2152.
- Avise JC (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C (2009). New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex *Neotropical Ichthyology*, 7(2):161-168, 2009
- Bigelow HB, Schroeder WC (1953). Sawfishes, guitarfishes, skates, and rays and chimaeroids, In: *Fishes of the Western North Atlantic*. Tee-Van J; Breder CM; Parr AE; Schroeder WC; Schultz LP (Eds.). Sears Foundation of Marine Research, New Haven, CT.
- Bonfil R (1994). Overview of world elasmobranchs fisheries. *FAO Technical Paper*, No. 341, 119p.
- Bonfil R, Amorin A, Anderson C, Arauz R, Baum J, larke SC, Graham RT, Gonzalez M, Jolón M, Kyne PM, Mancini P, Márquez F, Ruíz C, Smith W (2007). *Carcharhinus falciformis*. In: IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.1. www.iucnredlist.org. Downloaded on 01October 2013.
- Blanco M, Pérez-Martín RI, Sotelo CG (2008). Identification of shark species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J Agric Food Chem*. 56: 9868-74.

- Branstetter S, Musik JA (1994). Age and Growth Estimates for the Sand Tiger in the Northwestern Atlantic Ocean. *Transactions of the American Fisheries Society* 123:242-254.
- Callejas C, Ochando MD (2001). Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. *J Fish Biol*, 59:1589-1599.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Bräutigam A, Fordham S (1998). Sharks and their relatives: ecology and conservation. *Occas. Pap. IUCN Species Surviv. Comm.* 20.
- Cappetta H (1987). Types dentaires adaptatifs chez les Sélaciens post-paléozoïques. *Palaeovertebrata*, volume 16, n° 2, 57-76.
- Castro RMC, Menezes NA (1998). Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. Castro RMC (Ed.). São Paulo: FAPESP. Pp. 3-13.
- Castro RMC (1998). *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. FAPESP, São Paulo.
- Camhi MD, Lauck E, Pikitch EK et al. (2009). A global overview of commercial fisheries for open ocean sharks. In: *Sharks of the open ocean: biology, fisheries and conservation*. In: Camhi MD; Pikitch EK; Babcock EA (Eds). Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444302516.ch14.
- Camhi MD, Valenti SV, Fordham SV et al. (2009). The conservation status of pelagic sharks and rays: report of the IUCN Shark Specialist Group Pelagic Shark Red List Workshop. IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group. Newbury, UK. x + 78p.
- Carvalho MR (1996). Higher level elasmobranch phylogeny, basal squalians, and paraphily. In: Stiassny MLJ; Parentti LR; Johnson GD (Eds.). *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, pp. 35-62.
- Castro JI (1987). The Position of Sharks in Marine Biological Communities An Overview. In: Cook, S. (edit). *Sharks. An Inquiry into Biology, Behavior, Fisheries and Use*. Proc. Of a Conf. Portland. Oregon, State University Extension Service, 1987, p.11-17.
- Clarke SC, McAllister MK, Milner-Gulland EJ *et al.* (2006). Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. *Ecology Letters*, 9, 1115–1126.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK and Shivji MS (2006). Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conserv Biol* 20:201-211.
- Compagno LJV (1977). Phyletic relationships of living sharks and rays. *Ann. Zool*, 17: 303-322.

- Compagno LJV (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. 125 (4/2): 251 - 655.
- Compagno LJV (1991). The evolution and diversity of sharks. *In*: Discovering Sharks. Gruber, S. H. (ed.). American Littoral Society, 14: 15 - 22.
- Compagno LJV (1999). Checklist of living elasmobranchs. In Hamlett WC (Ed.) Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, pp. 471–498.
- Compagno LJV (2001). *Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes)*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 1, Vol. 2. Rome, FAO. 108 - 117.
- Compagno LJV (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 LJV (2008). Checklist of oceanic sharks and rays. In: Sharks of the open ocean: Biology, fisheries and conservation. Camhi MA, Pikitch EK (Eds). Blackwell Publishing: Oxford.
- Costa FES, Braga FMS, Amorim AF, Arfelli CA (1996). Fishery analysis on Shortfin Mako, *Isurus oxyrinchus* of Southeast and South of Brazil (Elasmobranchii: Lamnidae). Arquivos de Ciências do Mar 30:5–12
- Costa L & Chaves PTC (2006). Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. v6 (n3). Biota Neotropica.
- De Queiroz K (2005) Ernst Mayr and the modern concept of species. Proc Natl Acad Sci USA, 102(1) 6600-6607.
- De-Salle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Phil Trans Royal Soc B, 360:1905-1916.
- Dias-Neto (2011). Proposta de Plano Nacional de Gestão para uso sustentável de eslamobranquios sobreexplotados ou ameaçados de sobreexploração no Brasil. Brasília, IBAMA, 157p.
- Douady CJ, Dosay M, Shivji MS, Stanhope MJ (2003). Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. Mol. Phylogenet. Evol., 26: 215-221.
- Drummond A, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A e Duran C (2010) Geneious.

- Ebert DA, Compagno LJV (2007). Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes* 80, 111–124.
- FAO. FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2009.
- Figueiredo JL (1977). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, raias e quimeras. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-104 p.
- Figueiredo JL e Menezes NA (1978). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-110 p.
- Figueiredo JL e Menezes NA (1980). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-90 p.
- Figueiredo JL e Menezes NA (2000). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-116 p.
- Figueiredo JL, Santos AP, Yamaguti N, Bernardes RA, Rossi-Wongtschowski CLDB (2002). Peixes da Zona Econômica Exclusiva da região Sudeste-Sul do Brasil. Levantamento com rede de meia água. Editora da Universidade de São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 242p.
- Ferreira BP (1988). Ciclo reprodutivo de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes) e *R. porosus* (Poey) (Selachii, Carcharhinidae) na região de Barra de Guaratiba, RJ. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 60: 91–101.
- Franco B, Mendonça FF, Hashimoto DT, 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
- Gadig OBF (1994). Fauna de tubarões da costa norte/nordeste do Brasil (Chondrichthyes, Elasmobranchii). Dissertação de Mestrado. Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 230 p.
- Gadig OBF (2001). Tubarões da costa brasileira. PhD thesis. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil.
- Gonzales MMB (1995). Diversidade de elasmobrânquios do litoral de Cananéia, Estado de São Paulo. VII Encontro do grupo de trabalho sobre pesca e pesquisa de tubarões e raias no Brasil. Resumos... Rio Grande, RS. p-35.

- Harrison IJ, Nirchio M, Oliveira C, Ron E, Gavira J (2007). A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. J Fish Biol, 71.
- Hazin FHV e Lessa RPT. (2005). Synopsis of biological information available on blue shark, *Prionace glauca*, from the southwestern Atlantic Ocean. Collective Volume of Scientific Papers. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, 58: 1179 - 1187.
- Hazin FHV, Hazin HG e Travassos PE (2007). CPUE and catch trends of shark species caught by Brazilian longliners in the Southwestern Atlantic Ocean. Collective Volume of Scientific Papers. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, 60: 636 - 647.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B, 270:313-322.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci, 270:S96-99.
- Heist EJ, Gold JR (1999) Genetic identification of sharks in the U.S. Atlantic large coastal shark fishery. *Fish. Bull.*, 97, 53–61
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996). Molecular Systematics. Massachusetts: Sinauer Associates Incorporation.
- Hoenig JM e Gruber SH (1990). Life-history patterns in the elasmobranchs: implications or fisheries management. Pages 1-16 *in* Pratt HL, Gruber SH & Taniuchi T (Eds.). Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of fisheries. NOAA Tech. Rep. NMFS 90.
- Holden MJ (1974). Problems in the rational exploitation of elasmobranch populations and some suggested solutions. In: Sea fisheries research (Harden FR ed.), p. 117-137. John Wiley & Sons, New York.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burr ridge M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. Plos One 3(6):2490
- Holden MJ (1977). Elasmobranchs. In: Fish population dynamics (Gulland JA ed.), Chap. 9. John Wiley & Sons, New York.
- IBAMA (2007). Estatística da Pesca – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília-DF, <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros>.

- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened species. Version (2010). <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 March 2010.
- Kekkonen M e Hebert PDN (2014) DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. *Molecular ecology resources* 14, 706–15.
- Kotas J, Rocha-Gamba M, Conolly PC, Hostim-Silva M, Mazzoleni RC, Pereira J (1995). A pesca de emalhe direcionada aos elasmobrânquios com desembarques em Itajaí e Navegantes, S.C. VII Reunião do Grupo de Trabalho s/ Pesca e Pesquisa de Tubarões e Raias no Brasil. Rio Grande, 46p.
- Kotas JE, Rocha-Gamba M, Conolly PC, Hostim-Silva M, Mazzoleni RC, Pereira J (1995). Gillnet activities in Southern Brazil. Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Sudeste, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Itajaí, Santa Catarina, Brazil. 48 p.
- Kotas JE (2004). Dinâmica de populações e pesca do tubarão-martelo *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834), capturado no mar territorial e zona econômica exclusiva do sudeste-sul do Brasil. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Ciências da engenharia ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos – SP. 377p.
- Köhler F (2007). From DNA taxonomy to barcoding - how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Zool Reihe*, 83:44-51.
- Lack M e Sant G (2006) World Shark Catch, Production and Trade 1990-2003. paper to the Technical Workshop on the Conservation and Management of Sharks, Intersessional Shark Working Group of the CITES Animals Committee. Australian Department of the Environment and Heritage and TRAFFIC Oceania.
- Lahaye R, Bank M, Bogarin D, et al. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2923-2928.
- Lawson R, Burch SJ, Oughterson SM, Heath S, Davies DH (1995). Evolutionary relationships of cartilaginous fishes: an immunological study. *J. Zool.*, 237: 101-106.
- Lessa R, Santana FM, Rincón Gadig OB, El-Deir ACA (1999). Biodiversidade de elasmobrânquios do Brasil. In: (MMA) Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira (PROBIO). Necton-Elasmobrânquios. Recife, PE, Brazil, pp.154
- Lindstrom DP (1999). Molecular species identification of newly hatched Hawaiian *Amphidromous gobioid* Larvae. *Mar Biotechnol* 1:167–174.

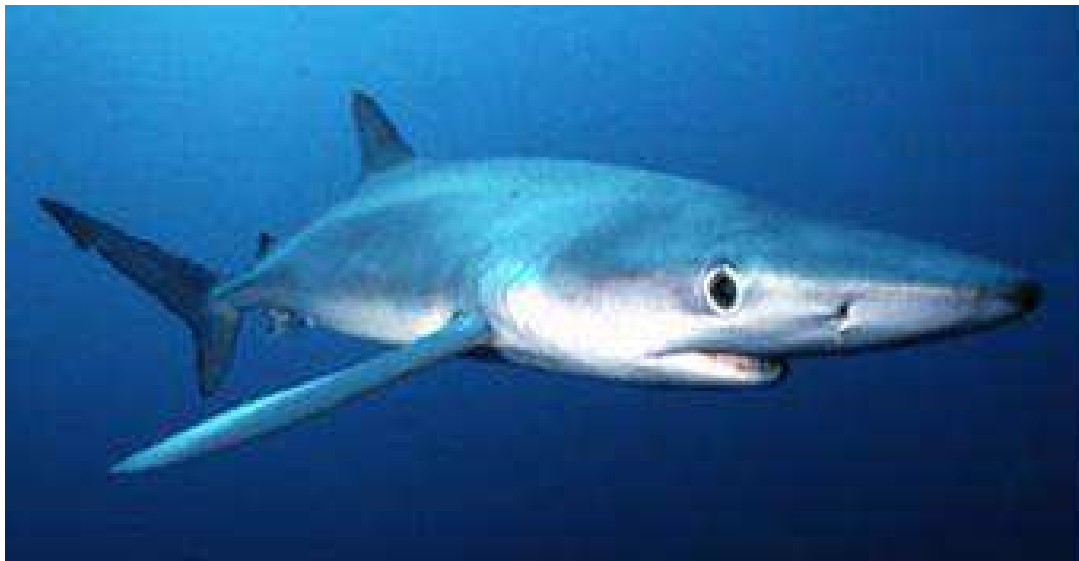
- Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:65-66.
- Mariguela TC, De Franco B, Mendonça FF, Almeida TVV, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009). Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. *Conservation Genetics Resources*. DOI 10.1007/s12686-009-9091-y
- Martin AP e Naylor GJP (1997). Independent origins of filter feeding in megamouth and basking sharks (Order Lamniformes) inferred from phylogenetic analysis of cytochrome *b* gene sequences. In: *Biology of the Megamouth Shark*. Yano K; Morrissey JF; Yabumoto Y; Nakaya K (Eds.). Tokai University Press, Tokyo, 39–50.
- Márquez-Farias JF, Castillo-Géniz LC (1998) Fishery biology and demography of the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the southern Gulf of Mexico. *Fisheries Research* 2, 183-198.
- Magnussen JE, Pikitch EK, Clarke SC *et al.* (2007) Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Animal Conservation*, 10, 199–207.
- McEachran JD, Carvalho MR (2002). Batoid Fishes. In: Carpenter KE (Ed). *The living marine resources of the Western Central Atlantic*. Vol. 1. FAO Species identification guide for fishery purposes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5. Rome, FAO.
- McKenna SA e Allen GR (2002). Coral reef biodiversity and conservation. In: *Implications for coral reef management and policy: relevant findings from the 9th International Coral Reef Symposium* International Society for Reef Studies, World Resources Institute, Conservation International, U.S. Agency for International Development, Washington, D.C.
- Mendonça FF, De Franco B, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009). Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. *Conservation Genetics Resources*. DOI 10.1007/s12686-009-9131-7
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti, F (2009). Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Mol Ecol Resour* 9:771–773.
- Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL, Moura RL (2003). *Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

- Menezes NA e Figueiredo JL (1980). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-96 p.
- Menezes NA e Figueiredo JL (1985). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei (4). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1-105 p.
- Moritz C e Cicero C (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOSone Biol*, 2:1529-1531.
- Motta FS. A pesca artesanal e a reprodução de *Rhizoprionodon lalandii* (Elasmobranchii-Carcharhinidae) no litoral sul do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, UNESP, Campus de Rio Claro, 2001; 88.
- Motta FS, Gadig OBF, Namora RC, and Braga FMS (2005). Size and sex compositions, length–weight relationship, and occurrence of the Brazilian sharpnose shark, *Rhizoprionodon lalandii*, caught by artisanal fishery from southeastern Brazil. *Fisheries Research*, 74: 116–126.
- Motta FS (2006). Ecologia e pesca artesanal de tubarões costeiros no litoral centrosul de São Paulo. Rio Claro, 172p. Tese de doutorado em Zoologia, Universidade Estadual Paulista.
- Montealegre-Quijano S, Carvalho RI e Vooren CM (2005). Sobre a distribuição e abundância de elasmobrânquios pelágicos no sul do Brasil. *XVI EBI*:107.
- MMA (2004). Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº05 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União. Seção 1. Nº102, 28 de maio de 2004.
- MMA (2005). Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa Nº 52, de 08 de novembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 21 de novembro de 2005.
- Namora RC, Motta FS e Gadig OBF (2000). Alimentação de neonatos e jovens de tubarão martelo, *Sphyrna lewini*, no litoral sul de São Paulo. II Reunião da Sociedade Brasileira para Estudo dos Elasmobrânquios. Resumos. Santos, p. 6.
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N and Shivji M (2000) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Mar Biotechnol* 3:231-240.
- Peach MB e Rouse GW (2004). Phylogenetic trends in the abundance and distribution of pit organs of elasmobranches. *Acta Zool.*, 85: 233-244.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD e Vogler AP (2006) Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55, 595–609.

- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S e Achaz G (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21, 1864–77.
- Rosa RS, Gadig OBF (2014) Conhecimento da Diversidade de Chondrichthyes Marinhos no Brasil: A contribuição de José Lima de Figueiredo. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Vol 45(esp): 89-104.
- Rocco L, Liguori I, Costagliola D, Morescalchi MA, Tinti F, Stingo V (2007). Molecular and karyological aspects of Batoidea (Chondrichthyes, Elasmobranchi) phylogeny. *Gene*, 389: 80-86.
- R Development Core Team (2013) R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rambaut A, Suchard M, Xie D e Drummond A (2014) Tracer | BEAST.
- Queiroz K (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(1) 6600-6607.
- Sadowsky V (1965). The hammerhead sharks of the littoral zone of São Paulo, Brazil, with the description of a new species. *Bull. Mar. Sci.*, 15(1): 1- 12.
- Sadowsky V (1971). Estudio economico sobre los Elasmobrânquios de la Zona litoral Paulista. *CARPAS./5/D.Téc.1*. 1 - 11.
- Salle R, Egan MG, Siddall M (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil Trans Royal Soc B*, 360:1905-1916.
- Samanta FM, Lessa R, Carlson J (2006). *Carcharhinus signatus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1 www.iucnredlist.org. Downloaded on 01 October 2013.
- Silva MO, Gadig OBF (1994) Aspectos ecológicos de juvenis de *Sphyrna lewini* (Chondrichthyes, Sphyrnidae) no litoral de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Zoologia. Resumos 93.
- Shirai S (1996). Phylogenetic interrelationships of Neoselachians (Chondrichthyes, Euselachii). In: Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.), *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, pp. 9-34.
- Shivji MS, Chapman DD, Pikitch EK, Raymond PW (2005) Genetic profiling reveal illegal international trade in fins of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics*, 6, 1035–1039.
- 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

- Sole-Cava AM, 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.
- Stevens JD (2008). *The Biology and Ecology of the Shortfin Mako Shark, Isurus oxyrinchus*. In: *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Edited by Cahmi, M. D.; Pikitch, E. K. and Babcock, E. A. Blackwell Publishing Ltd. Chapter 7. 87- 94 p.
- Stingo V (1979) New developments in vertebrate cytotaxonomy. II. The chromosomes of the cartilaginous fishes. *Genetica*, 50: 227-239.
- Valdez-Moreno M, Ivanova NV, Eli´as-Gutiérrez M, Contreras-Balderas S, Hebert PDN (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *J Fish Biol* 74:377–402
- Vences M, Thomas M, Van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2:1-12.
- Vooren CM, Naves LC, Romay AFL (2003) Guia para a identificação de tubarões e raias em desembarques da pesca no Rio Grande do Sul. *Documentos Técnicos de Oceanografia*, Rio Grande, volume 12. 2003. 54 p.
- Vooren CM, Klippel S e Galina AB (2005a). *Biologia e Status de Conservação dos tubarões-martelo *Sphyrna lewini* e *S. zygaena**. In: Vooren CM. & Klippel S. (Eds.) *Ações para conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre, Igaré, p. 98 - 112.
- Vooren CM, Klippel S e Galina AB (2005b). *A pesca industrial no sul do Brasil*. In: Vooren CM. & Klippel S. (Eds.) *Ações para conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre, Igaré, p. 135 - 177.
- Ward R D, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil Trans R Soc B*, 359:1847-1857.
- Waugh J (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29:188-197.
- Woese CR e Fox GE (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8392–8396.
- Yokota L e Lessa RP (2006). Nursery area for sharks and rays in Northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75,349-360.

Anexos



8 Anexos

Anexo I

Protocolo para extração: Aljanabi et al., (1997)

- 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 ou Over night.
- Acrescentar 100µl de NaCl (5M) e inverter os tubos para homogeneização.
- Centrifugar a 10.000 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.
- Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150ul no freezer (-20°C - solução estoque) e o restante na geladeira (4°C - solução de trabalho).

Anexo II.

Protocolo de extração por placa Ivanova et al., (2006)

- Cortar pequenos fragmentos de tecido e colocar pra secar todo o álcool das amostras em uma placa com 96 poços.
- Para uma placa, misturar 5ml de Tampão de Lise Vertebrate e 500µl de Proteinase K (20mg/ml) em um eppendorf estéril.
- Adicionar 50µl do Mix de Lise a cada poço da placa de 96 poços.
- Incubar a 56°C durante no mínimo 6h ou Overnight.
- Centrifugar a 1.500g por 15 segundos e adicionar 100µl de Mix de Ligação a cada amostra utilizando uma pipeta multicanal.
- Fechar com tampa adesiva e agitar vigorosamente de 10 a 15 segundos e centrifugar a 1.000g durante 20 segundos.
- Retire a tampa adesiva e transfira o conteúdo digerido (~150µl) para uma placa GF (PALL 1) colocada sobre uma placa coletora (PALL 2) e selar com a tampa adesiva novamente.
- Centrifugar o conjunto PALL1 e PALL 2 a 5.000g durante 5 minutos.
- Adicionar 180µl de Tampão de Lavagem de Proteína a cada poço da placa GF (PALL 1), vedar com a tampa adesiva e centrifugar a 5.000g durante 2 minutos.
- Adicionar 750µl de Tampão de Lavagem a cada poço da placa GF (PALL 1), selar com a tampa adesiva e centrifugar a 5.000g por 5 minutos.
- Colocar a placa GF (PALL 1) sobre a placa definitiva que irá armazenar as amostras de DNA e incubar a 56° por 30 minutos.
- Aplicar de 30 - 60µl de água ultrapura pré-aquecida a 56° em cada poço da placa GF (PALL 1) e centrifugar por 5 minutos a 5.000g.
- Armazenar as amostras a 4°C ou a -20°C para armazenamento a longo prazo.
- Utilizar de 1 – 5µl de DNA para PCR.

Anexo III

Protocolo da Exosap.

- Fazer um mix com 4,87 μ l de Agua e 0,13 μ l de Exosap para cada amostra.
- Distribuir o mix em uma placa com 96 poços e acrescentar 2 μ l de amplicom (Material já amplificado)
- Levar ao termociclador já programado a 60' a 37° inicial, 15' a 80° e ON a 12°

Anexo IV

Protocolo de precipitação para reações de sequenciamento com EDTA, Acetato de Sódio e Etanol.

- Adicionar 0,7 μ l de EDTA (125mM) em cada poço da placa com as amostras amplificadas.
- Adicionar 0,7 μ l de Acetato de Sódio (3M) em cada amostra e homogeneizar bem.
- Adicionar 17,5 μ l de Etanol 100% em cada amostra e homogeneizar as amostras com leves “batidinhas” nas laterais da placa.
- Cobrir com papel alumínio e incubar por 15min a temperatura ambiente.
- Preparar placas com água para equilibrar o peso (quando limpar apenas uma placa, outra deve ser utilizada para equilibrar o peso, caso contrário a centrifuga não irá funcionar).
- Centrifugar a 4°C por 30 min a 3000 rcf ou 1 hora a 4000 rpm.
- Retirar o excesso de líquido por inversão e logo em seguida dar um spin invertido por 1 min a 180 rcf.
- Adicionar 24,5 μ l de Etanol 70% em cada amostra e centrifugar a 4°C por 15 min a 1650 rcf.
- Retirar o excesso do líquido por inversão e dar um spin invertido por 2 min a 180 rcf.
- Aquecer por 8 min a 95°C com a tampa do termo-ciclador aberta para secagem das amostras.

Anexo V

Fotos dos padrões de bandas da PCR-Multiplex

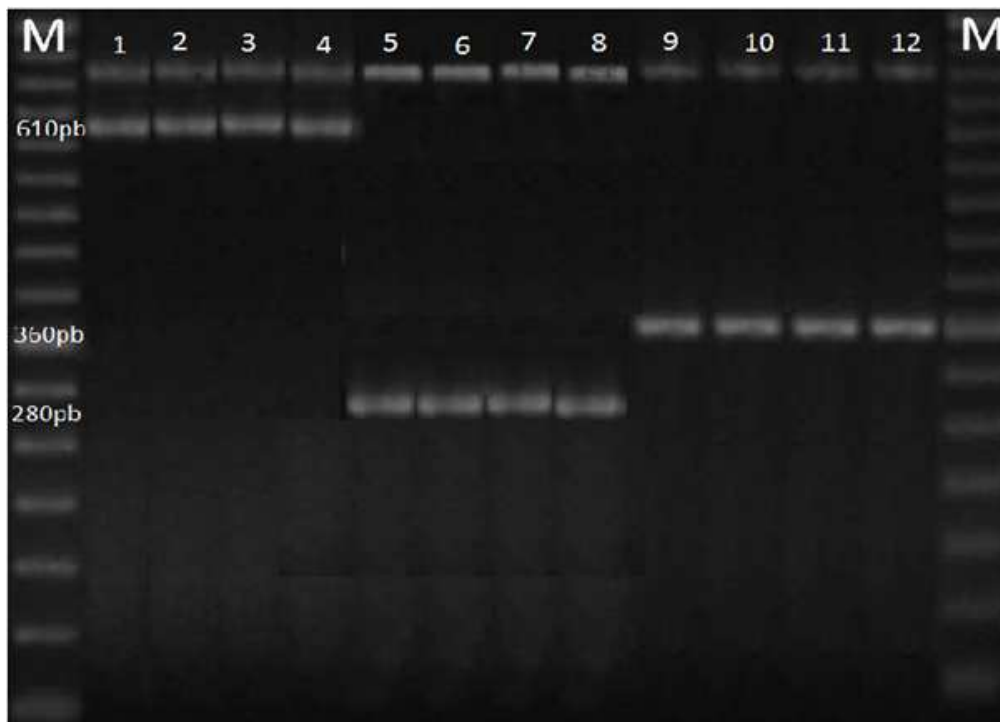


Figura 09: Padrões das bandas na PCR-Multiplex, contendo primers universal e espécie-específico para o gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Região controle (700pb), fragmentos específicos de *Rhizoprionodon lalandii* (1-4 com 610pb), *Isurus oxyrinchus* (5-8 com 280pb) e *Rhizoprionodon porosus* (9-12 com 360pb). M- Marcador molecular de 50 Kb.

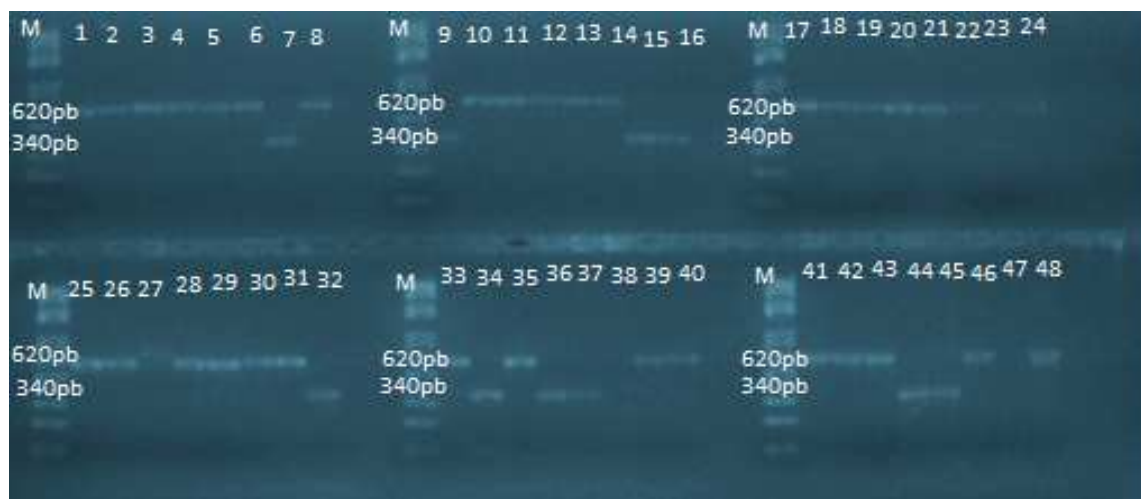


Foto 01: Foto de gel de PCR-Multiplex com leader de 1Kb(M), as amostras (1 a 6, 8, 10 a 14, 17 a 22, 24, 25 a 31, 33, 35, 39 a 43, 46 e 48) representa a espécie *Rhizoprionodon lalandii* (620pb) e as amostras (7, 9, 15, 16, 32, 34, 36, 37, 44 e 45) representam a espécie *Rhizoprionodon porosus* (340pb) de Cananeia-SP, demonstrando os padrões de bandas

para cada amostra, as amostras que não tiveram amplificação eram de espécies diferentes e foram submetidas a PCR de sequenciamento para identificação.



Foto 02: Foto de gel de PCR-Multiplex com leader de 1Kb(M), as amostras (2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19 e 20) representa a espécie *I. oxyrinchus* (280pb) demonstrando os padrões de bandas para cada amostra, as amostras que não tiveram amplificação eram de espécies diferentes e foram submetidas a PCR de sequenciamento para identificação.

Anexo VI.

Tabela referente as distancia genética entre as espécies utilizadas na montagem do banco de dados para identificação por barcode.

| | CCN | FAL | DUS | CPZ | TIG | CCP | CCS | CCE | BSH | RHP | CCB | SPL | SPD | SPZ | SPJ | ALV | CCL | OCS | CCR | CCT | SMA | NGB | LMA | BTH | PSK | RHL | RHT | SPM |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| CCN | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| FAL | 0,04 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| DUS | 0,03 | 0,04 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| CPZ | 0,04 | 0,05 | 0,03 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| TIG | 0,08 | 0,08 | 0,09 | 0,11 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| CCP | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,09 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| CCS | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,05 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| CCE | 0,05 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,09 | 0,05 | 0,05 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| BSH | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,09 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| RHP | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,11 | 0,10 | 0,09 | 0,08 | 0,10 | 0,09 | | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| CCB | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,09 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,09 | | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| SPL | 0,10 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,13 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,13 | 0,12 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| SPD | 0,11 | 0,11 | 0,10 | 0,11 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,13 | 0,12 | 0,09 | | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| SPZ | 0,09 | 0,08 | 0,08 | 0,10 | 0,11 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,12 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| SPJ | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,13 | 0,13 | 0,11 | 0,12 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,10 | 0,06 | 0,11 | | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| ALV | 0,16 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,16 | 0,18 | 0,17 | 0,15 | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,21 | 0,19 | 0,20 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 |
| CCL | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,06 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,06 | 0,00 | 0,09 | 0,09 | 0,07 | 0,09 | 0,14 | | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| OCS | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,09 | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,09 | 0,04 | 0,11 | 0,11 | 0,09 | 0,12 | 0,17 | 0,01 | | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| CCR | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,06 | 0,09 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,07 | 0,10 | 0,05 | 0,11 | 0,13 | 0,10 | 0,13 | 0,18 | 0,03 | 0,05 | | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| CCT | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,17 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,20 | 0,18 | 0,20 | 0,13 | 0,16 | 0,19 | 0,19 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| SMA | 0,25 | 0,22 | 0,24 | 0,25 | 0,23 | 0,24 | 0,22 | 0,24 | 0,22 | 0,23 | 0,24 | 0,24 | 0,23 | 0,24 | 0,21 | 0,17 | 0,20 | 0,23 | 0,25 | 0,18 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| NGB | 0,07 | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,10 | 0,07 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,13 | 0,20 | 0,05 | 0,07 | 0,07 | 0,18 | 0,24 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| LMA | 0,24 | 0,23 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,24 | 0,25 | 0,25 | 0,23 | 0,24 | 0,24 | 0,23 | 0,23 | 0,25 | 0,21 | 0,18 | 0,22 | 0,25 | 0,27 | 0,18 | 0,14 | 0,24 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| BTH | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,21 | 0,20 | 0,19 | 0,20 | 0,09 | 0,15 | 0,19 | 0,19 | 0,13 | 0,18 | 0,20 | 0,16 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| PSK | 0,16 | 0,18 | 0,17 | 0,18 | 0,18 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,16 | 0,19 | 0,18 | 0,20 | 0,20 | 0,18 | 0,20 | 0,12 | 0,15 | 0,17 | 0,18 | 0,15 | 0,20 | 0,18 | 0,20 | 0,12 | | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| RHL | 0,08 | 0,09 | 0,08 | 0,10 | 0,11 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,03 | 0,09 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,19 | 0,06 | 0,09 | 0,09 | 0,19 | 0,23 | 0,10 | 0,24 | 0,19 | 0,19 | | 0,01 | 0,01 |
| RHT | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,11 | 0,11 | 0,09 | 0,08 | 0,10 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,13 | 0,14 | 0,12 | 0,14 | 0,19 | 0,06 | 0,09 | 0,10 | 0,18 | 0,23 | 0,10 | 0,23 | 0,19 | 0,19 | 0,03 | | 0,01 |
| SPM | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,11 | 0,08 | 0,10 | 0,12 | 0,09 | 0,10 | 0,17 | 0,06 | 0,10 | 0,10 | 0,18 | 0,22 | 0,10 | 0,22 | 0,21 | 0,17 | 0,10 | 0,10 | |