

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Variabilidade genética e estrutura populacional do tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial

Aluna: Tássia Oliveira Biazon

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu / SP

Dezembro - 2014

Tássia Oliveira Biazon

Variabilidade genética e estrutura populacional do tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial

Monografia apresentada pela acadêmica Tássia Oliveira Biazon como exigência do curso de graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Bacharelado, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” sob a orientação do Professor Claudio de Oliveira.

Botucatu / SP

Dezembro, 2014

Variabilidade genética e estrutura populacional do tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial

Tássia Oliveira Biazon

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Nome Completo (orientador)

Titulação-Instituição

Nome Completo

Titulação-Instituição

Nome Completo

Titulação-Instituição

CONCEITO FINAL: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua luz, ilumina meu caminho.

Aos meus pais, e meu irmão, que são meus amores, a base da minha vida, minha família.

Aos meus amigos, aqueles que sempre estarão ao meu lado, seja enxugando minhas lágrimas ou sorrindo comigo. E um agradecimento especial ao Guilherme “Varvito”, que me ajudou muito durante o decorrer deste trabalho.

Ao Profº Dr. Claudio de Oliveira, um professor que se tornou um grande amigo, e me proporcionou grandes ensinamentos.

RESUMO

Dentre os tubarões explorados pela pesca, as espécies costeiras circunglobais apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoramento de suas populações, devido às suas distribuições em vastas áreas geográficas. Destas, o tubarão-cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, ocorre em todos os estados costeiros do Brasil, havendo registros de capturas também no Rio Amazonas e no interior da Lagoa dos Patos/RS. Sua ocorrência em áreas estuarinas e de água doce torna-o mais vulnerável a impactos humanos no ambiente marinho, e, por outro lado, faz com que a mesma tenha muito mais contato com o homem do que outras espécies de tubarões grandes. Atualmente *C. leucas* é a terceira espécie de tubarão mais procurada para a obtenção de nadadeiras, sendo sua pesca registrada em toda a zona litorânea brasileira. No entanto, informações básicas para o manejo da pesca, tais como a caracterização da estrutura genética populacional, com a identificação dos níveis de variabilidade, identificação de possíveis restrições geográficas ao fluxo gênico e da existência de populações locais ainda permanecem pouco conhecidas. Tais aspectos são especialmente relevantes para o setor pesqueiro e podem fornecer subsídios para o manejo e conservação de estoques. Considerando a urgente necessidade de controle sustentável da pesca, este estudo buscou caracterizar a estrutura genética populacional do tubarão cabeça-chata no Atlântico Ocidental, abrangendo uma área compreendida entre Estados Unidos e Brasil, utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial. A partir da extração de DNA de 112 amostras da espécie *C. leucas* de duas regiões distintas, foz do Rio Amazonas e Flórida, foram realizadas análises genéticas para a análise populacional da espécie. Os resultados revelaram nível de diversidade genética extremamente baixo na população presente na foz do Rio Amazonas, sendo um dos níveis mais reduzidos entre todas as espécies de elasmobrânquios já estudadas. O mesmo não ocorrendo na população da Flórida, que apresentou 16 haplótipos. A análise comparativa entre as populações mostrou que existe forte estruturação provavelmente relacionada a comportamentos de filopatria desta espécie, como observado em outros tubarões, ou também por mecanismos de isolamento por distância.

Palavras-chave: D-loop, biodiversidade marinha, tubarões, *Carcharhinus leucas*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1. 1 <i>Espécie</i>	01
1. 2 <i>Exploração Pesqueira de Tubarões</i>	03
1. 3 <i>Plano de Ação para a Conservação</i>	05
1. 4 <i>Estruturas Genético-populacionais</i>	06
 2. OBJETIVOS	 10
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 11
3.1 <i>Coleta das Amostras</i>	11
3.2 <i>Extração do DNA Genômico</i>	12
3.3 <i>Amplificação dos Genes Mitocondriais</i>	13
3.4 <i>Purificação das Amostras Amplificadas</i>	15
3.5 <i>Reação PCR de Sequenciamento</i>	15
3.6 <i>Purificação da Reação de Sequenciamento</i>	16
3.7 <i>Sequenciamento</i>	17
3.8 <i>Análise dos Dados</i>	17
 4. RESULTADOS	 18
 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	 24
 6. REFERÊNCIAS	 26

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécie

A espécie *Carcharhinus leucas* (Müller & Henle 1839), mais conhecido como tubarão cabeça-chata, da família Carcharhinidae, ordem Carcharhiniformes, é assim chamado pelo formato pontiagudo da cabeça, pelo seu aspecto robusto e sua agressividade, sendo um dos tubarões de grande porte mais comuns em zonas litorâneas.

A espécie apresenta distribuição mundial em ambientes tropicais e temperados quentes, com ocorrências sazonais em águas frias temperadas (Compagno 1984). Embora seja uma espécie marinha, *C. leucas* é conhecido por sua predileção pela água doce, encontrado em rios e estuários, ocorrendo até em lagos na América Central. Também já foram encontrados a mais de 3.000 km do delta de alguns rios, incluindo os rios Amazonas e Mississippi (IUCN 2013).

No Brasil existem registros de *C. leucas* em todos os estados costeiros, desde capturas ocorridas no Rio Amazonas associadas às partes de águas claras, até registros históricos da presença da espécie no interior da Lagoa dos Patos/RS, sendo o último exemplar coletado na década de 1980 (Soto & Nisa-Castro-Neto 1993). Na área do complexo lagunar-estuarino Cananéia-Paraguá, provável área de berçário desta espécie, a captura ainda é regular, enquanto o litoral de Santa Catarina e Rio Grande do Sul registram a última captura desta espécie, uma fêmea adulta, em janeiro de 1989 (Soto & Nisa-Castro-Neto 1993; Soto & Mincarone 2004). Até o momento, nenhum programa específico de gestão da pesca é conhecido para esta espécie e o único estudo realizado para acessar a estrutura genética populacional de *C. leucas* demonstrou forte restrição ao fluxo gênico entre populações da foz do Rio Amazonas e Golfo do México (Karl *et al.* 2011).

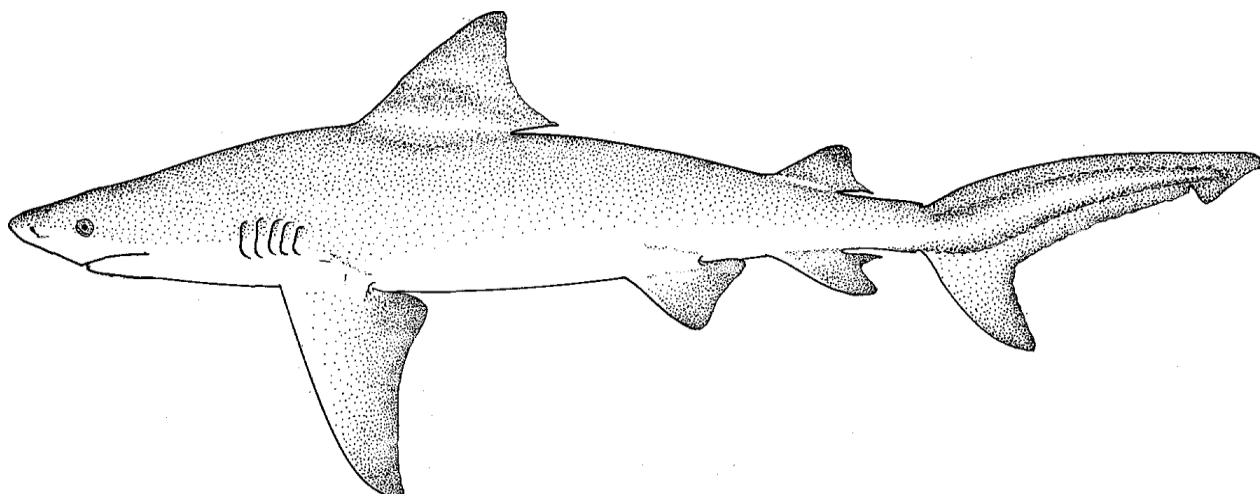


Fig. 1 – *Carcharhinus leucas* (Müller & Henle, 1839) (Compagno 1984).

O frequente aparecimento em áreas estuarinas e de água doce do tubarão cabeça-chata torna-o mais suscetível a impactos humanos. Eles normalmente se deparam com o homem quando estão em águas de baixa salinidade, e são, portanto, sujeitos a maior pressão de pesca e mudanças ambientais associados à modificação do habitat.

A espécie apresenta tamanho máximo de aproximadamente 340 cm e peso de aproximadamente 230 kg, consumindo outros peixes, incluindo outros tubarões, e atuando como um dos principais responsáveis pelos ataques em humanos.

Na maioria das situações, não são espécie-alvo da pesca, entretanto são apanhados como pesca acidental. A espécie já foi explorada comercialmente por sua pele, óleo de fígado e carne, mas atualmente suas barbatanas são a principal demanda, assim como de muitas outras espécies de tubarões.

Segundo a IUCN (2013), esta espécie foi considerada mundialmente como “Quase Ameaçada”. A avaliação foi baseada em dados de pesquisas realizadas por Fowler *et al.* em 2005.

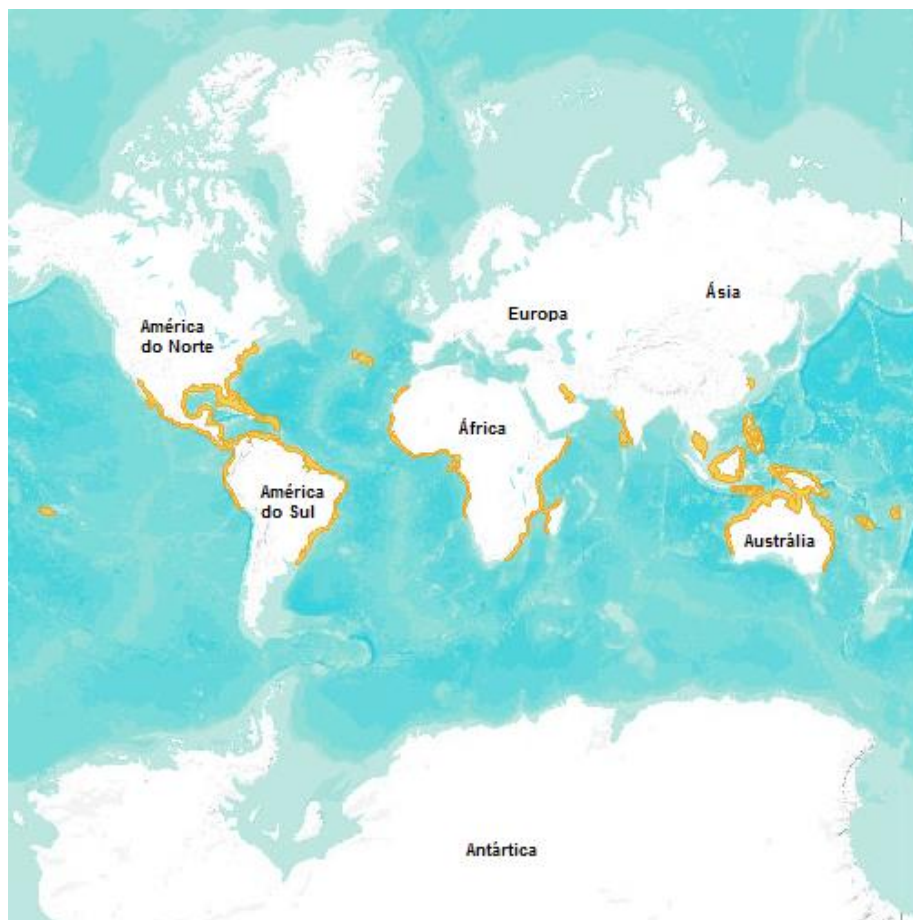


Fig. 2 – Distribuição da espécie *Carcharhinus leucas* (laranja). (IUCN 2013).

Ainda que o tubarão cabeça-chata seja raramente a espécie-alvo da pesca comercial, muitas vezes é pego como captura acessória e sua abundância em habitats costeiros torna-o grande alvo da pesca artesanal. Quando capturado, a carne é consumida por seres humanos ou utilizada em farinha de peixe, além de o couro ser aproveitado, as barbatanas em sopa e o fígado como fonte de vitamina.

Há diversas espécies de elasmobrânquios incluídas prioritariamente em planos de conservação, entre elas *Carcharhinus longimanus* (Poey 1861), *Sphyrna zygaena* (Linnaeus 1758), *Alopias superciliosus* (Lowe 1841), *Prionace glauca* (Linnaeus 1758), *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque 1810), *Galeocerdo cuvier* (Péron & Lesueur 1822) e a espécie do presente estudo, *C. leucas* (Müller & Henle 1839).

1.2 Exploração Pesqueira de Tubarões

O conhecimento a respeito da diversidade de espécies de elasmobrânquios tem sido amplamente revisado nas últimas décadas. Compagno (1984) estimou a

existência de um mínimo de 376 espécies de tubarões e 494 espécies de raias em todo o mundo. Posteriormente, este número foi ampliado para 395 espécies de tubarões e 526 espécies de raias (Compagno 1999). De acordo com o último levantamento realizado por Ebert & Compagno (2007), o grupo dos tubarões é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies, sendo reconhecidas entre as raias 5 ordens, 20 famílias e 574 espécies. Em águas brasileiras são reconhecidas 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias marinhas (Menezes *et al.* 2003). A grande variação do número de espécies descritas nas últimas décadas reflete o estado de conhecimento ainda insipiente a respeito da biodiversidade deste grupo e, embora a necessidade de medidas urgentes de conservação tenha recebido destaque nos últimos anos, ações efetivas para auxiliar no manejo, controle da exploração pesqueira e recuperação das populações que estão sendo exploradas ainda não são efetivas no Brasil.

Até há pouco tempo, a captura de elasmobrânquios em todo o mundo podia ser considerada quase totalmente como uma ocorrência incidental, embora sempre tenha havido comercialização da carne e de subprodutos destes animais. No entanto, nas últimas duas décadas, esse quadro se alterou drasticamente e, com a crescente valorização das nadadeiras comercializadas principalmente na Ásia, as pescarias de tubarões passaram a ser direcionadas a diversas espécies. Nos dados estatísticos da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) sobre a exploração pesqueira mais recente foi registrado no ano de 2009 a captura mundial de 720.000 toneladas de elasmobrânquios, com cerca de 546.000 toneladas de tubarões e o restante de raias. Deste total, cerca de 300.000 toneladas foram capturadas apenas no Oceano Atlântico, sendo o Brasil responsável pela captura de aproximadamente 21.000 toneladas (FAO 2012). A partir do ano 2000, o Brasil passou a ser considerado pela IUCN como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “Major Shark fishing State” (Lack & Sant 2006).

Em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido incluídas nas listas de risco iminente de extinção da International Union for Conservation of Nature e Natural Resources – IUCN (Camhi *et al.* 1998). Entre os tubarões mais explorados, as espécies pelágicas, assim como as espécies costeiras circunglobais, apresentam uma maior complexidade na avaliação e monitoria de suas populações devido às suas distribuições em vastas áreas geográficas (Baum *et al.* 2003). Desta

forma, o efeito global das capturas ainda permanece desconhecido para a grande maioria das espécies (Castro *et al.* 1999). No Atlântico Norte, onde a disponibilidade de informações tem sido um pouco mais consistente, pode-se destacar diversas espécies que já apresentam drásticos declínios populacionais. Para as espécies de tubarão-martelo *Sphyrna zygaena*, *S. lewini* e *S. mokarran* foram constatadas reduções populacionais de até 89%. Entre as espécies de tubarão-raposa *Alopias superciliosus* e *A. vulpinus* observa-se a redução de cerca de 80% em seus estoques. A espécie *Carcharhinus longimanus*, conhecida como tubarão galha-branca, apresenta redução populacional de 70%. Para os tubarões mais capturados em todo o mundo, *Prionace glauca* (tubarão azul) e *Isurus oxyrinchus* (mako) as reduções registradas são de cerca de 60% e 50%, respectivamente. Ainda, para os tubarões costeiros de grande porte, tais como o tubarão-tigre *Galeocerdo cuvier* e o cabeça-chata *Carcharhinus leucas*, são registrados declínios populacionais de até 65% (Compagno 2001; Baum *et al.* 2003). Obviamente, a conservação efetiva destas espécies requer a organização de programas de cooperação internacional (Baum *et al.* 2006).

1.3 Plano de Ação para a Conservação

Embora a IUCN considere a espécie *Carcharhinus leucas* quase ameaçada, o seu comportamento costeiro e a frequência em água doce o torna um alvo mais fácil de pesca, como também particularmente vulneráveis à modificação do habitat e à poluição causada pelas atividades humanas. Pesquisas são evidentemente necessárias para determinar o status de *C. leucas*, permitindo, posteriormente, medidas de conservação adequadas a serem implementadas para garantir o futuro da espécie.

Para a adoção de medidas efetivas para a conservação das espécies de tubarões que apresentam distribuição global, torna-se necessária a participação conjunta de diversas nações. Em 1999 foi criado um Plano de Ação Internacional para a Conservação e Gestão dos Tubarões (IPOA-Sharks) pela Comissão das Pescas (COFI) da Organização das Nações Unidas Para Alimentação e Agricultura (FAO), dando origem a diversos planos nacionais com metas em comum para os países participantes, entre os quais o Brasil, EUA, Inglaterra, Austrália, Canadá, Malásia, países do Mediterrâneo, Equador, Senegal, entre outros. No Brasil este

plano foi elaborado em 2005 pela Sociedade Brasileira para o Estudo dos Elasmobrânquios – SBEEL. Contudo, somente em 2009 o Ministério do Meio Ambiente – MMA aprovou a Proposta de Plano de Gestão para o Uso Sustentável do Grupo de Elasmobrânquios Sobre-explotados ou Ameaçados de Sobre-explotação no Brasil, conferindo prioridade para a pesquisa, gestão e conservação das espécies listadas na Instrução Normativa do IBAMA de 2004, como ameaçadas de extinção, sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-explotação. Foi estabelecido o prazo máximo de cinco anos para o desenvolvimento e implantação de planos de recuperação de espécies ameaçadas e planos de gestão para os estoques em risco de agravamento.

Entre as prioridades estabelecidas no plano nacional constam pesquisas que visem à caracterização genética populacional dos estoques, monitoria das áreas protegidas ou áreas de berçário, monitoria dos desembarques nos principais portos comerciais para a obtenção de dados populacionais, pesquisas para a identificação de áreas prioritárias e ainda, o estímulo a trabalhos de pesquisa em conjunto e para participação em fóruns internacionais para espécies que constituam recursos compartilhados (IBAMA 2009).

1.4 Estruturas Genético-populacionais

Na Convenção sobre Diversidade Biológica ocorrida durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento realizada em 1992, foi acordada pela comunidade mundial a utilização sustentável de seus componentes e a partilha justa e equitativa dos benefícios decorrentes da utilização dos recursos genéticos, como parte de um compromisso com o desenvolvimento sustentável global. Tal determinação representou um passo dramático para a conservação biológica, sendo esta convenção considerada como o primeiro acordo global abrangente para abordar todos os aspectos da diversidade biológica. Além disso, reconheceu que a conservação da diversidade biológica se apresenta como uma preocupação comum da humanidade e uma parte integrante do processo de desenvolvimento.

Nos últimos anos, uma representativa parcela da comunidade científica mundial tem se dedicado ao conhecimento relacionado à diversidade biológica e à conservação dos recursos genéticos, utilizando desde as tradicionais técnicas para

os estudos de DNA até as mais recentes inovações biotecnológicas aplicadas em análises intra e interespecíficas para avaliação de processos evolutivos, estimativas do grau de variabilidade genética, análises de zonas de contato entre espécies, fluxo gênico, biogeografia histórica, caracterizações de estruturas populacionais, sistemática molecular, inferência de relações filogenéticas, e identificação específica de espécimes processados, entre outras (Avice 1986; Ortí *et al.* 1996; Bermingham & Avice 1986; Beheregaray *et al.* 2002).

Neste contexto, os bancos de material genético, que têm como objetivo agrupar e resguardar de maneira sistemática informações genéticas representativas da diversidade de animais e plantas apresentam-se como uma base para a conservação e desenvolvimento biotecnológico. Atualmente, o Brasil possui cerca de 70 instituições com coleções de tecidos credenciadas no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) do Ministério do Meio Ambiente. No entanto, nenhuma destas coleções é dedicada até o momento, à catalogação e preservação de material biológico e genético de tubarões e raias e, em sua maioria, não atendem aos critérios internacionais de qualidade para recursos biológicos e não possuem sustentabilidade financeira. Tal panorama denota, assim, a necessidade urgente do estabelecimento e consolidação de bancos de material genético representativos da biodiversidade, inseridos em redes internacionais de trabalho e voltados para pesquisa e desenvolvimento.

Com a evolução do conhecimento sobre marcadores de DNA e o desenvolvimento recente da biotecnologia, estudos genéticos estão sendo incorporados à conservação das espécies de forma prática e eficiente. Para o setor pesqueiro, a identificação e manutenção de estoques diferenciados são elementos fundamentais pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho & Hauser 1994), constituindo-se o conhecimento da variabilidade genética das populações e a estrutura destas entidades biológicas no ambiente os objetivos básicos estabelecidos em programas de controle e conservação das espécies, (Lacy & Lindenmayer 1995). Já há algum tempo, os padrões de diversificação do DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo reconhecidos como ferramentas potencialmente importantes nos estudos de linhagens comerciais de peixes (Ferris & Berg 1987; Toledo Filho *et al.* 1992), possibilitando a distinção de populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos. (Bermingham & Martin 1998; Patarnello *et al.* 2003; Perdices *et al.* 2004).

As observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies apresentam uma distribuição geográfica determinada introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando a proposição do termo “filogeografia” (Avice *et al.* 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de sequências entre estes segmentos genômicos, Avice (2000) propõe e discute categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas.

Duncan *et al.* (2006) elaboraram o primeiro trabalho filogeográfico global para o tubarão-martelo *Sphyrna lewini*, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial. Neste estudo, foi evidenciada forte descontinuidade populacional entre os oceanos. No entanto, em uma avaliação mais recente, utilizando marcadores nucleares (microssatélites), Daly-Engel *et al.* (2012) identificaram ausência de estruturação populacional, demonstrando a existência de contraste entre linhagens mitocondriais e nucleares. No estudo de Karl *et al.* (2011), que visou caracterizar a estrutura populacional de *C. leucas* entre o Golfo do México e a costa Norte do Brasil, também utilizando marcadores mitocondriais e nucleares do tipo microssatélites, foram observadas fortes divergências nos resultados. Devido aos padrões de herança materna e paterna associada a estes marcadores, tais resultados sugerem a existência de fluxo gênico relacionados à caracterização de filopatria e taxas de migrações diferenciais entre machos e fêmeas. Tais aspectos ressaltam a importância da incorporação de marcadores mistos em análises populacionais também em tubarões.

Em avaliações de menor escala, Schultz *et al.* (2008) identificaram fortes restrições ao fluxo gênico em populações do tubarão-limão (*Negaprion brevirostris*) coletadas no Brasil, Bahamas e Guiné Bissau. Neste estudo ficou evidente a estruturação entre as porções do leste e oeste do Oceano Atlântico e ainda uma moderada diferenciação entre as amostras brasileiras coletadas no hemisfério sul e as amostras das Bahamas, no Caribe. Em outro estudo realizado por Chapman *et al.* (2009) em *S. lewini*, foi encontrada forte diferenciação estrutural no Atlântico, com estoques distintos no Golfo do México, Caribe e América do Sul. Do mesmo modo, para os tubarões de pequeno porte *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii*, duas das

espécies mais capturadas em pescarias costeiras das Américas, Mendonça *et al.* (2011b) identificaram fortes estruturações entre populações do Atlântico Oeste. Esta diferenciação seria provavelmente modulada pelas correntes marítimas Norte Equatorial e Corrente do Brasil.

Pela observação dos diversos modelos de dinâmica populacional de tubarões oceânicos e costeiros estudadas do ponto de vista genético, acredita-se que cada espécie possui características que, associadas às pressões ambientais, podem determinar estruturas populacionais independentes. No entanto, padrões compartilhados, se identificados, poderão viabilizar o desenvolvimento de planos de manejo eficientes para um grupo de espécies. Ao se determinar uma região prioritária de proteção que englobe importantes estoques de diversas espécies, seria possível diminuir a aplicação de recursos e esforços, aumentando as chances de conservação.

2. OBJETIVOS

Considerando a urgente necessidade de controle sustentável da pesca, dificultada principalmente pela falta de informações, este estudo buscou caracterizar a estrutura genética populacional do tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, na costa brasileira e no Caribe (EUA), abrangendo toda a área norte de distribuição da espécie no Atlântico Ocidental.

Desta maneira, o projeto visa gerar dados a respeito da dinâmica populacional da espécie *C. leucas*, utilizando as sequências da região controladora do DNA mitocondrial para determinar os níveis de variabilidade genética na espécie e testar a hipótese nula, segundo a qual só existe uma população dessa espécie no litoral brasileiro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas por um grupo de pesquisas no Museu de História Natural da Flórida, e também por nosso grupo de pesquisa, na foz do Rio Amazonas, em locais reconhecidos como centros de desembarques da pesca oceânica e costeira. Em campo foram preservados fragmentos de tecidos musculares em solução de etanol a 95%, os quais foram acondicionados em tubos individuais devidamente identificados e mantidos em caixas de 100 unidades e preservados em freezer (-20°C). Todas as amostras obtidas foram depositadas na coleção Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) da UNESP, Botucatu, credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético.



Fig. 3 – Locais de origem das amostras: 1- Flórida, 2 - Foz do Rio Amazonas.

Associadas a estas coletas de amostras, foram feitos registros de campo contendo o nome do coletor e instituição pertencente, nome das espécies, local de captura, sexo e comprimento das carcaças, entre outras. Observações adicionais, tais como número de barcos amostrados por viagem de coleta, número total de animais desembarcados e dias de operação de cada embarcação também foram registradas.

Até o presente momento temos em nossa coleção de tecido cerca de 40 amostras oriundas da foz do Rio Amazonas e cerca de 100 amostras provenientes da Flórida. Destas amostras, foram analisados 112 exemplares de *C. leucas*, sendo 32 amostras originárias da foz do Rio Amazonas e 80 advindas da Flórida.

3.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de células musculares, utilizando a metodologia descrita por Ivanova *et al.* (2006), nomeada Extração de Placa. Que segue os princípios abaixo:

1. Cortar pequenos fragmentos de tecido e colocar secar todo o álcool das amostras em uma placa com 96 poços.
2. Para uma placa, misturar 5 mL de Tampão de Lise Vertebrate e 500 µL de Proteinase K (20mg/mL) em um eppendorf estéril.
3. Adicionar 50 µL do Mix de Lise a cada poço da placa de 96 poços.
4. Incubar a 56°C durante no mínimo 6 horas ou overnight.
5. Centrifugar a 1500G por 15 segundos e adicionar 100 µL de Mix de Ligação a cada amostra utilizando uma pipeta multicanal.
6. Fechar com tampa adesiva e agitar vigorosamente de 10 a 15 segundos e centrifugar a 1000G durante 20 segundos.
7. Retire a tampa adesiva e transfira o conteúdo digerido (~150 µL) para uma placa GF (PALL 1) colocada sobre uma placa coletora (PALL 2) e selar com a tampa adesiva novamente.
8. Centrifugar o conjunto PALL 1 e PALL 2 a 5000G durante 5 minutos.
9. Adicionar 180 µL de Tampão de Lavagem de Proteína a cada poço da placa GF (PALL 1), vedar com a tampa adesiva e centrifugar a 5000G durante 2 minutos.

10. Adicionar 750 μ L de Tampão de Lavagem a cada poço da placa GF (PALL1), selar com a tampa adesiva e centrifugar a 5000G por 5 minutos.
11. Coloque a placa GF (PALL 1) sobre a placa definitiva que irá armazenar as amostras de DNA e incubar a 56°C por 30 minutos.
12. Aplicar de 30 – 60 μ L de ddH₂O pré-aquecida a 56°C em cada poço da placa GF (PALL1) e centrifugar a 5000G por 5 minutos.
13. Armazenar as amostras a 4°C ou a -20°C para armazenamento a longo prazo.
14. Utilize de 1 – 5 μ L de DNA para a PCR.

3.3 Amplificação dos Genes Mitocondriais

Após a extração das amostras, foi procedido a amplificação dos segmentos de DNA da região controladora (*D-loop*), efetuada em termociclador de PCR utilizando 12,5 μ L de solução contendo os respectivos volumes da Tabela 1.

Com as amostras do Rio Amazonas utilizamos os primers Pro-L 5'-AGGGRAAGGAGGGTCAAACCT-3' e 12S 5'-AAGGCTAGGACCAAACCT-3' (Keeney & Heist, 2006). A amplificação das amostras oriundas da Flórida foi realizada com novos primers internos, sendo eles: Pint2F 5'-CTAGTTCCTTTAATGGCAT-3' e Pint2R 5'-ATGCCATTAAAGGGAACCTAG-3' (nossos dados ainda não publicados). Ainda, para a obtenção das amostras da Flórida, foi necessário realizar reações de *nested* PCR, uma vez que as amostras apresentavam problemas de conservação, com DNA muito degradado.

Tabela 1. Reação de PCR empregando a enzima *PHT taq polimerase*

Soluções	Volume (µl)
Água Milli-Q	8,9
Tampão 10X	1,25
MgCl ₂	0,5
Primer Forward (5µM)	0,25
Primer Reverse (5µM)	0,25
dNTP (2mM)	0,3
PHT Taq	0,05
DNA genômico (50ng/µl)	1
Volume Final	12,5

Essas reações foram realizadas em um termociclador modelo Veriti 96-well Fast (ABI-Applied Biosystems). Cada ciclo de PCR constituiu-se basicamente na desnaturação a 95°C por 5 minutos, hibridação a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos, com 40 repetições (Tabela 2).

Tabela 2. Programa de PCR para amplificação da região D-loop

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	95° C	5'
2	Desnaturação	95°C	45"
3	Anelamento	54°C	30"
4	Extensão	72°C	70"
5	Volta para o passo 2	-	40 X
6	Extensão Final	72°C	7'

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% ((1g de agarose/100ml de tampão TAE 1X), corados com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia) na proporção 1:1. O tamanho do fragmento amplificado foi determinado por comparação à um padrão, o *Ladder 1Kb plus*.

3.4 Purificação das Amostras Amplificadas

Após a visualização do produto de amplificação das amostras em gel de agarose 1% foi realizada a reação de limpeza com o kit ExoSap-IT® (USB Corporation) de acordo com o protocolo descrito a seguir:

1 - Em um tubo prepara-se uma reação de 7,0µl de volume total contendo 5,0 µl do produto de amplificação da PCR, 0,13µl da Enzima ExoSap e 1,87µl de água ultra pura (Milli-Q);

2 - Leva-se ao termociclador para a realização do seguinte programa:

Tabela 3. Programa de limpeza com Exosap I.

Passo	Temperatura	Tempo
1	37°C	60'
2	80°C	15'

3.5 Reação PCR de Sequenciamento

Para a reação de PCR para sequenciamento foi utilizado o kit *Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), como apresentado na Tabela 4. As condições dos ciclos de sequenciamento incluíam desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 4 minutos.

Tabela 4. Reação para PCR de sequenciamento

Reagente	Volume (µl)
Big Dye™ Terminator	0,70
Tampão do Big Dye™ Terminator	1,05
Primer F e R (5µM)	0,40
DNA (Produto da EXOSAP)	1,00
Água Milli-Q	3,90
Volume total	7,00

3.6 Purificação da Reação de Sequenciamento

As amostras submetidas à reação de sequenciamento foram purificadas pelo método de Acetato/EDTA/etanol de acordo o protocolo a seguir:

1. Adiciona-se em cada amostra: 0,7 µl de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se em cada amostra: 0,7 µl de Acetato de Sódio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no *spin* brevemente;
4. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%. Homogeneizar e passar no spin.
5. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C).
6. Centrifuga-se por 30 min a 3000 rcf à temperatura ambiente.
7. Descartar o excesso do etanol por inversão.
8. Centrifugar inversamente as amostras por 1 min a 180 rcf;
9. Adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70%;
10. Centrifuga-se por 15 min a 1650 rcf à temperatura ambiente.
11. Descartar o excesso do líquido por inversão;
12. Centrifugar inversamente as amostras por 2 min a 180 rcf;
13. Seca-se as amostras sem a tampa em termociclador aberto por 8 minutos a 96°C;
- 14-Guarda-se as amostras envoltos por papel alumínio em freezer - 4°C até o sequenciamento.

3.7 Sequenciamento

As sequências foram obtidas através de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 (*Perking-Elmer*) do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu e no sequenciador ABI3730 (*Perking-Elmer*) do Laboratório de bioinformática do Instituto FIOCRUZ em Belo Horizonte.

3.8 Análises dos Dados

As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram editadas pelo programa Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters Ltd.) para a obtenção das sequências consenso. As sequências consenso de cada indivíduo foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão txt).

Para maior exatidão dos dados e a verificação de contaminantes (DNA exógeno) as sequências foram submetidas ao programa BLAST disponível no sítio do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As sequências foram alinhadas usando o programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>) (Edgar 2004). Os alinhamentos foram salvos em formato Fasta e analisados no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) e mínimas correções das sequências, a fim de não alterar os dados, foram feitas manualmente.

Para cada uma das localidades foram calculados os seguintes índices de diversidade molecular: número de haplótipos (H), número de haplótipos únicos (HU), diversidade nucleotídica (Pi; indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências de DNA (Li & Graur 1991), através dos programas ALEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) e DNAsp 5.10 (Librado & Rozas 2009).

As análises das distâncias genéticas e montagem do dendrograma foram realizadas com o programa MEGA v.5.1 (Tamura *et al.* 2011).

4. RESULTADOS

Os procedimentos para isolamento, amplificação e sequenciamento das amostras de DNA mostraram-se eficientes, possibilitando-se, assim, a obtenção de 112 sequências, sendo 32 amostras da foz do Rio Amazonas e 80 amostras da Flórida (Florida Museum of Natural History - EUA).

No segmento genômico correspondente à região D-loop do DNAm_t, o fragmento analisado foi composto por 410 pares de bases (pb).

Os 17 haplótipos encontrados estão listados na Tabela 5, identificados de H1 a H17. A Tabela 6 apresenta a distribuição destes haplótipos entre as duas localidades utilizadas no estudo.

Dentre os 32 indivíduos capturados na foz do Rio Amazonas (Tabela 7), apenas 2 haplótipos foram encontrados, resultando numa diversidade haplotípica de $H_d = 0,0625 \pm 0,0577$ e diversidade nucleotídica de $\pi = 0,066687$ para essa amostra. Já nos 80 indivíduos obtidos da Flórida, 16 haplótipos foram encontrados, com diversidade haplotípica de $H_d = 0,6323 \pm 0,0538$ e diversidade nucleotídica de $\pi = 1,174553$ para essa amostra. Totalizando, assim, 17 haplótipos.

A Tabela 8 apresenta a matriz de distância genética par-a-par entre os haplótipos nas amostras analisadas.

As frequências nucleotídicas observadas foram de A = 35.16%, T = 35.00%, C = 15.00%, G = 14.84% para a população do Rio Amazonas, e A = 31.36%, T = 39.36%, C = 10.77%, G = 18.51% para a população da Flórida.

Uma comparação entre as duas amostras através do teste de F_{ST} resultou no valor de 0,64534.

O dendrograma (Fig. 4) apresenta a relação entre os haplótipos encontrados e nele se observa que não há uma separação entre as amostras da Flórida e do Rio Amazonas.

Tabela 6. Número de indivíduos por haplótipo de tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*, e sua distribuição geográfica.

População	Haplótipo																
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
Amazonas	31	1															
Flórida	4		16	46	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 7. Polimorfismos de DNA da região controle (D-loop) para os indivíduos de *Carcharhinus leucas*, para as duas localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica.

População	N	H	HU	%HU	HD	PI	D de Tajima	Fs de Fu
Amazonas	32	2	1	7,69	0,0625 +/- 0,0577	0,066687	-1,14244**	-1,26483**
Flórida	80	16	12	92,31	0,6323 +/- 0,0538	1,174553	-1,93673*	-11,77785*

* significante $P < 0,05$ / ** não significante $P > 0,10$

Tabela 8. Matriz de distância genética par-a-par entre os haplótipos nas amostras analisadas de tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*.

	H1	2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
H1	0.00000																
H2	1.06662	0.00000															
H3	1.06863	2.25947	0.00000														
H4	2.25947	3.64990	1.06662	0.00000													
H5	1.19673	2.54914	0.00000	0.00000	0.00000												
H6	2.25947	3.64990	3.67303	2.30331	2.60578	0.00000											
H7	2.25947	3.64990	3.67303	2.30331	2.60578	2.30331	0.00000										
H8	2.39553	3.89002	1.12680	0.00000	0.00000	2.44515	2.44515	0.00000									
H9	1.12905	2.39553	0.00000	0.00000	0.00000	2.44515	2.44515	0.00000	0.00000								
H10	2.39553	3.89002	1.12680	0.00000	0.00000	2.44515	2.44515	0.00000	0.00000	0.00000							
H11	5.42067	7.36085	3.85208	2.42461	2.76213	5.62627	5.62627	2.58230	2.58230	2.58230	0.00000						
H12	1.19673	1.19673	0.00000	1.19419	0.00000	4.19535	4.19535	1.27018	0.00000	1.27018	4.43022	0.00000					
H13	9.93344	12.80070	7.17651	5.47696	6.37602	10.91824	10.91824	5.89140	5.89140	5.89140	9.87176	5.95193	0.00000				
H14	5.27554	7.26579	3.64990	2.25947	2.54914	5.39670	5.39670	2.39553	2.39553	2.39553	5.42067	4.16456	9.93344	0.00000			
H15	7.00639	9.35408	5.14808	3.58116	4.07362	7.24444	7.24444	3.81135	3.81135	3.81135	7.15179	5.93221	12.41811	1.06993	0.00000		
H16	6.13508	8.49695	4.33923	2.72695	3.16189	6.48529	6.48529	2.92822	2.92822	2.92822	2.72695	5.08853	6.44439	6.13508	8.75754	0.00000	
H17	2.23937	3.51308	1.05652	2.22735	1.18149	5.12889	5.12889	2.35928	1.11551	2.35928	5.33984	1.18149	9.05542	5.07387	6.66629	5.99507	0.00000

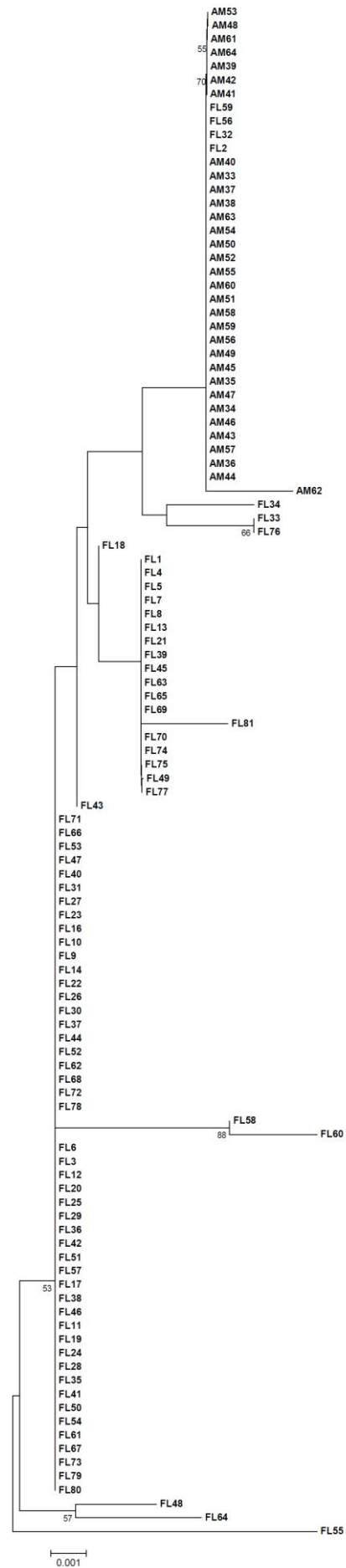


Fig. 4 – Dendrograma mostrando as relações entre os 112 indivíduos *Carcharhinus leucas* analisados no presente estudo. As iniciais FL e AM representam, respectivamente, amostras da Flórida e Amazonas.

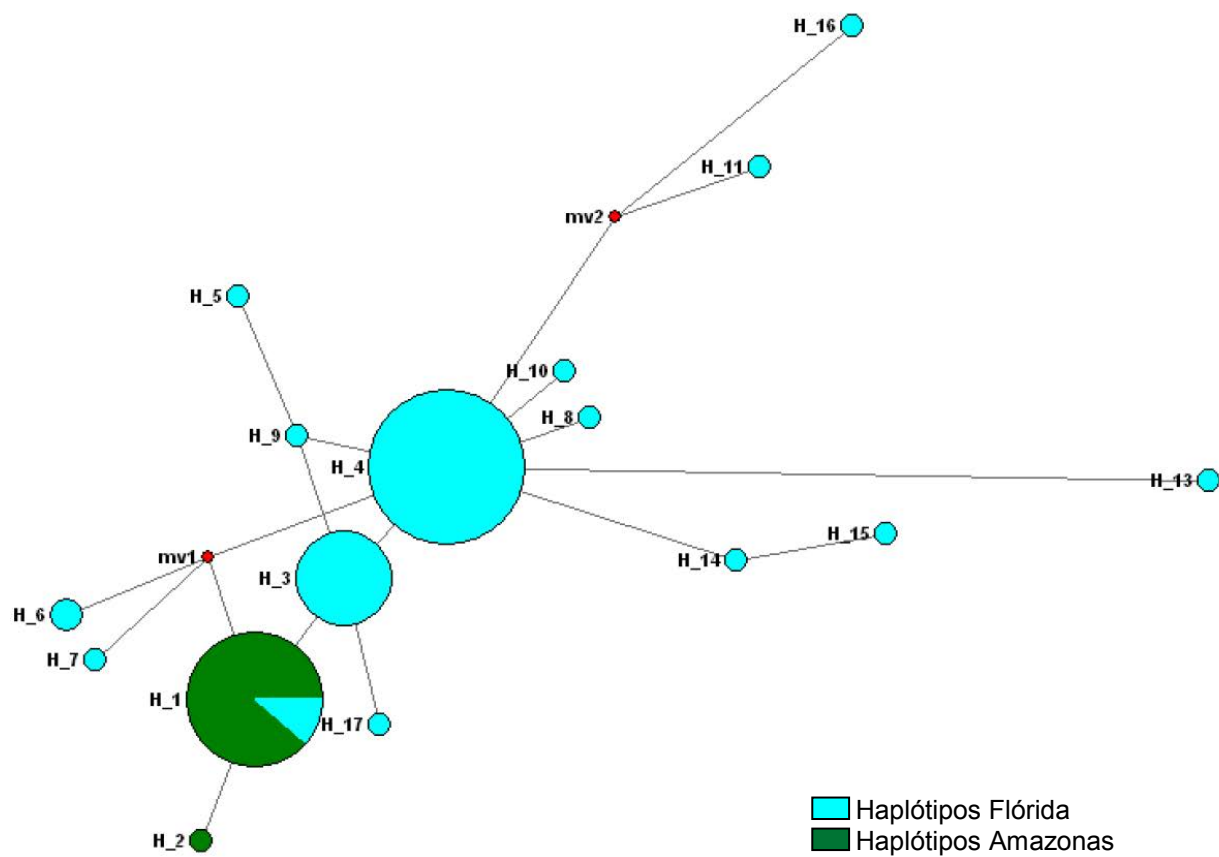


Fig. 5 – Rede de haplótipos, das duas localidades estudadas, do tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas*. Em verde, as amostras da foz do Rio Amazonas, em verde-água, as amostras da Flórida. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Em vermelho estão assinalados os haplótipos hipotéticos.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A análise de 112 indivíduos de *C. leucas* mostrou a presença de 17 haplótipos. Karl *et al.* (2011), estudando 102 amostras de tubarões cabeça-chata de quatro populações locais e utilizando o gene mitocondrial D-loop (791 pb), encontram 14 haplótipos. Tillett *et al.* (2012), estudando 169 amostras de tubarões cabeça-chata de sete populações locais e utilizando os genes mitocôndrias D-loop (837 pb) e ND4 (797 pb), mostraram que haviam 13 haplótipos para o D-loop. A presença de 13 haplótipos nas amostras da Austrália é menor do que observado no presente estudo e no trabalho de Karl *et al.* (2011), sugerindo que a diversidade genética na região do Atlântico Ocidental é maior que a da Austrália.

Por outro lado, os resultados revelam um nível de diversidade genética extremamente baixo na população presente na foz do Rio Amazonas (somente dois haplótipos, $H_d=0,0625$), sendo um dos níveis mais reduzidos observados entre as espécies de elasmobrânquios, onde esses valores variam de $H_d=0,226$ (*Mustellus schimitti* – Pereyra *et al.* 2010) e $H_d=0,97$ (*Rhincodon typus* – Castro *et al.* 2007) entre cerca de 20 espécies já estudadas. O mesmo não ocorre na população da Flórida, que apresentou 16 haplótipos ($H_d=0,6323$), valor próximo à média observada para elasmobrânquios.

A baixa diversidade haplotípica encontrada nas 32 amostras da foz do Rio Amazonas ($H_d=0,0625$ – 2 haplótipos) contrasta com os valores encontrados por Karl *et al.* (2011) para uma amostra de 49 indivíduos de Belém ($H_d=0,33$ – 7 haplótipos). Karl *et al.* (2011) relataram que as amostras de Belém foram adquiridas no mercado Ver-o-peso, sem detalhes de procedência. Como esses animais podem ser capturados em grande variedade de localidades antes de chegar a esse mercado, é possível que as amostras procederam não apenas da foz do Rio Amazonas, mas também de outras localidades. Outra possibilidade para explicar essa diferença pode ser o fato de que a região do D-loop sequenciada por Karl *et al.* (2011), consistindo de 791 pb, seja mais variável que a região sequenciada no presente estudo (410 pb).

Os testes de neutralidade seletiva D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997) foram realizados para determinar se as amostras das diferentes localidades estão em equilíbrio com relação ao DNA mitocondrial, considerando que um desvio

significativo do equilíbrio no DNAm_t corresponde provavelmente a um resultado de recente expansão populacional após um evento de gargalo, no caso em que nenhuma vantagem seletiva exista entre os haplótipos (Rand *et al.* 1998). Os valores de P para o teste D de Tajima, para a amostra da Flórida, foram significativos, indicando que o gene analisado está sob efeito de seleção neutra. Por outro lado, os valores de F_s de F_u foram também significativos, indicando que possa estar ocorrendo uma expansão populacional após um efeito de gargalo. Os resultados obtidos mostram que não há um desvio significativo para a amostra da foz do Rio Amazonas, com relação do teste D de Tajima o que é corroborado pelos valores obtidos para o F_s de F_u indicando que não há evidência de expansão populacional para essa localidade.

A análise comparativa entre as duas localidades mostrou que há uma forte estruturação, sendo o valor de F_{ST} observado de $F_{ST} = 0,64534$. Esse valor é muito superior ao observado por Tillett *et al.* (2012) que encontraram um valor de $F_{ST} = 0,0767$ entre as amostras de tubarão cabeça-chata da Austrália. Porém o valor por nós observado é similar ao observado por Karl *et al.* (2011), que encontraram valores de $F_{ST} = 0,864$, $0,847$ e $0,786$ nas comparações entre as amostras de Belém e do Golfo do México, costa do Golfo da Flórida e costa Atlântica de Flórida, respectivamente. Tanto no presente estudo como nos estudos de Karl *et al.* (2011) e Tillett *et al.* (2012) esses valores foram significativos, indicando a existência de isolamento populacional.

Os estudos desenvolvidos por Karl *et al.* (2011) e Tillett *et al.* (2012) com microssatélites mostram que não havia diferenças significativas entre as amostras de tubarão cabeça-chata analisadas da Austrália e do Atlântico Ocidental. Em ambos os estudos os autores, com base na existência de estruturação populacional observada no DNAm_t, sugerem que as fêmeas possam apresentar comportamento de filopatria. No presente estudo não foram estudados marcadores nucleares, o que impossibilita uma comparação desse tipo. Por outro lado, a forte estruturação encontrada nos dados obtidos de DNAm_t (D-loop) e o conhecido hábito de grande nadador desta espécie, reforçam a hipótese de que esse comportamento de filopatria pode realmente ocorrer em *Carcharhinus leucas*.

6. REFERÊNCIAS

Avice JC (2000) **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) **Intraspecific phylogeography the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics**. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.

Avice JC, (1986) **Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals**. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B.* 312: 325-342.

Baum J, Medina E, Musick JA, Smale M (2006) ***Carcharhinus longimanus***. In: **IUCN 2010**. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1.

Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA (2003) **Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic**. *Science*, 299, 389-392.

Beheregaray LB, Sunnucks P, Briscoe DA (2002) **A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex**. *Proc Roy Soc Lond Ser B Biol Sci* 269:65-73.

Bermingham E, Avice JC (1986) **Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States**. *Genetics*, 113:939-965.

Bermingham E, Martin AP (1998) **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America**. *Mol Ecol.* 7: 499-517.

Camhi M, Fowler S, Musick J, Brautigam. Fordham FS (1998) **Sharks and their relatives**. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, no. 20. 39p.

Carvalho GR, Hauser L (1994) **Molecular genetics and the stock concept in fisheries**. Ver. Fish Biol. Fish. 4: 326-350.

Castro JI, Woodley CM, Brudek RL (1999) **A preliminary evaluation of the status of shark species**. FAO Fisheries Technical Paper, 380: 1 - 72.

Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG, Hueter RE, Meekan MG, Motta PJ, Bowen BW, Karl SA (2007) **Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*)**. Molecular Ecology, 16:5183-5192.

Chapman DD, Pinhal D, Shivji MS (2009) **Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini***. Endangered Species Research. doi: 10.3354/esr00241.

Compagno LJV (1999) Appendix. **Checklist of living elasmobranchs**. In W. C. Hamlett, ed. **Sharks, skates and rays**. The biology of elasmobranch fishes. Johns Hopkins Press, 471-498.

Compagno LJV (2001) **Sharks of the World**. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). An annotated and illustrated catalogue of the shark species known to date. FAO Species Catalogue for Fisheries Purposes (1):1-269.

Compagno LJV FAO (1984) Species Catalogue. **Sharks of the World**. A, Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes. FAO Fish. Synop., 4(125): 251-655.

Daly-Engel TS, Seraphin KD, Holland KN, CoffeyJP, Nance HA, Toonen RJ, Bowen BW (2012) **Global phylogeography with mixed-marker analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*)**. Plos One, 7(1): e29986.

Duncan KM, Martin APB, Bowen W, De Couet HG (2006) **Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*)**. *Molecular Ecology* 15, 2239–2251.

Ebert DA, Compagno LJ (2007) **Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei)**. *Environ. Biol. Fish.*, DOI 10.1007/s10641-007-9247-0.

Edgar RC (2004) **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput** *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) **Arlequin ver. 3.1**: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.

FAO (2012) FishStat PC. **CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO Fisheries Department)**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Ferris SD, Berg WJ (1987) **The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management**. In: *Population Genetics and Fisheries Management* (Ryman, N. and Utter, F., eds.). University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 277-301.

Fu YX (1997) **Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection**. *Genetics*, 147: 915-925.

Hall TA (1999) **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

IBAMA (2009) **Proposta de plano de gestão para o uso sustentável do grupo de elasmobrânquios sobreexplotados ou ameaçados de sobreexploração no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília - DF. 30-34.

IUCN (2013) **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 September 2013.

Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN (2006) **An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA**. *Molecular Ecology Notes*. 6: 998–1002.

Karl SA, Charvet P, Castro, ALF, Lopez JA, Burgess, GH (2011) **Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA**. *Conservation Genetics*, 12(2): 371-382.

Keeney DB, Heist EJ (2006) **Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal**. *Molecular Ecology*. 15: 3669–3679.

Lack M, 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.

Lacy RC, Lindenmayer DA (1995) **A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum, *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in south-eastern Australia**. I. Demographic stability and population persistence. *Biological Conservation* 73:119-129.

Li WH, Graur D (1991) **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.

Librado P, Rozas J (2009) **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2011b) **Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark, *Rhizoprionodon porosus* (Poey 1861).** Reviews in Fish Biology and Fisheries 4:799-814.

Menezes NA, Buckuo PA, Figueiredo JL, Moura RL (2003) **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil.** São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 159.

Ortí G, Petry P, Porto JIR, Jégo M, Meyer A (1996) **Patternes of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas.** J Mol Evol. 42: 169-182.

Paternello T, Marcato S, Zane L, Varotto V, Bargelloni L (2003). **Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean.** Mol. Phylogenet. Evol. 28: 420-429.

Perdices A, Cunha C, Coelho MM (2004) **Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence.** Mol. Phylogenet. Evol. 31: 192-203.

Pereyra S, García G, Miller P, Oviedo S, Domingo A (2010) **Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*).** Fisheries Research. 106(3): 468-473.

Rand DM, Kann LM (1998) **Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA.** Genetica 102/103:393-407

Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW (2008) **Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*).** *Molecular Ecology*, 17(24) 5336-5348.

Soto JMR, Mincarone MM (2004) **Collections of the Museu Oceanográfico do Vale do Itajaí 1**. Catálogo f Cartilaginous Fishes (Myxini, Cephalaspidomorphi, Elasmobranchi, Holocephali). Maré Magnum 2 (1-2) 1-25.

Soto JMR, Nisa-Castro-Neto W (1993) **Sobre a presença de *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) no litoral do Rio Grande do Sul e Lagoa dos Patos**. In: Resumos da 6ª Reunião do Grupo de Trabalho sobre Pesca e Pesquisa de Tubarões e Raias no Brasil. Santos: IPESCA, 35.

Tajima F (1989) **Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism**. Genetics, 123, 585-595.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei, M, Kumar S (2011) **MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.

Tillett BJ, Meekan MG, Field IC, Thorburn DC, Ovenden, JR (2012) **Evidence for reproductive philopatry in the bull shark *Carcharhinus leucas***. The Fisheries Society of the British Isles, Journal of Fish Biology. 80, 2140–2158.

Toledo Filho S, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Galhardo E, Donola E (1992) **Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios**. São Paulo: USP, 1992. 39 p. USP.