

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* (Elasmobranchii,
Carcharhiniformes) no Atlântico Ocidental utilizando
marcadores moleculares do DNA mitocondrial.**

Fernando Fernandes Mendonça

Botucatu – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial.

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.

Aluno: Fernando Fernandes Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Prof. Dr. Otto Bismarck F. Gadig

**Botucatu – SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Mendonça, Fernando Fernandes.

Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial / Fernando Fernandes Mendonça. - Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Fausto Foresti

Co-orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Assunto CAPES: 20204000

1. Genética animal. 2. Tubarão – Pesca. 3. Recursos pesqueiros.

Palavras-chave: Conservação genética; Estrutura populacional; Identificação molecular de espécies; Recursos pesqueiros; *Rhizoprionodon*; Tubarões.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



UNESP



Instituto de Biociências



Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo

Agradecimentos

Acredito que são poucas as coisas na vida que se consegue sozinho. E cosegui-las, às vezes até que pode ser bacana! Já as coisas que se consegue junto... essas sim, trazem a satisfação da realização, são divisíveis, são as melhores, compartilháveis... são multiplicáveis!

O trabalho aqui apresentado é uma obra modesta... talvez nem seja “uma obra”. Mas, no decorrer de todo o seu desenvolvimento foram envolvidas tantas pessoas, dos mais diferentes modos, tantos ensinamentos, apoio, experiências diversas e tantas conquistas pessoais que, embora eu seja o maior dos ganhadores, acredito que os títulos, menções, glórias e o que ainda estiver por vir, não sejam apenas meus, mas de todos os que compartilharam comigo de alguma forma em qualquer momento de toda essa trajetória.

Registro alguns nomes, mas agradeço a todos os que estiveram presentes em cada um desses dias.

Ao professor Fausto Foresti, meu orientador. Mais do que agradecer, deixo registrada minha admiração a um incentivador quase sem limites. Muito obrigado pelos tantos ensinamentos profissionais e pessoais, por abrir tantos caminhos e por acreditar sempre em seus alunos. Ao amigo Fausto e também à sua esposa Miriam, muito obrigado pelo carinho, pela convivência e por me permitir ver sempre em vocês o anseio por minhas conquistas.

Ao Professor Otto Bismarck Gadig, meu co-orientador da UNESP de São Vicente, agradeço a amizade, cumplicidade e os muitos ensinamentos, apesar da distância. Muito obrigado pela confiança e por sempre me incentivar, até mesmo nos devaneios.

Ao Professor Claudio Oliveira, da UNESP de Botucatu, meu muito obrigado por estar sempre disposto a ajudar, ensinar e por ser o grande provedor indispensável a todos os alunos do laboratório. Obrigado por também ser meu orientador.

Ao Professor Fábio Porto Foresti, da UNESP de Bauru, obrigado pela amizade, pelo apoio e por compartilhar várias e boas experiências.

Ao Professor George Burgess, do Florida Program for Shark Research, Universidade da Flórida (FPSR), agradeço pela grande oportunidade de aprendizado, pela inestimável confiança e por possibilitar uma associação que certamente irá gerar grandes conquistas científicas.

Ao Professor Rui Coelho, do FPSR e do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, muito obrigado pela amizade e ajuda incondicional nas atividades de laboratório nos EUA e em Portugal e pelas oportunidades de trabalho conjunto que foram abertas. Agradeço ao Rui e também à sua esposa Joana, por todo o carinho e apoio em terras distantes.

Ao amigo Felipe Carvalho, pessoa fundamental desde os preparativos para o estágio na Universidade da Flórida e suporte para cada um dos desafios encontrados nos EUA, meu muito obrigado.

Agradeço a todos os servidores e amigos da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu por estarem sempre dispostos a ajudar e fornecer toda a estrutura burocrática necessária, muitas vezes indo bem além de suas obrigações.

Aos meus amigos irmãos Daniel Vidal, Paulo de Camargo, Ronald Ribeiro, Gustavo Sancinetti, Bruno De Franco e Leandro Agati, obrigado por todos os anos de amizade, apoio e incentivo. Vocês foram a minha família em Botucatu.

Aos amigos e colegas que pertencem ou pertenceram ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP - Botucatu e Laboratório de Genética de Peixes da UNESP

- Bauru, muito obrigado pela amizade, pelo excelente convívio em todos esses anos, pelo fundamental apoio técnico, teórico, filosófico, lúdico e improfícuo e pela imensa troca de experiências. Juntos formamos uma imensa e forte base, que sustenta individualmente a cada um de nós.

Agradeço à minha maior e mais forte base, Maíra Malta. Obrigado por cada dia ao seu lado, pelo apoio e incentivo constantes, por acreditar e apostar sempre nos meus sonhos e por fazer deles, nossos sonhos. Obrigado por cada gesto de carinho e por todo o amor com que estrutura nossas vidas. Obrigado pela Nanica e por nos fazer uma família feliz.

À minha mãe Cida, meu irmão Daniel, minhas irmãs Cintia e Karina e às famílias que construíram (Cristiano, Gilberto e filhos)... não há como descrever meus agradecimentos. Mas, sintetizando... obrigado pela vida que me deram.

Resumo

Os tubarões representam atualmente um importante recurso para a pesca mundial. No entanto, a falta de informações básicas tais como características populacionais, definições taxonômicas precisas e avaliações dos volumes capturados têm favorecido a contínua e intensiva exploração de espécies e populações que já podem estar apresentando declínios em níveis críticos para a manutenção da sustentabilidade. Pertencente à família Carcharhinidae, o gênero *Rhizoprionodon* é constituído por sete espécies de tubarões de pequeno porte distribuídas em praticamente todos os mares e devido seus hábitos associados às regiões costeiras, frequentemente representam uma grande parcela dos volumes desembarcados. Destas espécies, três apresentam-se distribuídas no Atlântico Ocidental (*R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii*) com ocorrências desde o Norte dos EUA até a América do Sul, onde a pesca tem sido intensa, principalmente no Brasil. No presente estudo, utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial, foram analisadas as estruturas populacionais das espécies *R. porosus* e *R. lalandii*, desde o Mar do Caribe até a região sul do Brasil, foi buscada a distinção espécie-específica entre *R. terraenovae* e *R. porosus* e foram desenvolvidos protocolos de identificação forense para espécies de tubarões amplamente explorados pela pesca na costa brasileira. Na análise utilizando sequencias da região controladora do mtDNA de amostras de *R. porosus* foram encontrados 53 haplótipos com forte estruturação populacional ($F_{ST}=0.271$, $P<0,0001$), caracterizando a existência de duas populações distintas, separadas pela Corrente Marítima do Equador. Entre os tubarões da espécie *R. lalandii* foram encontrados 30 haplótipos também com forte estruturação ($F_{ST}=0.254$, $P<0,0001$) entre as populações do Caribe e as demais populações da costa brasileira. Provavelmente em decorrência da influência de duas importantes correntes marítimas que atingem estas regiões, a corrente do Equador e das Falklands, três populações distintas puderam ser caracterizadas para esta

espécie. Nas análises buscando a definição taxonômica entre *R. terraenovae* e *R. porosus* utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I e da região controladora do mtDNA, foi observada uma forte consistência dos dados, caracterizando estes tubarões como espécies distintas e com distribuição possivelmente alopatrica. A sobreposição da distribuição geográfica entre estas espécies, se existente, deve ocorrer provavelmente em uma área restrita entre o Golfo do México e região norte da costa Caribenha. Para o desenvolvimento de metodologias genéticas de identificação de tubarões foram utilizadas as composições nucleotídicas do gene Citocromo Oxidase I e desenhados primers de reconhecimentos espécie-específicos, que utilizados em PCR-multiplex possibilitam a caracterização simultânea de 9 espécies pertencentes às ordens Carcharhiniformes e Lamniformes. Ainda, para as espécies *R. porosus* e *R. lalandii* também foi desenvolvido um método de identificação utilizando PCR-RFLP, como uma alternativa ao protocolo de PCR-multiplex. Estes trabalhos reunidos fornecem um panorama geral da filogeografia dos tubarões do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental e contribuem para a formulação de hipóteses de estruturação também para outras espécies de elasmobrânquios distribuídos ao longo desta mesma região. Do mesmo modo, o fato de se apresentar como um método de boa resolução e de baixo custo para a identificação das espécies, a aplicação da metodologia genética poderá se constituir numa importante ferramenta de avaliação da exploração pesqueira e auxiliar no desenvolvimento de planos de manejo e conservação das espécies e populações deste grupo de organismos.

Sumário

1 Introdução	9
1.1 Elasmobrânquios	9
1.2 Exploração pesqueira	10
1.3 Gênero <i>Rhizoprionodon</i>	13
1.4 Identificação de estoques e variabilidade populacional	15
1.5 Marcadores moleculares	19
1.6 Identificação molecular de espécies	21
2 Objetivos	25
3 Material e Métodos	26
3.1 Coleta de amostras	26
3.2 Protocolos moleculares e análises	27
4 Resultados	30
Cap. I Identificação das espécies de tubarões <i>Rhizoprionodon lalandii</i> e <i>R. porosus</i> (Elasmobranchii, Carcharhinidae) utilizando as técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP.	34
Cap. II Identificação genética de tubarões Lamniformes e Carcharhiniformes utilizando PCR-multiplex.	50
Cap. III Definição genética das espécies de tubarões do gênero <i>Rhizoprionodon</i> no Atlântico Ocidental usando o DNA mitocondrial.....	64
Cap. IV Filogeografia e estrutura populacional do tubarão <i>Rhizoprionodon porosus</i> (Poey, 1861).	87
Cap. V Diversidade e Estruturação populacional do tubarão <i>Rhizoprionodon lalandii</i> (Müller & Henle, 1839).	117
5 Considerações Finais	140
6 Referências	144

I Introdução

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). As espécies deste grupo de organismos estão distribuídas atualmente em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas, associados à ambientes pelágicos, demersais, recifais e até mesmo água doce. (Compagno 1990; Gruber 1990).

Os tubarões, Superordem Selachimorpha, geralmente apresentam corpo alongado e fusiforme, com nadadeiras peitorais destacadas da cabeça e cinco a sete pares de fendas branquiais situados nas laterais da cabeça. As raias, Superordem Batoidea, são caracterizadas pelo corpo achatado dorsoventralmente, com olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça (Compagno 1977, 1999). A boca é ventral e possuem cinco pares de aberturas branquiais na maioria das formas, localizadas também na superfície ventral. As relações evolutivas entre estas superordens ainda são incertas, havendo diferentes interpretações na literatura baseadas em caracteres morfológicos, estudos moleculares e citogenética convencional. Alguns destes trabalhos consideram o grupo das raias como grupo irmão dos tubarões e outros classificam as raias como um subgrupo pertencente ao dos tubarões modernos (Bigelow e Schroeder 1953; Compagno 1977; Stingo 1979; Dunn & Morrisey 1995; De Carvalho 1996; Peach & Rouse 2004; Rocco *et al.* 2007).

A biodiversidade dos elasmobrânquios, de uma forma geral, ainda é pouco conhecida. 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 e entre as raias são reconhecidas 5 ordens, 20 famílias e cerca 574 espécies (Compagno 1999, 2005). Em águas brasileiras são reconhecidas 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias marinhas (Menezes *et al.* 2003).

1.2 Exploração Pesqueira

Historicamente, o consumo da carne de tubarões e raias manteve-se quase que restrito às populações ribeirinhas até há poucas décadas atrás. Contudo, com a redução dos estoques pesqueiros das espécies mais tradicionais, o consumo deste tipo de carne passou a ser também difundido e apreciado. Outro fator de grande incentivo à pesca das espécies deste grupo é o consumo de nadadeiras de tubarões pelas populações da região asiática e, devido aos preços praticados no comércio internacional, tem promovido a captura de tubarões em praticamente todos os mares. Dados estatísticos sobre a exploração pesqueira da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) registraram no ano de 2007 a captura mundial de 781.000 toneladas de elasmobrânquios, sendo cerca de 496.000 toneladas de tubarões e 285.000 toneladas de raias. Segundo 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) e, a partir do ano 2000, 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).

Na costa norte brasileira, incluindo os Estados do Amapá e Pará, a pesca extrativa marinha representa cerca de 16% do desembarque total nacional, destacando-se o Pará como o segundo maior pólo de desembarque do país (IBAMA 2008). A captura de elasmobrânquios ocorre tanto nas pescarias costeiras quanto oceânicas e, segundo dados do Programa ESTATPESCA, a captura total chegou a mais de 5.000 toneladas de tubarões no ano de 2006 (IBAMA 2008).

A costa nordeste participa com cerca de 29% da produção da pesca extrativa marinha do Brasil, o que correspondeu a mais de 150.000 toneladas de pescado no ano de 2006, com destaque para os Estados do Maranhão, Ceará e Bahia (IBAMA 2008). Desde 1999 as informações sobre desembarques de elasmobrânquios na região nordeste têm sido registradas pelo Programa ESTATPESCA, onde constam as categorias “cação”, com um desembarque médio de 1.700 toneladas e “raia”, com um desembarque médio de 1.100 toneladas (IBAMA 2005).

A região sudeste-sul apresenta o maior volume de desembarque da pesca extrativa marinha do Brasil. Segundo dados do Programa ESTATPESCA, o volume de produção desta região ultrapassou a 280.000 toneladas no ano de 2006 (IBAMA 2008), correspondendo a mais de 54% da produção bruta nacional. A pesca artesanal apresenta-se bastante difundida na região, com um grande número de pontos de desembarque espalhados ao longo da costa, o que dificulta a realização de estatísticas precisas de desembarque, ou mesmo a fiscalização e controle da atividade pesqueira (Haimovici *et al.* 2006). Por outro lado, a pesca industrial concentra os desembarques em alguns importantes postos de comercialização, como Cabo Frio, Niterói e Angra dos Reis (RJ); Santos e Guarujá (SP); Itajaí e Navegantes (SC) e Rio Grande (RS). (Haimovici *et al.* 2006).

Segundo Lessa *et al.* (1999a), elasmobrânquios são capturados em praticamente todas as modalidades de pesca, tanto industrial quanto artesanal, com destaque para a pesca de espinhel (mono e multifilamento), rede de emalhe (de superfície e fundo) e arrasto de fundo com portas, além da captura tradicional de elasmobrânquios como fauna acompanhante de outras espécies com maior valor comercial. De modo geral, a pesca direcionada para este grupo tem aumentado devido principalmente à valorização de seus subprodutos no mercado nacional e internacional (SBEEL 2005).

Outra prática aplicada na pesca dos representantes deste grupo é o “finning”, infelizmente ainda de forma rotineira. Após a captura dos exemplares, são aproveitadas apenas as nadadeiras (barbatanas) do tubarão e descartado o restante do animal, o que tem contribuído de forma direta para a depleção dos estoques, além de causar um grande dano ecológico e desperdício econômico (Kotas *et al.* 2005; Travassos & Hazin 2005).

Associadas ao alto crescimento da pesca, características biológicas dos representantes deste grupo como grande longevidade, crescimento lento, maturação tardia e baixa fecundidade, conduzem os elasmobrânquios a um baixo nível de recrutamento e, conseqüentemente, aumentam a susceptibilidade de suas populações (Natanson & Cailliet 1986). 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).

Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade à exploração pesqueira da maioria das espécies de tubarões e raias (Castro *et al.* 1987; Camhi *et al.* 1998), trabalhos de controle e manejo das espécies deste grupo são raros, apresentando como maior entrave à formulação de dados estatísticos confiáveis a falta de informações básicas sobre capturas, desembarques 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 (Graham *et al.* 2001). Contudo, a estatística é incerta para diversas espécies e inexistente para muitas outras, em decorrência principalmente das similaridades morfológicas existentes entre as espécies e grupos, e também devido à prática de pesca onde, na maioria dos casos, são retiradas partes dos animais antes dos desembarques.

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 carcaças conhecidas como charutos, no caso dos tubarões. Esta prática interfere diretamente na identificação morfológica dos indivíduos impedindo a caracterização 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).

1.3 Gênero *Rhizoprionodon*

A Ordem Carcharhiniformes apresenta o maior número de gêneros, espécies, abundância e biomassa, sendo os membros da Família Carcharhinidae os que mais influenciam as atividades humanas (Compagno 1984). Como muitas das espécies atingem grande porte e são abundantes em águas tropicais e subtropicais, estes tubarões representam parte significativa da pesca mundial (produção de carne, óleo, couro, nadadeiras), bem como, para fins recreativos (pesca esportiva) e turísticos (mergulho e fotografia), o que resulta em alto valor econômico (Nelson 1990).

Pertencente à família Carcharhinidae, o gênero *Rhizoprionodon* Whitley (1929) é caracterizado pela presença de sulco labial superior desenvolvido, origem da segunda nadadeira dorsal sobre a metade da base da nadadeira anal e cristas pré-anais mais visíveis em exemplares adultos (Gadig 2001). É representado por sete espécies de pequeno porte (até cerca de 140 cm), com ampla distribuição nos mares tropicais e subtropicais do Pacífico, Índico e Atlântico. (Springer 1964; Compagno 1984). Habitam normalmente águas costeiras, sendo encontrados em baías, enseadas, passagens de ilhas e águas salobras (Gadig 1994). Devido a sua ampla distribuição e hábitos associados à região litorânea, as espécies de *Rhizoprionodon* desempenham papel central como predadores do sistema trófico costeiro. Contudo, são alvo de pescarias realizadas em várias partes do mundo.

Na costa brasileira são reconhecidas duas espécies, *Rhizoprionodon lalandii* (Müller & Henle 1839), observada na plataforma continental do Atlântico Ocidental, desde o Panamá (América Central) até o sul do Brasil e *Rhizoprionodon porosus* (Poey 1861), ocorrendo desde a costa do Caribe até o sul do Uruguai (Springer 1964; Figueiredo 1977). Segundo Gadig (2001) *R. porosus* e *R. lalandii*, junto com *Carcharhinus leucas* e *C. limbatus*, são as únicas espécies de tubarões no país que exibem um padrão tipicamente costeiro, apresentando distribuição contínua ao longo de toda a plataforma continental, não havendo aparente barreira zoogeográfica que interrompa sua distribuição. Conhecidos ao longo do litoral brasileiro como cações-frango ou rabo-seco, os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* constituem-se num importante recurso econômico para a pesca, onde representam cerca de 50 a 60% dos cações capturados em pescarias costeiras (Motta 2001).

Uma terceira espécie, *R. terraenovae* (Richardson 1836), ocorre na costa Atlântica oeste, no Hemisfério Norte, distribuindo-se à partir de Nova Brunswick até o Golfo do México, sendo muito semelhante a *R. porosus* na morfologia externa, padrão de coloração e tamanho máximo. Esta é a espécie de tubarão costeiro numericamente mais importante capturada no Golfo do México e região do Atlântico Norte Ocidental (Cody & Avent 1980; Grace & Henwood 1997; Castillogéniz *et al.* 1998).

Ainda hoje existe uma problemática envolvendo o status específico de *R. porosus* e *R. terraenovae*. Compagno, (1984) e Soto (2004), sugerem que *R. porosus* e *R. terraenovae* sejam a mesma espécie apresentando apenas uma variação clinal e desta forma, estariam sendo diferenciadas apenas com base na distribuição geográfica. Por outro lado, Gadig (2001) supõe que *R. terraenovae* possivelmente habite águas brasileiras, sendo os exemplares capturados identificados como *R. porosus* devido à falta de caracteres taxonômicos externos determinantes. Nas chaves para identificação a

diferenciação é feita basicamente pela contagem de vértebras pré-caudais (de 58 a 66 em *R. terraenovae* e de 66 a 75 em *R. porosus*) (Springer 1964; Compagno 1984) e não apresentam outras características consistentes para a separação das espécies.

1.4 Identificação de estoques e variabilidade populacional

A identificação e manutenção de estoques diferenciados são fundamentais para o setor pesqueiro, principalmente pela sua relação direta com a produtividade total e uso sustentável dos recursos (Carvalho & Hauser 1994), sendo um dos objetivos básicos para programas de controle e conservação de espécies em perigo, a conservação da variabilidade genética (Lacy & Lindenmayer 1995). Essa questão é especificamente relevante no ambiente marinho, onde as barreiras físicas parecem ser menos efetivas (Awise 1994; Palumbi 1994), sugerindo uma tendência à homogeneização genética (Ward *et al.* 1995; Levy & Cassano 1994; Bonhomme *et al.* 2002). Contudo, a premissa errônea de que populações marinhas são geneticamente uniformes, pode estimular a sobre-exploração, reduzir os níveis de variabilidade, diminuir a produção comercial total e eliminar estoques locais (Smith *et al.* 1990; Kuusipalo 1999).

Segundo Haig (1998), os métodos de conservação devem ser adotados com base na estrutura das populações. Se uma população é estruturada, sua diversidade deve ser localmente conservada visto que já devem existir adaptações locais que seriam perdidas se esta população fosse misturada com indivíduos de outras populações. No entanto, se a população é homogênea em todos os pontos de sua distribuição, então pode-se optar por concentrar os esforços de proteção desta espécie em uma determinada área e utilizar espécimes aí existentes como matrizes para re-colonização de outras áreas impactadas, quando houver necessidade.

A variabilidade e diferenciação populacional podem ser o resultado da atuação de vários fatores tais como seleção natural favorecendo genótipos ou alelos diferentes em cada subpopulação; processos aleatórios na transmissão dos alelos a cada geração (deriva genética); diferenças ao acaso nas frequências alélicas dos fundadores das subpopulações e fluxo gênico entre as subpopulações.

O fluxo gênico exerce influência importante na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto cada população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin 1993). O grau e a direção do fluxo gênico entre populações separadas podem agir como força poderosa atuando na manutenção ou na homogeneização das diferenças genéticas (Slatkin, 1987). Desse modo, na presença de fluxo gênico intenso, as populações tendem a evoluir conjuntamente, uma vez que a migração atua na homogeneização das frequências alélicas. Por outro lado, quando o fluxo gênico é restrito ou ausente, cada população tende a evoluir de maneira independente. Embora o fluxo gênico tenda a ser uma força homogeneizadora, ele também tem o potencial de promover divergências entre subpopulações através da criação e dispersão de combinações únicas de alelos (Slatkin 1987) atuando, assim, como uma força criadora.

Segundo Avise (1994), fatores intrínsecos das populações como o grau de fluxo gênico e sua estrutura genética, a mobilidade dos organismos e a existência de barreiras físicas ou ecológicas podem ser determinados, do mesmo modo que características comportamentais como filopatria, história de vida dos organismos, padrões de dispersão e fluxo gênico ligados ao sexo, influencia diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais, eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética e a distância geográfica entre as populações.

Mesmo considerando a crescente captura de tubarões determinada pela atividade pesqueira, com a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção e também a inexistência de mecanismos apropriados para o manejo sustentável das espécies mais exploradas, ainda são mundialmente pouco expressivos os estudos sobre a estrutura genética das populações destes peixes. Duncan *et al.* (2006) elaboraram um primeiro trabalho filogeográfico global para a espécie de tubarão *Sphyrna lewini*, onde foi observada uma forte descontinuidade populacional entre os oceanos. No entanto, o baixo número amostral analisado não possibilitou a determinação de estruturas populacionais intra-oceânicas. Outro ponto importante levantado por estes mesmos autores foi a possibilidade da ocorrência de uma espécie críptica no gênero *Sphyrna* na amostra do Oceano Atlântico. Para o tubarão *C. limbatus*, foi sugerida uma forte estruturação entre as populações do Atlântico Oeste (Golfo do México e Caribe) e populações do Atlântico Leste (África), oceanos Índico e Pacífico, com a existência de estoques reprodutores distintos (Kenney & Heist 2006). No entanto, esta hipótese foi formulada com base em amostra com pequeno número de indivíduos capturados na costa africana (n=8) e, desta forma, os haplótipos que poderiam ser correspondentes aos haplótipos do Atlântico Ocidental simplesmente não teriam sido amostrados. Neste mesmo trabalho também foi sugerida uma possível incerteza taxonômica entre *C. limbatus* e *C. tilstoni*.

Utilizando uma amostragem global do tubarão *Galeorhinus galeus* Chabot & Allen (2009) revelaram a existência de estrutura populacional para indivíduos amostrados em diferentes oceanos, sem, contudo avaliar as populações de forma restrita a cada um dos oceanos. Na análise de amostragem global do tubarão-baleia *Rhincodon typus*, não foram encontradas fortes restrições ao fluxo gênico entre os oceanos, tendo sido detectada apenas uma moderada diferenciação entre o Atlântico e o Índico (Castro *et al.* 2007).

Em avaliações de menor escala, Schultz *et al.* (2008) identificaram fortes restrições ao fluxo gênico em populações do tubarão-limão *Negaprion brevirostris* a partir de amostras coletadas no Brasil, Bahamas (Atlântico Oeste) e Guiné Bissau (Atlântico Leste). Neste estudo ficou evidente a estruturação entre as porções do leste e oeste do Oceano Atlântico, bem como de uma moderada diferenciação entre as amostras brasileiras coletadas no hemisfério sul e as amostras das Bahamas, coletadas no Caribe. E, de acordo com Chapman *et al.* (2009) em outro estudo realizado, *S. lewini* apresenta uma forte diferenciação no Atlântico, com estoques diferenciados para o Golfo do México, Caribe e América do Sul.

Um dos maiores obstáculos para obtenção dos dados sobre capturas e comercialização de tubarões em nível de espécie é a dificuldade de identificação morfológica dos espécimes. Espécies componentes de famílias economicamente importantes como Carcharhinidae e Lamnidae, por exemplo, podem diferir apenas minimamente em sua morfologia e são comumente confundidos (Castro 1993; Bonfil 1994; Castro *et al.* 1999). No contexto da exploração pesqueira é frequente que populações de espécies com características biológicas e de forma muito próximas, ocupem a mesma área geográfica durante a maior parte de seus ciclos vitais e sejam, em decorrência disto, exploradas em conjunto. Embora apresentem grandes semelhanças, cada espécie pode apresentar tolerâncias distintas aos fatores do meio ambiente, como particularidades essenciais dos membros de cada táxon. Contudo, para evidenciar diferenças entre os táxons (espécies, populações) é necessário primeiramente determinar o seu status específico e a falta de distinção entre os táxons pode levar a avaliações errôneas de biomassa a ser explorada, gerando riscos de sobre-exploração (Camhi *et al.* 1998).

A identificação das espécies que compõe um determinado recurso pesqueiro é imperativa não somente pela importância científica que representa, mas também do ponto

de vista da gestão do recurso, já que as espécies possuem características biológicas particulares como fecundidade, taxa de crescimento, tamanho de maturidade e outras características populacionais importantes (Lessa 1986). Resultados básicos de levantamentos faunísticos e estatísticos errôneos podem ser produzidos se diversas populações isoladas ou espécies distintas forem consideradas como uma única população.

1.5 Marcadores moleculares

Nos últimos anos um considerável aumento da aplicação de marcadores moleculares de DNA tem sido observado na análise de problemas relativos à genética de populações e à sistemática. Diversas técnicas de biologia molecular desenvolvidas estão atualmente disponíveis para a detecção de variabilidade genética, viabilizando a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia 1996; Sunnucks, 2000). A descoberta da utilidade do DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular no final da década de 70 (Awise *et al.*, 1979; Brown *et al.* 1979), produziu um grande impacto nos estudos moleculares de genética de populações e evolução. O mtDNA animal é uma molécula circular pequena, fechada covalentemente, com tamanho geralmente variável de 14 a 26 kb (Billington & Hebert 1991). Apresenta um conteúdo gênico altamente conservado, representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui ainda uma região de cerca de 1 Kb rica em sequências AT, denominada região controle (D-loop). Apesar de não codificante essa região é importante, pois contém os promotores de transcrição das cadeias leve e pesada, assim como a origem de replicação da cadeia pesada (Clayton 1982).

O mtDNA apresenta uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, cerca de 5 a 10 vezes superior à do DNA nuclear (Brown *et al.* 1979; Harrison 1989). Em primatas essa taxa foi estimada em 2% de divergência de sequências por milhão de anos. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que esse número pode variar entre diferentes regiões da molécula, entre diferentes táxons e até mesmo ao longo do tempo evolutivo em uma mesma linhagem (Avice 1991; Strauss 1999). Os peixes parecem apresentar uma taxa de substituição de nucleotídeos menor do que a dos vertebrados superiores (Kocher *et al.* 1989; Li 1993; Martin & Palumbi 1993). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a alta taxa evolutiva do mtDNA e entre elas estão a ineficiência dos mecanismos de reparo para corrigir as mutações que surgem durante a replicação, o relaxamento da restrição de função e/ou da seleção e a grande exposição do mtDNA a danos oxidativos.

A maioria das mudanças genéticas observadas no mtDNA deve-se principalmente à substituição de bases (em vertebrados, as transições são mais frequentes que as transversões); algumas envolvem pequenas adições/deleções de nucleotídeos e outras são causadas por diferenças no tamanho da molécula de mtDNA (Avice *et al.* 1987; Broughton & Dowling 1994). As diferenças de tamanho estão geralmente retritas à região controle da molécula (D-loop), devido à presença de sequências curtas de DNA repetidas em tandem nessa região (Clayton 1982; Hoelzel 1993).

O mtDNA fornece marcadores moleculares eficientes em análises intra e interespecíficas. Entre suas possíveis aplicações incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética intra e interespecífica (Avice 1986; Avice *et al.* 1987; Moritz *et al.* 1987; Beckenbach *et al.* 1990); análises de zonas de contato entre espécies (Ferris *et al.* 1983; Szymura *et al.* 1986) e de fluxo gênico (Brown & Chapman 1991; Ong *et al.* 1996; Sanetra & Crozier 2003); estudos de biogeografia histórica (Bermingham & Avice 1986; Sivasundar *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002) e de caracterizações de estrutura

populacional (Graves 1998; Stepien & Faber 1998; Pestano & Brown 1999), além do seu emprego crescente no campo da sistemática molecular, para inferência de relações filogenéticas (Alves-Gomes *et al.* 1995; Alves-Gomes 1998; Ortí *et al.* 1996; Saitoh *et al.* 2003; Thacker 2003) e em estudos de conservação (Beheregaray *et al.* 2003; Li *et al.* 2005).

1.6 Identificação molecular de espécies

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

Essa atribuição de um nome não constitui uma simples aplicação de regras de nomenclatura, mas sim a elaboração de uma hipótese segundo a qual um determinado conjunto de caracteres (usualmente morfológicos) é capaz de identificar uma entidade (espécie) com características biológicas próprias e história evolutiva independente das de outras entidades biológicas similares. Essas hipóteses podem ser testadas de diversas maneiras e, como todas as hipóteses, também podem ser refutadas. Adicionalmente, quando as descrições de espécies são baseadas em uma ampla base de dados, elas se tornam hipóteses científicas interessantes, permitindo a elaboração de predições explícitas sobre os atributos dos organismos (Lipscomb *et al.* 2003).

Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies, simplesmente pelo fato de que foram os primeiros disponíveis

aos pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o desenvolvimento de novas abordagens de estudos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade. Há aproximadamente 30 anos, a análise de sequências de genes de DNA ribossômico foi utilizada para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (Woese & Fox 1977) e as pesquisas em DNA mitocondrial dominaram a Sistemática Molecular no final da década de 70 e início da década de 80 (Avice, 1994). E hoje constituem um dos principais sustentáculos desse tipo de investigação, com várias revistas dedicadas exclusivamente a esse campo como *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *Molecular Biology and Evolution* e *Journal of Molecular Evolution*.

Entre os dados moleculares utilizados em estudos de taxonomia e sistemática tem-se as análises citogenéticas, bioquímicas, as isozimas, dados imunológicos e, mais recentemente, as sequências de nucleotídeos (Hillis *et al.* 1996). Nos estudos taxonômicos, essas ‘novas’ categorias de dados têm sido sempre adicionadas aos dados morfológicos, nunca pretendendo substituí-los. Exemplos desse tipo de integração são cada vez mais comuns, como na descrição de *Gymnotus sylvius* (Albert *et al.* 1999), a descrição de uma nova espécie de tainha *Mugil rubrioculus* (Harrison *et al.* 2007) e a descrição da nova espécie de *Moenkhausia forestii* (Benine *et al.* 2009). Esses exemplos são particularmente relevantes, pois são referentes a novas espécies de gêneros de peixes bastante complexos, que foram descritas após o acúmulo de evidências citogenéticas e moleculares que demonstravam a singularidade das amostras em estudo com relação a seus respectivos congêneres. Entre os elasmobrânquios, análises populacionais de uma suposta única espécie de cação-anjo *Squatina argentina* utilizando isozimas revelaram a existência de um complexo de três espécies, possibilitando a descrição das duas novas, 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 cerca de 700 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI), seria suficiente para identificar muitos metazoários a nível de espécie (Hebert *et al.* 2003a, 2003b). O uso dessa metodologia, denominada *DNA barcode*, ganhou relevância com a criação em 2004 do *Consortium for the BarCode of Life* (CBOL), cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra da biodiversidade global, utilizando sequências parciais de DNA do gene COI, com o objetivo de facilitar o processo de automação na identificação das espécies (ver o sítio www.barcoding.si.edu para maiores detalhes). Como pode ser observado na literatura, outros segmentos gênicos também têm sido sugeridos para esse mesmo fim, como os genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo *b* (Vences *et al.* 2005) entre outros (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.

Essencialmente, o que os usuários da metodologia de *DNA barcode* pretendem é tornar possível a atribuição de indivíduos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (Moritz e Cicero 2004). Os primeiros estudos realizados com essa metodologia foram extremamente satisfatórios, com um grau de resolução taxonômica maior que 95% (Hebert *et al.* 2003a, 2003b). DeSalle *et al.* (2005) propõem que deve haver uma ponte entre as pesquisas moleculares e morfológicas e desta forma gerar o aprimoramento do processo de identificação de espécies. Isso também deve ampliar nosso conhecimento sobre a diversidade de mecanismos envolvidos na origem dessas espécies, sendo de suma

importância a condução destes trabalhos por especialistas em Biologia Molecular e Taxonomia.

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 proteção governamental e ainda 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 (Sebastian *et al.* 2008; Blanco *et al.* 2008; Clarke *et al.* 2006; Shivji *et al.* 2002).

2 Objetivos

Considerando a relevância dos tubarões em um contexto ecológico geral e também sua importância mundial atual como um recurso econômico, que gerariam a urgente necessidade da formulação de medidas de conservação, este trabalho buscou, de modo geral, desenvolver mecanismos de identificação forense de espécies deste grupo de organismos exploradas vigorosamente pela pesca, auxiliar na definição taxonômica do gênero *Rhizoprionodon* e fornecer dados a respeito da dinâmica populacional das espécies *R. porosus* e *R. lalandii* utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial. Tais estudos poderão resultar em informações de interesse para a melhor identificação das espécies e, deste modo, auxiliar na produção de estatísticas pesqueiras mais realistas, na caracterização das populações existentes e na delimitação de áreas prioritárias para programas de conservação e manejo.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram listados os objetivos específicos:

- desenvolver marcadores moleculares de baixo custo para a identificação genética de espécies de tubarões;
- auxiliar na definição taxonômica das espécies *R. terraenovae* e *R. porosus*, bem como na caracterização da possível ocorrência de *R. terraenovae* na América do Sul, utilizando sequências nucleotídicas mitocondriais;
- identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos de DNA mitocondrial que formam os estoques das espécies do gênero *Rhizoprionodon* ao longo do ecossistema estudado e propor uma hipótese filogeográfica, estabelecendo as relações entre as populações;
- gerar subsídios para programas de manejo adequado e exploração sustentável dos estoques pesqueiros de espécies de tubarões do Atlântico, na costa brasileira.

3 Material e Métodos

Neste tópico estão apresentadas as descrições gerais dos procedimentos empregados no desenvolvimento dos protocolos de identificação genética de espécies de tubarões, na caracterização do *status* taxonômico entre *R. porosus* e *R. terraenovae* e nos estudos populacionais de *R. lalandii* e *R. porosus*. Estas diferentes abordagens estão dispostas em capítulos e apresentam em cada um deles, no item “Material e Métodos”, a descrição completa dos procedimentos específicos.

3.1 Coleta de amostras

As amostras de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* utilizadas para os estudos populacionais foram obtidas na costa brasileira desde a região de Rio Grande no Estado do Rio Grande do Sul até o município de Bragança, no Estado do Pará (481 amostras). No Caribe foram obtidas 78 amostras em regiões costeiras da Venezuela e nos EUA foram amostrados 64 espécimes no Golfo do México e regiões do Leste da Flórida. Para os estudos de identificação genética foram analisadas cerca de 500 amostras de 25 espécies de tubarões coletadas em diferentes regiões da costa brasileira, sobretudo no Rio Grande do Sul, São Paulo e Pará. As identificações morfológicas foram realizadas de acordo com Gadig (2001) e Garrick (1982). As amostras foram conservadas em etanol a 95%, catalogadas e depositadas na Coleção do Laboratório de Biologia e Genética (LBP), credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. Alguns exemplares inteiros também permanecem depositados nesta mesma coleção e na coleção do Florida Museum of Natural History da Universidade da Florida - USA. A amostragem de tubarões utilizada neste trabalho foi obtida junto aos pescadores de frotas industriais e artesanais no Brasil e Venezuela a partir de animais já

abatidos. As amostras coletadas nos EUA foram obtidas em trabalho de campo, utilizando rede de emalhe e após a captura e obtenção de fragmentos de tecido das nadadeiras, os indivíduos vivos, em sua maioria, foram devolvidos ao mar.

3.2 Protocolos moleculares e análises

Para a extração do DNA genômico foram utilizados pequenos fragmentos de tecido retirados de nadadeiras, tecido muscular ou branquial e aplicada a metodologia descrita por Aljanabi *et al.* (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio. Em seguida o DNA purificado foi ressuspensionado em água ultrapura autoclavada.

No desenvolvimento de marcadores moleculares aplicados à identificação de espécies, foi utilizado um fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) com 664 pares de bases (pb) analisáveis. Para as análises populacionais utilizou-se um fragmento da região controladora do DNA mitocondrial, que variou entre 792 pb para a espécie *R. lalandii* e 802 pb para *R. porosus*. Para a análise de distinção taxonômica entre *R. terraenovae* e *R. porosus* foram utilizados estes mesmos dois fragmentos mitocondriais. Todas as reações foram realizadas utilizando os aparelhos termocicladores MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Pro e Veriti 96 Applied Biosystems. Após eletroforese em gel de agarose 1-2%, os fragmentos amplificados foram corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à reação de sequenciamento, purificação e aplicados nos sequenciadores automáticos ABI Prism 3700 Perking-Elmer e ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. Todas as sequências deste estudo foram obtidas com no mínimo uma réplica, sendo consideradas satisfatórias apenas as que apresentaram alta qualidade nos picos de eletroferograma.

Para o método de identificação genética de espécies foram desenvolvidos ensaios de PCR-multiplex e PCR-RFLP a partir da composição nucleotídica do gene Citocromo Oxidase I. Para a PCR-multiplex foram identificados os sítios polimórficos existentes entre as espécies e desenhados os primers de reconhecimento espécie-específico compatíveis para a aplicação simultânea na mesma reação de PCR. Para a PCR-RFLP, a composição nucleotídica do gene COI foi analisada utilizando o programa NEBcutter V2 (Vincze *et al*, 2003) para a seleção das enzimas de restrição que apresentaram sítios de reconhecimento distintos entre as espécies. Em seguida, o método foi avaliado pela amplificação do gene, seguido da reação de restrição enzimática. Para a definição taxonômica entre *R. terraenovae* e *R. porosus* foram avaliadas as composições nucleotídicas relativas, números de sítios polimórficos, diversidades haplotípicas e nucleotídicas entre as espécies e a história evolutiva dos haplótipos. Nas análises populacionais foram utilizados os métodos padrões de edição de sequências, estimativas de variabilidade genética e seu particionamento, testes de expansão populacional e análises filogeográficas. Nestas análises foram avaliadas as subdivisões das variações genéticas utilizando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*. 1992). Para a análise de estruturação populacional, segundo Wright (1978) os valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 configuram uma baixa estruturação genética, entre 0,05 e 0,15 estruturação moderada, entre 0,15 e 0,25 alta e acima de 0,25 uma forte estruturação genética.

Para avaliar a história demográfica de *R. porosus* foi realizado o teste de distribuição das diferenças genéticas entre os pares de haplótipos de acordo com o modelo de expansão súbita (Mismatch distributions). Para o cálculo do tempo t decorrido desde a expansão, empregou-se a formula $t=\tau/2u$, onde t é o tempo decorrido desde o evento de expansão e u é a taxa global de evolução do haplótipo. Para estimar u multiplica-se a taxa de mutação por sítio por ano pelo número de nucleotídeos da molécula. Para o cálculo do

tamanho populacional das fêmeas antes da expansão é utilizada a fórmula $Ne_0 = \theta_0/2u$ e para o cálculo do tamanho populacional após a expansão usa-se $Ne_1 = \theta_1/2u$. A taxa de mutações empregadas para a região controle foi de 0.8% por milhão de anos, de acordo com Duncan *et al.* (2006).

4 Resultados

Os estudos buscando o desenvolvimento de marcadores genéticos para a identificação de espécies de tubarões, a definição do *status* taxonômico entre as espécies *R. terraenovae* e *R. porosus* e a caracterização filogeográfica de *R. lalandii* e *R. porosus* foram organizados em 5 manuscritos dispostos em capítulos que compreendem uma base teórica e a justificativa do trabalho, as metodologias e materiais empregados, seus respectivos resultados e as discussões, incluindo hipóteses científicas e algumas sugestões para auxiliar no desenvolvimento de programas de exploração sustentável, manejo, fiscalização da pesca e conservação de tubarões.

4.1 Capítulo I

A proposta de trabalho inicial do doutoramento abrangia prioritariamente os estudos de avaliação da estrutura populacional das espécies *Rhizoprionodon porosus* e *Rhizoprionodon lalandii* na costa brasileira. Durante os trabalhos de coleta, era bastante freqüente a perda de material biológico devido à prática pesqueira de retirada de partes dos animais, resultando na falta de caracteres morfológicos utilizados para distinguir estas duas espécies. Buscando uma alternativa para a identificação foi desenvolvido o trabalho: **“Identificação das espécies de tubarões *Rhizoprionodon lalandii* e *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) utilizando as técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP”**.

4.2 Capítulo II

A obtenção de exemplares de outras espécies de elasmobrânquios durante as atividades de campo impulsionou o desenvolvimento de novos trabalhos de pesquisa. No

entanto, foi observado que além da nossa própria dificuldade de identificação dos tubarões desembarcados, existia também uma grande lacuna nas estatísticas de pesca causada principalmente pelas dificuldades na identificação dos exemplares em nível específico. Assim, marcadores de identificação genética de outras espécies foram criados e apresentados no manuscrito “**Identificação genética de tubarões Lamniformes e Carcharhiniformes utilizando PCR-multiplex**”.

4.3 Capítulo III

A definição do status taxonômico de *R. terraenovae* e *R. porosus* como espécies distintas, bem como a avaliação da ocorrência de *R. terraenovae* nas regiões norte e nordeste do Brasil eram necessárias. Assim, no ano de 2009, coletas de amostras da espécie *R. terraenovae* foram realizadas na região do Estado da Flórida nos EUA, possibilitando o desenvolvimento do trabalho “**Definição genética das espécies de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental usando o DNA mitocondrial, com comentários sobre a variação geográfica e distribuição**”.

4.4 Capítulo IV

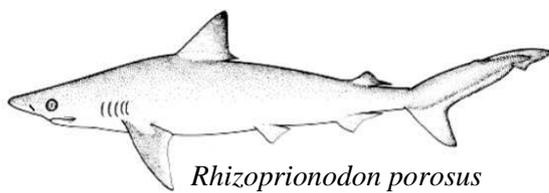
Estando definida a identidade específica de *R. porosus* e sua distribuição desde o Caribe até a região sul da América do Sul, foi redigido o manuscrito “**Filogeografia e estrutura populacional do tubarão *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861)**”.

4.5 Capítulo V

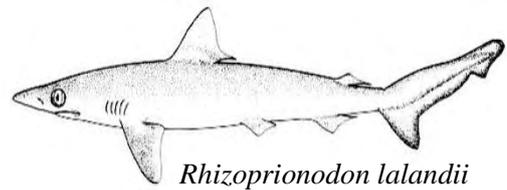
Com dados sobre a dinâmica populacional *Rhizoprionodon lalandii* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, além do Caribe, o manuscrito “**Diversidade e Estruturação populacional do tubarão *Rhizoprionodon lalandii* (Müller & Henle, 1839)**”.

complementa as informações a respeito da filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental.

Capítulo I



Rhizoprionodon porosus



Rhizoprionodon lalandii

Identificação das espécies de tubarões *Rhizoprionodon lalandii* e *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) utilizando as técnicas de PCR-multiple:

RFLP.

Molecular Ecology Resources (2009) DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02524.x

Manuscrito recebido pela revista em setembro de 2008 e aceito em novembro de 2008.

Resumo

Por ocuparem uma grande área de distribuição e possuírem hábitos associados à região litorânea os tubarões das espécies *Rhizoprionodon lalandii* e *R. porosus* são frequentemente alvos das pescarias costeiras. Contudo, as dificuldades na identificação morfológica dos representantes do gênero, associada à prática bastante usual de remoção da cabeça e das nadadeiras dos animais, na maioria das vezes antes mesmo do desembarque, têm resultado em uma escassez de informações sobre captura e comercialização, dificultando a avaliação de seus efeitos na conservação destas espécies. O objetivo do presente estudo foi desenvolver ferramentas práticas para a distinção destas duas espécies, mesmo na ausência de caracteres morfológicos, utilizando as técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP. A partir da composição nucleotídica do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram desenvolvidos primers de reconhecimento espécie-específicos que em reação de PCR-multiplex produzem fragmentos de tamanhos distintos para cada espécie. Foram também determinadas as enzimas de restrição que produzem fragmentos de DNA do gene COI com tamanhos distintos entre as duas espécies. Tais técnicas, além de se mostrarem extremamente eficazes, de fácil aplicabilidade e baixo custo constituem uma forma segura da estimativa da exploração pesqueira dessas espécies e sua ordenação.

Introdução

Pertencente à ordem Carcharhiniformes, família Carcharhinidae, os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* (Whitley 1929) possuem ampla distribuição e hábitos associados à região litorânea, desempenhando papel central como predadores do sistema trófico costeiro e importante recurso para a exploração pesqueira em diversas partes do mundo. Na costa brasileira é comumente registrada a ocorrência de duas espécies deste gênero, *Rhizoprionodon lalandii* (Müller & Henle 1839), observado na plataforma continental do Atlântico Ocidental desde o Panamá na América Central até o sul do Brasil e *Rhizoprionodon porosus* (Poey 1861), com ocorrência registrada desde o Caribe até o sul do Uruguai (Springer 1964; Figueiredo 1967). Mesmo com as evidências levantadas em diversos trabalhos relacionando os aspectos morfológicos de diferenciação entre estas duas espécies (Pantano & Souza 1999; Lima *et al.* 1997; Cavalcante *et al.* 1996; Gomes & Siqueira 1995; Cunha & Gomes 1994), a distinção entre eles é dificultada por características morfológicas bastante semelhantes, principalmente quando se trata de indivíduos neonatos e jovens (Figueiredo 1967). Segundo Sadowski (1967) e Ferreira *et al.* (2003) cerca de 50% de todos os elasmobrânquios capturados na costa brasileira correspondem à espécie *R. lalandii* e *R. porosus*, embora estes dados não sejam oficiais sendo os espécimes registrados apenas como “cação”.

Considerando a grande similaridade morfológica entre diversas espécies de tubarões, além da prática bastante usual da remoção de partes dos animais tais como as nadadeiras e cabeça antes dos desembarques e o reconhecimento de que diferentes espécies respondem de forma particular aos processos de exploração, torna-se de fundamental importância a elaboração de ferramentas práticas de identificação ao seu menor nível taxonômico. Assim, utilizando as técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP para gerar marcadores moleculares do DNA mitocondrial, foram elaborados e aplicados

dois métodos de distinção genética entre as espécies *Rhizoprionodon porosus* (Caribbean sharpnose shark) e *Rhizoprionodon lalandii* (Brazilian sharpnose shark).

Material e Métodos

Caracterização das amostras

As amostras foram obtidas junto às colônias de pescadores que praticam a pesca artesanal em alguns pontos da costa brasileira. Dentre as amostras de *Rhizoprionodon lalandii*, 12 são provindas das proximidades do município de Itanhaém (S 24°11'01" - W 046°47'18"), 10 da região de Praia Grande (S 24°00'35" - W 46°24'45") e 20 da região de Ubatuba (S 23°26'15" - W 45°03' 45"). Dentre as amostras de *R. porosus*, 6 foram coletadas na região de Ubatuba, 4 foram coletados na região de Aracajú (S 10°59'53" - W 37°02'33"), 16 foram coletadas na região de Natal (S 5°48'16" - W 36°10'38") e 18 são provenientes das proximidades de Fortaleza (S 3°41'91" - W 38°34'19"), totalizando 86 amostras. Buscou-se obter amostras de localidades diversas para que possíveis polimorfismos populacionais pudessem ser detectados.

Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.

O DNA genômico foi extraído a partir de células do epitélio branquial, utilizando a metodologia descrita por Aljanabi *et al.* (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio. Reações de amplificação do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram efetuadas em ciclador térmico de PCR utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima *Taq* Polymerase (Invitrogen) e 100 ng de primers, utilizando os primers universais F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG

AAT CA -3', descritos por Ward *et al.* (2005). Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos, com 35 repetições. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

As sequências do gene COI foram obtidas utilizando o ABI Prism 3700 (Perking-Elmer) com o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), sendo em seguida analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW - Macvector 65 (1998) para identificação de sítios polimórficos entre as espécies.

PCR-Multiplex

A partir da composição nucleotídica do gene COI foram identificados os sítios polimórficos existentes entre as espécies e desenhados os primers de reconhecimento espécie-específicos, sendo o primer para a identificação de *R. lalandii* 5' -TCA ACC TGG ATC TCT TTT AGG T - 3' e o primer para *R. porosus* 5' - TAC CCC CCA TTA GCT AGT AAT A - 3'. A eficiência dos primers foi testada primeiramente em reação de amplificação contendo o primer forward universal como controle interno da reação, o primer reverse universal e o primer para *R. lalandii* ou o primer para *R. porosus*. Todas as amplificações foram efetuadas em ciclador térmico de PCR utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polymerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima *Taq* Polymerase (Invitrogen) e 100 ng de cada primer. Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos, com 35 repetições.

Após confirmada a especificidade dos primers para a espécie *R. lalandii* e para *R. porosus*, avaliou-se a eficiência das reações de PCR-multiplex utilizando os 4 primers simultaneamente (forward e reverse universais e primers espécie-específicos) para a distinção das espécies em uma única reação, seguindo-se as mesmas condições descritas acima. A exatidão e confiabilidade da PCR-multiplex com 4 primers foi testada, tendo-se avaliado seu desempenho em testes cegos utilizando amostras de tecidos identificadas apenas pelo gênero, seguida posteriormente pela identificação morfológica (*R. lalandii* n=40 e *R. porosus* n=40).

Para garantir a especificidade dos primers desenvolvidos, as sequências de *R. lalandii* e *R. porosus* foram analisadas quanto à similaridade nucleotídica, com outras 18 espécies de tubarões das famílias Carcharhinidae (8sp), Lamnidae (4sp), Sphyrnidae (1sp), Squatinidae (1sp), Dalatiidae (1sp), Ginglymostomidae (1sp), Scyliorhinidae (1sp) e Triakidae (1sp) existentes no banco de tecidos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do IB/UNESP.

PCR-RFLP

Após o sequenciamento, a composição nucleotídica do gene COI foi analisada utilizando o programa NEBcutter V2 (Vincze *et al.* 2003) para a seleção das enzimas de restrição que apresentaram sítios de reconhecimento distintos entre as duas espécies. Em seguida, o método foi avaliado pela amplificação do gene, seguido de reação enzimática contendo 5 µl de produto de PCR, 1 unidade de enzima, 1µl de tampão 1x e água Milli-Q q.s.p. 10 µl e mantidas à 37° C durante 4 horas. A eficácia do método foi avaliada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. A amostra foi composta por 24 espécimes de *R. lalandii* e 26 de *R. porosus*.

Resultados

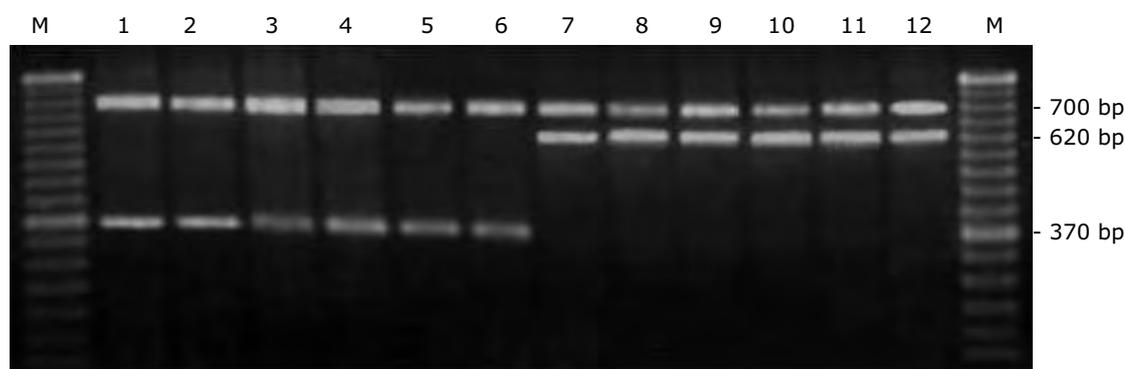
PCR-multiplex

Os locais de reconhecimento para ambos os primers forward espécie-específicos foram posicionados internamente aos primers forward e reverse de reconhecimento universal, de forma a gerarem dois fragmentos de tamanhos diferentes em cada reação de PCR. Desta forma as reações de PCR que continham amostras de DNA da espécie *R. lalandii* geraram um fragmento com cerca de 700 bp e um segundo fragmento com aproximadamente 610bp, sendo este característico e diagnóstico da espécie. As reações de PCR contendo amostras de DNA de *R. porosus* também geraram um fragmento característico dos primers universais e uma segunda banda com cerca de 370bp diagnóstica da espécie.

A especificidade dos primers foi confirmada em reações de PCR que continham, além dos primers universais, apenas um dos primers espécie-específicos em cada tubo. Estas reações foram realizadas com amostras de DNA de ambas as espécies. Após corrida eletroforética, as amostras que continham o primer específico para *R. lalandii* e amostras de DNA desta espécie apresentaram a banda de confirmação positiva da reação (700bp) e a banda característica da espécie (620bp). As reações que continham o primer para identificação de *R. lalandii* e amostras de DNA de *R. porosus* apresentaram apenas a banda positiva da reação. Da mesma forma ocorreu com as reações que continham o primer para *R. porosus*, observando-se a presença da banda de confirmação positiva da reação e a banda característica da espécie (370bp). Combinando os dois primers de reconhecimento espécie-específico, além dos primers universais para o gene COI, em reação de PCR-multiplex obteve-se por cada amostra, além da banda de confirmação

positiva da reação, uma banda de tamanho correspondente a uma das espécies, sendo 370bp para *R. porosus* e 620bp para *R. lalandii* (Figura 1).

Figura 1. Amplificação dos fragmentos de controle da reação (cerca de 700 bp), fragmentos específicos de *R. porosus* (1 a 6 – aproximadamente 370 bp) e fragmentos específicos de *R. lalandii* (7 a 12 – aproximadamente 620 bp). M – marcador de peso molecular 50 bp.

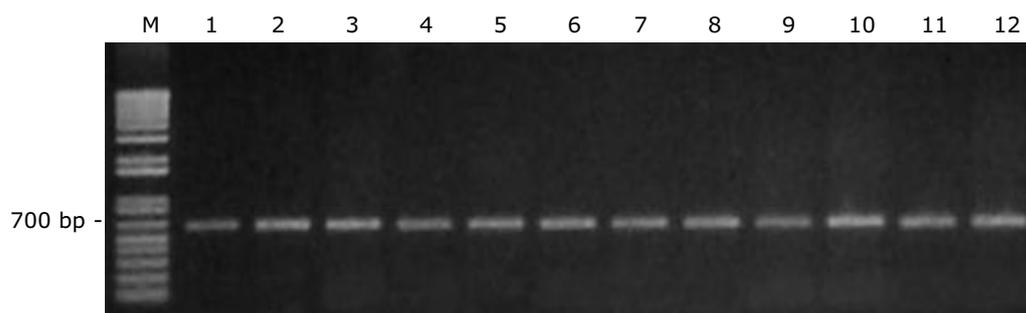


Nas análises comparativas entre as 18 espécies de tubarões para avaliar as similaridades entre as sequencias do gene COI e a ocorrência de falsos positivos nas reações de identificação de *R. porosus* e *R. lalandii* por PCR-multiplex, observou-se uma alta diversidade nucleotídica com $P_i=0,162$. Os testes de avaliação de confiabilidade utilizando os primers espécie-específicos em reações de PCR com as amostras das demais espécies não produziram bandas de amplificação.

PCR-RFLP

As reações de amplificação em amostras de *R. lalandii* e *R. porosus* foram verificadas após corrida eletroforética para confirmar os padrões de bandas obtidos. Em ambas as espécies observou-se a amplificação de fragmentos com cerca de 700bp (Figura 2).

Figura 2. Amplificação do gene COI em exemplares de *R. porosus* – 1 a 6 e *R. lalandii* - 7 a 12; M – Marcador de peso molecular 1kb.



Nas análises das sequências do gene COI não foram observadas variações nucleotídicas intra-específicas e apenas 19 sítios polimórficos foram identificados entre as espécies. A avaliação para a reação de restrição buscou caracterizar as enzimas que produziriam cortes no fragmento de DNA em apenas uma das espécies. Assim, foram encontradas 17 enzimas de corte em *R. porosus* e 14 enzimas de corte no gene COI para a espécie *R. lalandii* (Figura 3). Uma destas reações é mostrada na Figura 4.

Figura 3. Representação das sequências do gene COI em *R. lalandii* e *R. porosus* com as posições dos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição distintas entre as espécies. Em negrito a enzima *AlwFI*, utilizada na reação exemplificada na figura 5.

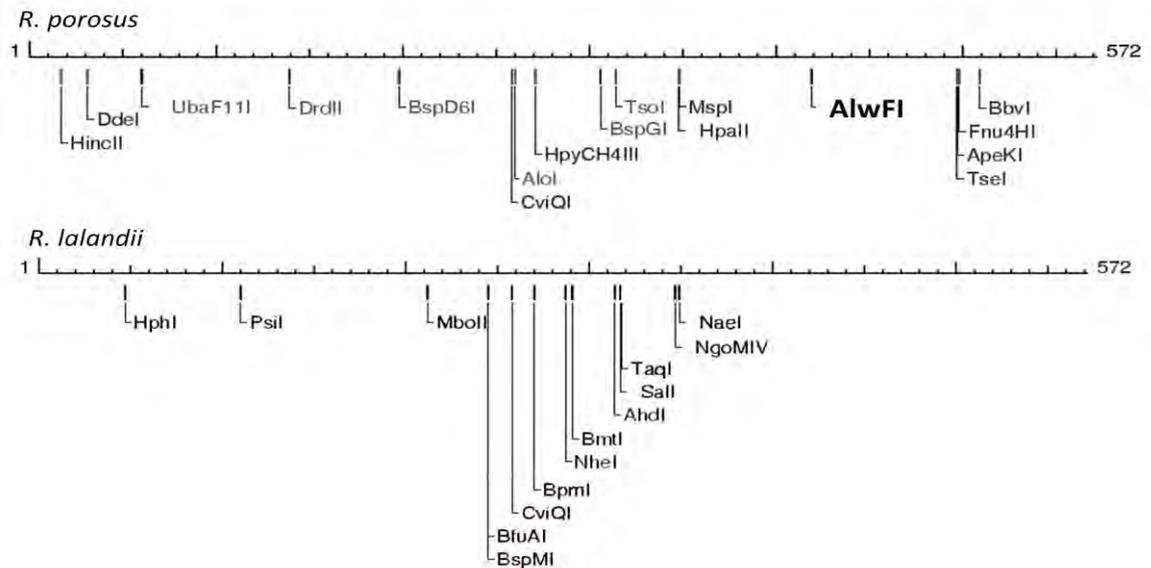
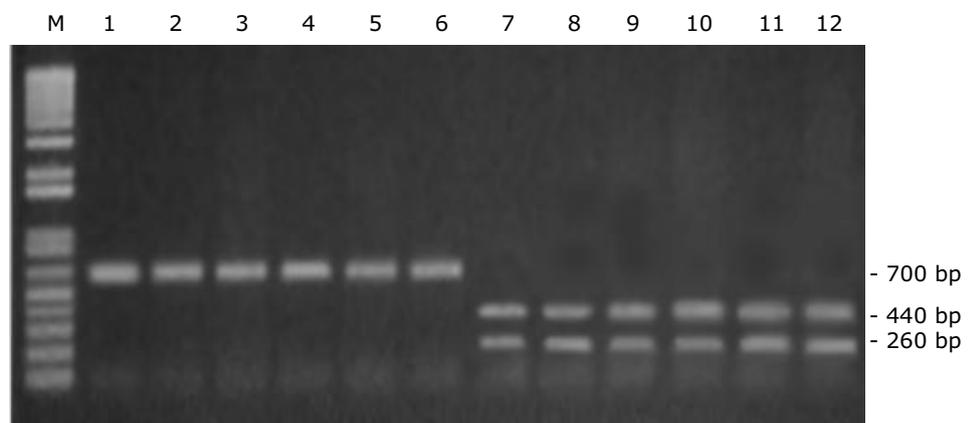


Figura 4. Digestão enzimática (*AlwFI*) do gene mitocondrial COI em exemplares de Brazilian sharpnose shark - 1 a 6 e Caribbean sharpnose shark - 7 a 12; L - Marcador de peso molecular 1kb.



Discussão

Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade à exploração pesqueira da maioria das espécies de tubarões (Camhi *et al.* 1998; Castro *et al.* 1987) e sobre a notória prática extremamente predatória do *finning* (remoção das nadadeiras e descarte dos tubarões ao mar) perpetuada em todo o mundo, trabalhos de controle e manejo da exploração das espécies deste grupo são raros, tendo como o maior entrave a falta de informações básicas sobre captura, desembarque e comercialização. Essa escassez de dados é gerada principalmente pela ineficiência na identificação da maioria das espécies pescadas.

As duas metodologias apresentadas neste trabalho caracterizaram-se pela fácil aplicabilidade, baixo custo e precisão nos dados. Contudo, pode-se notar algumas diferenças relevantes para a sua aplicação. A metodologia de PCR-multiplex parte da síntese de um primer espécie-específico que permite a inclusão de novos primers para a identificação simultânea de outras espécies, apresentando resultados após simples reação de PCR. Outra característica deste marcador é que torna-se dispensável o conhecimento prévio do grupo ao qual a amostra pertence. Quanto à metodologia de PCR-RFLP, uma desvantagem seria a necessidade de se conhecer o gênero originário da amostra, embora sua aplicação possa ser feita com o uso de reagentes comuns encontrados nos laboratórios de biologia molecular. Devido à utilização de enzimas de restrição as reações de PCR-RFLP, podem apresentar um custo um pouco mais elevado, quando comparadas com as de PCR-multiplex.

Embora tais métodos sejam baseados em mutações discretas que poderiam ser sujeitas a variações intra-específicas, nenhum sinal polimórfico foi detectado nos sítios utilizados para ativação dos primers ou das enzimas, reafirmando sua especificidade.

O desenvolvimento de marcadores moleculares de baixo custo aplicados na identificação de espécies comerciais tem se mostrado extremamente eficientes, viabilizando o controle da exploração e manejo adequado de populações. Trabalhos recentes que buscaram desenvolver e aplicar marcadores moleculares para a identificação de peixes marinhos ressaltam sua validação na aplicação forense e identificação de produtos processados utilizando as metodologias PCR-multiplex e PCR-RFLP (Pank *et al.* 2001; Clark *et al.* 2006; Gagnaire *et al.* 2007).

Nossos resultados demonstraram a primeira prática viável de identificação de tubarões da costa brasileira pela técnica de PCR-multiplex e PCR-RFLP, representando uma nova forma de análise e geração de dados sobre a exploração pesqueira de tubarões em águas brasileiras. A metodologia propõe a coleta de dados de forma simples nos desembarques, entrepostos de pesca e no comércio em geral, viabilizando o reconhecimento das espécies e populações ameaçadas e garantindo o desenvolvimento de planos de manejo e conservação.

Referências

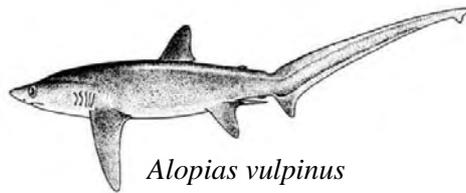
- Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*; 25: 4692-4693.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Fordham FS (1998) Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission no 1998; 20. 39.
- 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; 11-17.
- Cavalcanti MJ, Gomes UL, Tomás ARG (1996) Discriminação morfológica entre *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861) e *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) (Elasmobranchii, Carcharhiniformes, Carcharhinidae): um estudo multivariado. *Acta Biologica Leopoldensia*; 18:103-118.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK, Shivji MS (2006) Identification of Shark Species Composition and Proportion in the Hong Kong Shark Fin Market Based on Molecular Genetics and Trade Records, *Conservation Biology* 20(1): 201-211.
- Compagno LJV (1984) FAO 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.
- Cunha M R, Gomes UL (1994) Estudo comparativo dos órgãos copuladores de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861). *Rev Brasil Biol*; 54 (4): 575-586.
- Estatística da Pesca Brasil (2002-2007) Grandes Regiões e Unidades da Federação. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros.

- FAO (2009) FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Ferreira BP (1998) Ciclo reprodutivo de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey) (Selachii, Carcharhinidae) na região de Barra de Guaratiba, RJ. An Acad bras Ci, 60(1): 91-101.
- Ferreira CM, Nunes JA, Oliveira EC, Tessier MF, Sampaio CLS (2003) Análise dos desembarques da frota artesanal da Pituba, Salvador, Bahia. In: I Congresso Brasileiro de Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. Resumos CD Rom.
- Figueiredo JL. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil (1997) Introdução. Cações, raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo; 104.
- Gadig OBF (1994) Fauna de tubarões da costa Norte/Nordeste do Brasil (Chondrichthyes: Elasmobranchii). João Pessoa. Dissertação de Mestrado em Zoologia, Universidade Federal da Paraíba 330.
- Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo 343.
- Gagnaire PA, Tsukamoto K, Aoyama J, Minegishi Y, Valade P, Berrebi P (2007) RFLP and semi-multiplex PCR-based identification of four eel species from the southwestern Indian Ocean region. J. Fish Biol 71 (Supplement B), 279-287.
- Gomes UL, Siqueira AE (1995) Estudo comparativo do condroneurocrânio de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861) (Elasmobranchii, Carcharhinidae). Rev Bras. Biol: 63: 285-294.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Vilablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acade Sci USA 86:6196-6200.

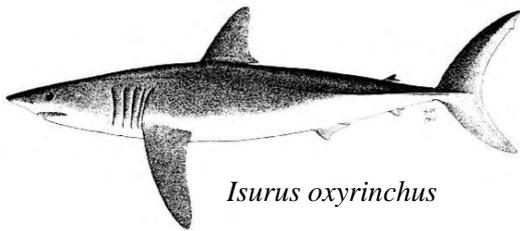
- Lessa RPT (1986) Contribuição ao conhecimento da biologia de *Carcharhinus porosus* Ranzani, 1839 (Pisces, Chondrichtyes) das reentrâncias maranhenses. Acta Amazônica 16/17: 73-86.
- Lima MC, Gomes UL, Souza-Lima W, Paragó C (1997) Estudo anatômico comparativo da região cefálica pré-branquial da *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith) e *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes) (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) relacionados com a presença do cefalofólio em *Sphyrna rafinesque*. Revta bras Zool. 14 (2) 347-370.
- MacVector™ 6.5. (1998) Oxford Molecular Ltd.
- Nunes AS, Dominguez JML (2004) Habitats essenciais para peixes – HEP – na Costa do Dendê, Bahia. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, XVI Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí (SC). Resumos, 7.
- Nunes JA, Tessier M, Ferreira CM, Sampaio CLS. (2003) A bicuda, *Sphyaena guachancho* Cuvier, 1829 (Actinopetygii), e elasmobrânquios desembarcados pela frota artesanal da Pituba, Salvador (BA). In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. Resumos 214-220.
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N, Shivji M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. Marine Biotechnology 3: 231– 240.
- Pantano Neto J, Souza AM. (1999) Morfologia do Aparelho respiratório de *Rhizoprionodon lalandei* (Valenciennes, 1841) Carcharhinidae, Elasmobranchii. In: Encontro Brasileiro de ictiologia, Resumos 13:363.
- Sadowski V (1967) Selachier aus dem litoral von São Paulo, Brasilien. Beit Neotrop Faunav 5 (2): 71-88.

- 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.
- Souza AM, Kakimoto JE, Intlizano W (1999) Anatomia descritiva dos cíngulos peitoral e pelvino, e respectivos pterigióforos de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) (Carcharhinidae, Elasmobranchii). Publ Avul Inst.Pau Brasil 2:13-33.
- Springer VGA (1964) A revision of the Carcharhinidae shark genera *Scoliodon*, *Loxodon*, and *Rhizoprionodon*. Proc U S Natl Mus 115 (3493) 559-632.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res (31) 3688-3691.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B. 20

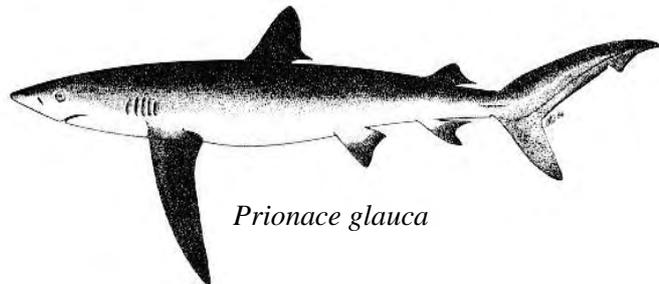
Capítulo II



Alopias vulpinus



Isurus oxyrinchus



Prionace glauca

Identificação genética de tubarões Lamniformes e Carcharhiniformes utilizando PCR-multiplex.

Conservation Genetics Resources (2009) DOI 10.1007/s12686-009-9131-7

Manuscrito recebido em outubro de 2009 e aceito em outubro de 2009.

Resumo

Com o constante aumento da captura e comercialização de tubarões em todo o mundo e a constatação de que várias espécies já apresentam fortes sinais de sobre-exploração, torna-se urgente a criação de mecanismos de registro, avaliação e controle da pesca. Levando-se em conta as dificuldades de identificações morfológicas, principalmente devido à remoção de partes dos animais, este trabalho propõe uma técnica de identificação genética de espécies utilizando multiplex-PCR baseado no gene Citocromo Oxidase I. Neste artigo apresentam-se os primers de reconhecimento espécie-específicos e os métodos desenvolvidos para a identificação simultânea de nove espécies de tubarões das ordens Lamiformes e Carcharhiniformes, algumas delas de distribuição e alvo de pescarias em todo o mundo.

Introdução

Historicamente, o consumo da carne de tubarão manteve-se quase que restrito às populações ribeirinhas até poucas décadas atrás. Contudo, com a redução dos estoques pesqueiros mais tradicionais, esse recurso passou a ser mais difundido e apreciado, embora a grande demanda de nadadeiras de tubarões pela culinária asiática seja o fator de maior importância na depleção em larga escala das populações desses animais no mundo inteiro. Nas últimas duas décadas, porém, verifica-se a crescente preocupação sobre a vulnerabilidade dos tubarões à exploração pesqueira (Camhi *et al.* 1998; Castro *et al.*

1999), bem como a documentação a respeito do *finning*, fatos que têm contribuído para o desenvolvimento de diversos estudos que busquem o manejo mais adequado das pescarias de tubarões em muitas partes do mundo, onde já atingiram níveis insustentáveis, levando diversas espécies ao desaparecimento (Camhi 1999).

Considerando que cada espécie responde de forma independente às pressões exercidas pelo ambiente e, neste caso, principalmente pela ação do homem, é fundamental que se conheça de forma mais refinada a composição das capturas de tubarões por espécie e abundância relativa, de forma que se estabeleçam planos de recuperação dessas populações e o conseqüente ordenamento dessas atividades (Lessa *et al.* 1999). Contudo, um dos grandes obstáculos para a obtenção de dados sobre a captura e o comércio de tubarões é a dificuldade na identificação de muitas espécies com base nas ferramentas taxonômicas tradicionais (Stevens 2004), as quais muitas vezes se valem de critérios morfológicos e merísticos perdidos no processamento das carcaças ou de pouca praticidade em estudos de campo que exijam a rápida identificação de numerosos exemplares, ainda que inteiros. O problema de identificação morfológica dos tubarões é ainda agravado pela ampla prática da pesca comercial de remoção da cabeça, cauda e nadadeiras para minimizar as necessidades de armazenagem e prevenir a deterioração. Assim, um levantamento da captura de tubarões através da identificação morfológica apenas das carcaças torna-se extremamente difícil. Espécies de tubarões economicamente importantes como os das famílias Lamnidae e Carcharhinidae, podem exibir morfologia externa conservativa, com diferenças pouco acentuadas, resultando em enorme dificuldade na sua correta identificação ao nível de espécie (Castro 1993; Bonfil 1994; Castro *et al.* 1999). Para que ações de conservação e manejo de tubarões sejam postas em prática em bases espécie-específicas, existe a necessidade urgente de que esta questão seja satisfatoriamente minimizada.

Por mais de 30 anos, diversos marcadores moleculares diferentes têm sido utilizados com propósito taxonômico entre os numerosos grupos de seres vivos (Ward *et al.* 2005). No caso dos tubarões, por exemplo, os marcadores moleculares disponíveis para a identificação de espécies desenvolvidos por Pank *et al.* (2001), Shivji *et al.* (2002), Chapman *et al.* (2003), Abercrombie (2004), Nielsen (2004), Abercrombie *et al.* (2005) utilizam as diferenças entre as bases nucleotídicas do gene nuclear ribossomal ITS2 e Blanco *et al.* (2008) utiliza sequências do gene Citocromo *b*. Tendo uma ampla gama de técnicas diferentes que podem ser empregadas em identificações de espécies, explorando regiões genômicas diversas, Hebert *et al.* (2003) sugeriu que uma única sequência genética seria suficiente para diferenciar todos, ou pelo menos a maioria das espécies animais e propôs a utilização do DNA mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI) para um sistema mundial de bioidentificação animal, sendo a sequência de cada espécie assimilada a um barcode.

Também buscando a unificação de um sistema mundial de informações dedicado à identificação taxonômica genética, o presente estudo descreve um recurso metodológico para a caracterização de nove espécies de tubarões Lamniformes e Carcharhiniformes, usualmente exploradas pela pesca comercial, desenvolvido a partir das características exclusivas de cada uma delas e expressas nas sequencias do gene COI.

Material e Métodos

Caracterização das amostras

Dentre as espécies para as quais foram desenvolvidos os métodos de identificação genética, três são pertencentes à Ordem Lamniformes (*Alopias superciliosus*, *Alopias vulpinus* e *Isurus oxyrinchus*) e seis pertencem à Ordem Carcharhiniformes (*Prionace glauca*, *Galeocerdo cuvier*, *Carcharhinus falciformis*, *Rhizoprionodon lalandii*,

Rhizoprionodon porosus e *Sphyrna lewini*). Outras 16 espécies de tubarões (*Isistius brasiliensis*, *Squatina argentina*, *Squatina guggenheim*, *Ginglymostoma cirratum*, *Lamna nasus*, *Galeorhinus galeus*, *Mustelus higmani*, *Mustelus schmitti*, *Schroederichthys* sp., *Scyliorhinus* sp., *Carcharhinus acronotus*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus obscurus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Carcharhinus porosus* e *Sphyrna tudes*) foram analisadas conjuntamente para a avaliação da diversidade nucleotídica existente entre as espécies, verificação de falsos positivos nas reações de multiplex-PCR e posterior geração de novos primers de identificação.

Os exemplares de tubarões foram obtidos junto a desembarques de pesca ao longo da costa brasileira. Os espécimes pertencentes à ordem Lamniformes foram capturados na costa Sudeste do Brasil, em uma região próxima ao Estado de São Paulo. Das espécies pertencentes à ordem Carcharhiniformes, obteve-se espécimes de *P. glauca* e *G. cuvier* da costa Sudeste e Nordeste. Os exemplares da espécie *C. falciformes* são provenientes da costa Norte e os espécimes de *R. lalandii*, *R. porosus* e *S. lewini* foram capturados em uma vasta área abrangendo a costa Sul, Suldeste e Nordeste do Brasil. Os exemplares das outras 16 espécies foram obtidos na região Sudeste brasileira, com exceção das espécies *G. cirratum* e *M. higmani*, coletados na região Nordeste e os espécimes de *C. porosus*, coletados na região Norte. Os tubarões foram identificados de acordo com Gadig (2001). O gênero *Carcharhinus* foi identificado adicionalmente com base em Garrick (1982). Após a sua identificação taxonômica, foram retiradas amostras de tecido para as análises moleculares.

Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.

O DNA genômico foi extraído a partir de células epiteliais, utilizando a metodologia de extração salina descrita por Aljanabi *et al.* (1997). Reações de

amplificação do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram efetuadas em ciclador térmico de PCR utilizando-se 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima *Taq* Polymerase (Invitrogen) e 0,5mM ng de primers, utilizando os primers F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3', descritos por Ward *et al.* (2005). Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos, com 35 repetições. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

As sequências do gene COI foram obtidas utilizando o ABI Prism 377 (Perking-Elmer) com o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), sendo em seguida analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW - Macvector 65 (1998) para identificação de sítios polimórficos entre as espécies.

PCR-Multiplex

A partir da composição nucleotídica do gene COI foram identificados os sítios polimórficos existentes entre as espécies, quais características eram exclusivas de cada uma delas e então, desenhados os primers de reconhecimento espécie-específicos. As reações de amplificação foram realizadas contendo o primer F1 (Forward) utilizado como controle positivo da reação, o primer R1 (Reverse), todos os 9 primers de reconhecimento espécie-específico e em cada tubo de reação o DNA de uma das espécies. Além de amostras das 9 espécies que tiveram primers de reconhecimento desenvolvidos, foram realizadas reações de PCR, sob as mesmas condições, para as demais 16 espécies de tubarões para a

detecção de possíveis falsos positivos. Todas as reações foram feitas utilizando ciclador térmico de PCR em 25µl de solução contendo 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de enzima *Taq* DNA polymerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1 unidade de enzima *Taq* Polymerase (Invitrogen) e 0,5mM de cada primer. Cada ciclo de amplificação por PCR consistiu-se basicamente na denaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos, com 35 repetições. Os primers desenvolvidos para cada uma das espécies, o número de amostras analisadas e o tamanho estimado dos fragmentos de DNA amplificados apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1. Primers desenvolvidos, tamanho das bandas geradas em gel de agarose por espécie (n) e número de acesso no GenBank.

Species	Primers	Fragment (bp)	n	GenBank
Lamniform				
<i>Isurus oxyrinchus</i>	CTTCCACTTGGCTGGGTATCTCG	280	30	FJ895090
<i>Alopias vulpinus</i>	CCTCAGCTGGAGTTGAAGCC	410	18	FJ895092
<i>Alopias superciliosus</i>	GGTTATACCCGTAATAATTGGG	530	34	FJ895091
Carcharhiniform				
<i>Galeocerdo cuvier</i>	ACTACATTCTTTGATCCAGCG	50	22	FJ895097
<i>Prionace glauca</i>	TCCAGTTCTTGCAGCAGGT	105	80	FJ895098
<i>Carcharhinus falciformis</i>	GATCTATTCTTGTAACCACG	145	16	FJ895094
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	CCCATTAGCTAGTAATA	360	110	FJ895096
<i>Sphyrna lewini</i>	GGCCTTCCCACGAATAAAC	480	43	FJ895093
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	TCAACCTGGATCTCTTTTAGGT	610	90	FJ895095

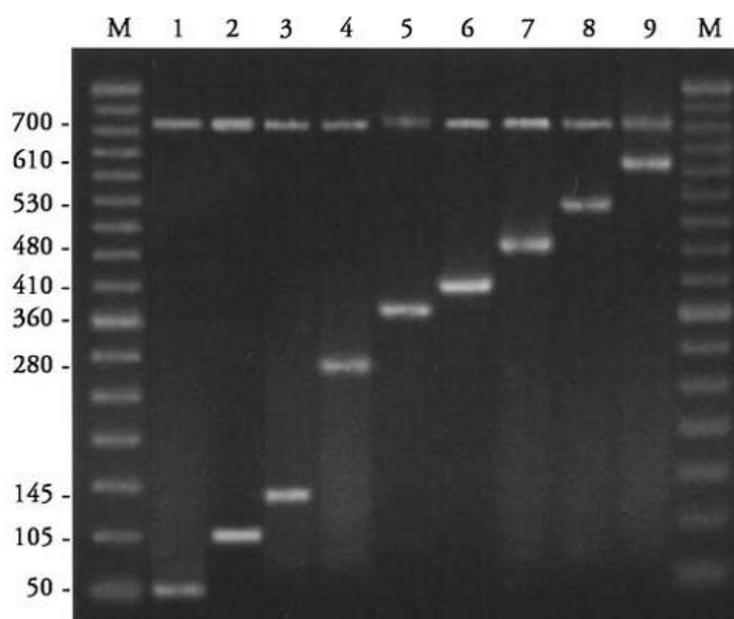
Resultados

A partir da identificação de 590 bases nucleotídicas analisáveis do gene COI das 25 espécies de tubarões foi observado uma divergência nucleotídica média de 17,8%. Entre as espécies da ordem Lamniformes a divergência nucleotídica encontrada foi de

17,4% e a divergência entre as espécies do gênero *Alopias* foi de 12,1%. Entre todas as espécies da ordem Carcharhiniformes a divergência foi estimada em 10,8% sendo de 5,1% a divergência nucleotídica entre as espécies do gênero *Carcharhinus* e 3,2% a divergência entre espécies do gênero *Rhizoprionodon*.

Os primers de reconhecimento espécie-específicos foram desenhados dispostos de forma gradual ao longo das sequências do gene Citocromo Oxidase I. Desta forma nas reações de PCR cada um dos primers sintetizados gera um fragmento de tamanho distinto, apresentando bandas diagnósticas para cada uma das espécies após corrida eletroforética. Nesta reação, contendo também o primer COI F1, é produzida ainda uma banda secundária com cerca de 700 bp utilizada como controle positivo da reação. Nos testes realizados foi confirmada a eficiência dos primers em reações individuais contendo apenas o primer específico para uma única espécie, os primers F1 e R1 e o DNA da espécie alvo. Nestas reações observou-se a amplificação do fragmento de tamanho diagnóstico e o fragmento de controle positivo da reação em todas as amostras analisadas denotando uma alta funcionalidade. Nas reações de multiplex-PCR contendo todos os nove primers de reconhecimento espécie-específicos, além dos primers F1 e R1 e o DNA de apenas uma de cada espécie, observou-se para todas as 406 amostras de tubarões apresentadas na Tabela 1, uma alta adstringência da reação sendo amplificados apenas os fragmentos diagnósticos de cada espécie e o controle da reação (Figura 1). Nas análises de multiplex-PCR para avaliar a possível ocorrência de falsos positivos utilizando as amostras das outras 16 espécies de tubarões, ocorreu a amplificação apenas das bandas de controle positivo de reação confirmando a especificidade dos primers.

Figura 1. Padrão de bandas produzidas pela multiplex-PCR utilizando os 9 primers de reconhecimento espécie-específicos e os primers universais para o gene COI. A espécie *G. cuvier* apresenta um fragmento de 50 bp (base pars), *P. glauca* 105 bp, *C. falciformes* 145 bp, *I. oxyrinchus* 280 bp, *R. porosus* 360 bp, *A. vulpinus* 410 bp, *S. lewini* 480 bp, *A. superciliosus* 530 bp, *R. lalandii* 610 bp. O controle positivo da reação é observado em todas as amostras com cerca de 700 bp e M - marcador de peso molecular 50bp.



Nas análises de multiplex-PCR para avaliar a possível ocorrência de falsos positivos utilizando as amostras das outras 16 espécies de tubarões, ocorreu a amplificação apenas das bandas de controle positivo de reação confirmando a especificidade dos primers.

Discussão

Mesmo sendo ainda discreto o número de espécies que podem ser identificadas utilizando os métodos de PCR-multiplex apresentados neste trabalho, trata-se de um grupo

extremamente explorado e que representa uma grande parcela das capturas mundiais. Do ponto de vista comercial, tubarões da ordem Lamniformes e Carcharhiniformes são importantes, já que, no caso dos primeiros, representam importante porcentagem das capturas de grandes tubarões oceânicos epipelágicos capturados no mundo e também no Brasil onde, principalmente *Isurus oxyrinchus* se destaca entre as espécies de Lamniformes oceânico-epipelágicas capturadas pela frota espinheleira, saltando de 13 toneladas em 1975, para 138 toneladas em 1990, com base nos barcos operantes no Sudeste e Sul do Brasil (Costa *et al.* 1996). Já dentre os Carcharhiniformes, as famílias Carcharhinidae e Sphyrnidae são as mais importantes comercialmente, com destaque para *Prionace glauca* (Carcharhinidae) em área oceânico-epipelágica, onde é a espécie de tubarão mais capturada pelas frotas espinheleiras nestes ambientes, sobretudo no Brasil (Hazin & Lessa, 2005) e os pequenos tubarões do gênero *Rhizoprionodon* que, em área costeira representam mais de 50% dos pequenos tubarões capturados pela frota artesanal (Motta *et al.* 2005). Já os tubarões-martelo (Sphyrnidae) são importantes recursos pesqueiros tanto em áreas oceânicas, quando grandes exemplares são alvo das pescarias por barcos espinheleiros e redes-de-deriva (Amorim *et al.* 2002), como em área costeira, onde a pescaria incide principalmente sobre a classe etária jovem, sobretudo no Sudeste e Sul do Brasil (Vooren *et al.* 2005).

A eficácia da utilização do gene COI para a identificação de peixes é fortemente validada por Ward *et al.* (2005) que analisou 207 espécies, entre elas 61 espécies de elasmobrânquios, sendo observado uma divergência genética média de 15.46% entre famílias, 9.93% entre gêneros e 0.39% entre espécies. Mendonça *et al.* (2009a) analisaram sequências nucleotídicas também deste mesmo gene em 18 espécies de tubarões sendo observado uma divergência bastante significativa mesmo entre espécies de mesmo gênero, porém, mantendo um forte nível de similaridade dentro do mesmo táxon onde foram

observadas divergências médias de 1,2%. Tais afirmações são também corroboradas pelo presente trabalho que apresenta expressivos níveis de divergência genética entre espécies, incluindo as de mesmo gênero, mas com alto grau de conservação entre indivíduos da mesma espécie. A viabilidade da aplicação da PCR-multiplex para a identificação de espécies de tubarões com alta funcionalidade e especificidade é sustentada também pela observação de que nenhum sinal polimórfico foi detectado entre os sítios de ligação dos primers espécie-específicos desenhados neste trabalho.

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

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

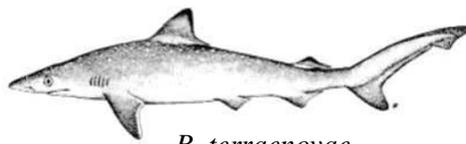
Referências

- Abercrombie DL, Clarke SC, Shivji M (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genet Resour* 6: 775-788.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25: 4692-4693.
- Amorim AF, Arfelli CA, Bacilieri S (2002) Shark data from Santos longliners fishery off southern Brazil (1971-2000). *Collection Volume Sci Paper ICCAT* 54(4): 1341-1348.
- 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.
- Bonfil R (1994) Overview of world elasmobranch fisheries. Fisheries technical paper 341. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Fordham FS (1998) Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission 20-39.
- Camhi M (1999) Sharks on the line II: an analysis of Pacific state shark fisheries. Living oceans program. National Audubon Society, Islip, New York.
- Castro JI, Woodley CM, Brudek RL (1999) A preliminary evaluation of the status of shark species. Fisheries technical paper 380.
- Costa FES, Braga FMS, Amorim AF, Arfelli CA (1996) Fishery analysis on Shortfin Mako, *Isurus oxyrinchus*, off southeast and south of Brazil (Elasmobranchii: Lamnidae). *Arq de Ciências do Mar* 30: 5-12.
- Chapman D, Abercrombie D, Douady C, Pikitch E, Stanhope M, Shivji M (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: application

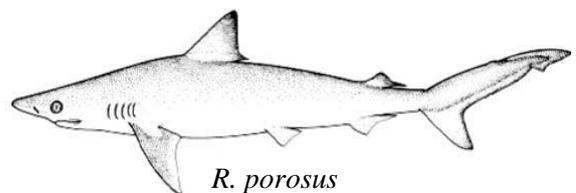
- to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genet* 4: 415-425.
- Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo 343.
- Garrick JAF (1982) Sharks of the genus *Carcharhinus*. NOAA Technical Report, NMFS Circular 445: 194.
- Hazin FH, Lessa RP (2005) Synopsis of biological information available on blue shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic ocean. Collection Volume Sci Papers ICCAT 58(3): 1179-1187.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Ward JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270: 313-322.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrige 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.
- Lessa RPT, Santana FM, Rincon G, Gadig OBF, El-Deir ACA (1999) Biodiversidade de Elasmobrânquios do Brasil. Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 154.
- 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.
- Motta FS, Gadig OBF, Namora RC, 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. Fish Res 74: 116-126.
- Nielsen JT (2004) Molecular genetic approaches to species identification and delineation in elasmobranchs. M.S. thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.
- Oxford Molecular Group (1998) MacVector 6.5 User Guide. Oxford Molecular, Oxford, England.
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N, Shivji M (2001) 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.
- Shivji M, Clarke S, Pank M (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. Conservation Biol 16: 1036-1047.
- Stevens JD (2004) Taxonomy and field techniques for identification: with listing of available regional guides. In: Musick JA, Bonfil R. Elasmobranch Fisheries Management Techniques. Asia Pacific Economic Cooperation, IUCN 370.
- Valdez-Moreno M, Ivanova NV, Elías-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.
- Vooren CM, Klippel S, Galina AB (2005) Biologia e status de conservação dos tubarões-marelo, *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena*. In: Vooren CM, Klippel. Ações para conservação de tubarões e raias no Sul do Brasil. Editora Igaré, Porto Alegre. 262
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans Royal Soc 1-11.

Capítulo III



R. terraenovae



R. porosus

Definição genética das espécies de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental usando o DNA mitocondrial.

Conservation Genetics (2010) DOI 10.1007/s10592-010-0132-6

Manuscrito submetido em janeiro de 2010, aceito em junho de 2010.

Resumo

A definição taxonômica dos tubarões *Rhizoprionodon terraenovae* e *R. porosus* como espécies distintas, bem como a ocorrência de *R. terraenovae* na América do Sul permaneceu incerta por décadas, sendo este um problema urgente a ser solucionado não apenas pela importância ecológica das espécies, mas principalmente para a gestão dos recursos pesqueiros. Atualmente, marcadores moleculares também tem se sido utilizados como ferramentas eficientes na detecção de espécies crípticas e resoluções taxonômicas controversas. Assim, sequências do gene COI e da região controladora do DNA mitocondrial entre 415 amostras do gênero *Rhizoprionodon* capturadas no Atlântico Ocidental foram avaliadas quanto às divergências nucleotídicas e estruturação de clados. As análises de composição nucleotídica, variância molecular AMOVA, relações de distância utilizando análises filogenéticas e redes haplotípicas aplicados neste estudo reforçam a validação de *R. terraenovae* e *R. porosus* como espécies distintas. A ocorrência de *R. terraenovae* na costa brasileira e sobreposições de distribuição geográfica entre esta espécie e *R. porosus* não foram observadas neste estudo.

Introdução

O status taxonômico dos tubarões *Rhizoprionodon terraenovae* e *Rhizoprionodon porosus* manteve-se incerto durante décadas (Compagno, 1984). Ambas as espécies são provenientes do Atlântico ocidental, sendo *R. porosus* distribuído no Caribe, América Central e América do Sul, enquanto *R. terraenovae* distribuiu-se do Golfo do México e ao longo da América do Norte. Springer (1964) propôs a separação destas espécies, mas *R. porosus* foi considerado uma subespécie ou uma variação clinal de *R. terraenovae* (Compagno 1984), sendo a diferenciação morfológica feita basicamente pela contagem de vértebras pré-caudais (de 58 a 66 em *R. terraenovae* e de 66 a 75 em *R. porosus*) (Springer 1964; Compagno 1984). Tal característica não tem sido considerada consistente para a distinção entre estas duas espécies e provavelmente a maior parte das identificações esteja sendo realizada unicamente com base no critério geográfico e, no entanto, de acordo com alguns autores é possível que estas espécies apresentem simpatria, com ocorrência de *R. terraenovae* na América do Sul (Bigelow & Schroeder, 1948; Compagno, 1984; Gadig 2001).

Além dos aspectos básicos envolvidos na definição taxonômica de um clado, a caracterização destes tubarões como duas espécies distintas e a possível ocorrência de *R. terraenovae* na América do Sul tem grande relevância quanto à conservação, principalmente considerando tratar-se de um grupo de peixes fortemente explorados pela pesca em praticamente toda a costa Atlântica Ocidental.

As técnicas de diagnósticos moleculares são atualmente comumente empregadas para a identificação de espécies e para contornar as desvantagens em identificações complexas baseadas em chaves morfológicas. Identificações através de DNA se baseiam na observação de que as divergências genéticas intra-específicas são geralmente inferiores a divergências interespecíficas (Meyer & Paulay 2005). Segundo Ferguson (2002),

identificações de espécies através de divergências genéticas são baseadas no argumento de que tais diferenças sugerem a incompatibilidade genética, e assim o isolamento reprodutivo, com ausência de fluxo gênico, culminam com a origem de espécies distintas. A precisão da medida de distância para as identificações através de dados de DNA também pode ser fortemente dependente do tamanho amostral, sendo o banco de dados suscetível a falsos positivos, incluindo amostragens taxonômicas incompletas e a falta de disparidades de variações intra-específicas e interespecíficas (Frézal & Leblois 2008).

Hebert *et al.* (2003) propôs que uma sequência de gene único seria suficiente para diferenciar todas ou pelo menos a grande maioria das espécies animais, e propôs o uso do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) como um sistema global de identificação animal. Para tubarões o gene COI foi resolutivo em diversos trabalhos visando a caracterização de espécies (Shivji *et al.* 2002; Abercrombe *et al.* 2005, Mendonça *et al.* 2009a; Mariguela *et al.* 2009; De-Franco *et al.* 2009). Também conhecido como D-loop, a região controladora apresenta a maior taxa evolutiva do mtDNA (Hoelzel *et al.* 1991, Lopez *et al.* 1997) e é um dos marcadores mais comumente utilizados para tratar as relações evolutivas de espécies estreitamente relacionadas e / ou subespécies (Meyer *et al.* 1990; Rocha-Olivares *et al.* 1999; Murgra *et al.* 2002). A utilização deste marcador genético também já se mostrou eficiente na caracterização de espécies de tubarões (Corrigan *et al.* 2008; Quattro *et al.* 2006; Sandoval-Castillo *et al.* 2004).

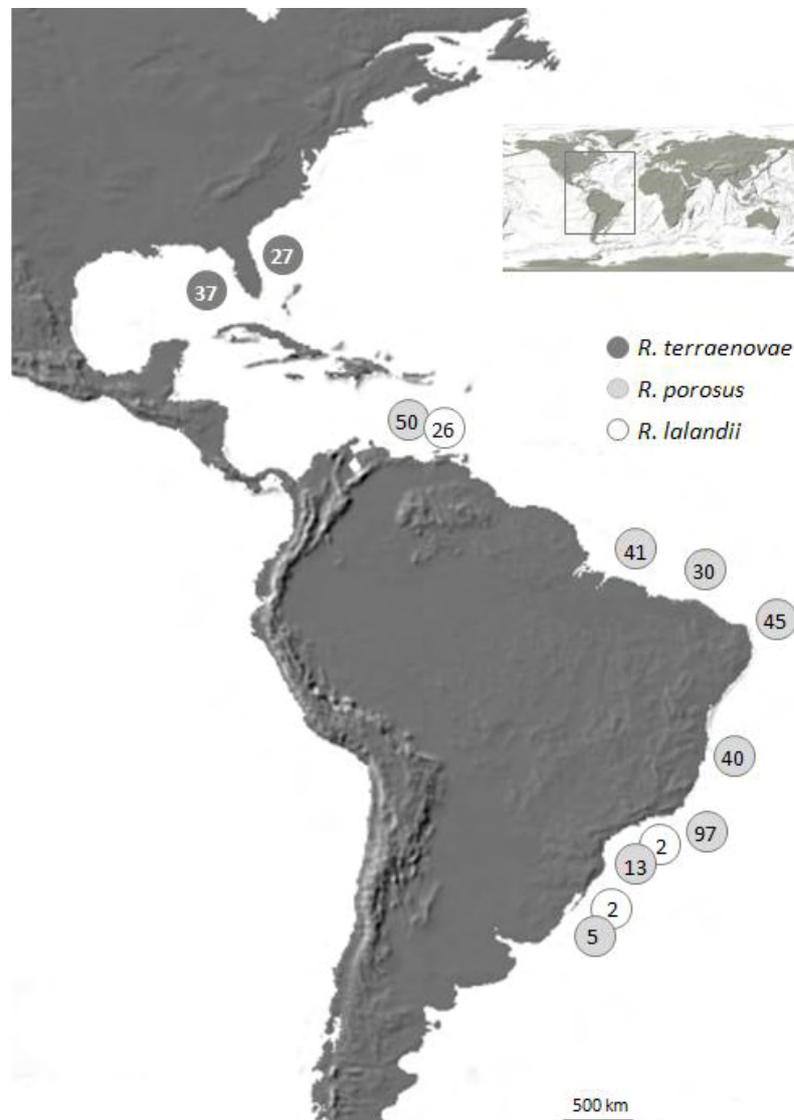
Buscando a definição taxonômica das espécies *R. terraenovae* e *R. porosus*, bem como a caracterização da possível ocorrência de *R. terraenovae* na América do Sul foram avaliados diversos indicadores a partir de sequências nucleotídicas mitocondriais destes dois clados. Sendo a situação taxonômica de *R. lalandii* já bem determinada, amostras populacionais desta espécie foram utilizadas como um parâmetro das divergências genéticas existentes dentro do gênero *Rhizoprionodon*.

Material e métodos

Caracterização das amostras

Um total de 415 amostras do gênero *Rhizoprionodon* foi analisado, sendo 64 identificadas como *R. terraenovae* (Richardson 1836), capturadas em regiões da Flórida (37 do Golfo do México e 27 da costa atlântica) e outras 321 amostras identificadas como *R. porosus* (Poey 1861), coletadas desde o Caribe (Isla Margaritta - Venezuela) até o extremo sul do Brasil e ainda 30 amostras do tubarão *R. lalandii* (Müller & Henle 1839) coletadas entre o Caribe e região sul do Brasil (Figura 1). As amostras de *R. terraenovae* foram coletadas entre os anos de 2003 a 2005 e mais recentemente em 2009, durante trabalhos de pesquisa do Florida Program for Shark Research, University of Florida - USA e as amostras de *R. porosus* e *R. lalandii* foram obtidas entre os anos de 2005 e 2008 em trabalhos de campo realizados por pesquisadores do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - SP, Brazil.

Figura 1. Distribuição geográfica dos tubarões analisados. Nos círculos estão os números de espécimes amostrados em cada região.



Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído de células epiteliais, usando o método de extração salina descrita por Aljanabi e Martinez (1997). As reações de amplificação do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram realizadas utilizando os primers F1 5'-TCA

ACC AAC CAC AAA GGC GAC ATT AC-3 e R1 5'-TAG ACT TCT TGG GGG CCA AAG CA AAT-3', descritos por Ward *et al.* (2005) e a amplificação da região controle foi realizada utilizando os primers D-loop F 5'-CTC CCA CCA AGA AAG TTC TG-3 e D-loopR 5'-GGC CGC TTA TGT AGG CTT CTT GG-3' descritos por Mendonça *et al.* (2009b) utilizando 25 µl de solução com 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão da enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e 50 mM KCl), uma unidade da enzima Taq polimerase (Invitrogen) e 0,5 ng mM de primers. Cada ciclo de amplificação por PCR foi realizado basicamente pela desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 50°C para o gene COI e 55°C para a região controle, ambos por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com 35 repetições. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. Em seguida os produtos da PCR foram marcados com o BigDye versão Terminator Cycle Sequencing Kit 3,1 (Applied Biosystems, Inc.) e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. As sequências completas foram analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW Macvector-65 (1998) para a identificação de sítios polimórficos entre as espécies. As sequências dos haplótipos foram depositados no GenBank. Sequências do gene COI com número de acesso HM991184 - HM991199 para *R. terraenovae*, números HM991200 - HM991208 para *R. porosus* e HM991209 - HM991210 para *R. lalandii*. Sequências da região controle do mtDNA com números de acesso HM802332 - HM802351 para *R. terraenovae*, GU318244 - GU318296 para *R. porosus* e HM446216 - HM446227 para *R. lalandii*.

Análises

Para as análises populacionais foram calculadas as composições nucleotídicas, diversidade das sequências, número de sites polimórficos, número de frequência e

diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.01 de Excoffier & Schneider (2005). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.01 que utiliza a estatística F de Wrigth's (1951, 1965). A significância da F_{ST} - estatística é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.* 1992), com 1000 permutações. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões.

O software Modeltest (Posada & Crandall 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de evolução de sequências e os valores dos parâmetros para estes dados. O modelo de substituição nucleotídica HKY (Hasegawa *et al.* 1985) foi utilizado com base em um teste de hipótese hierárquica de modelos alternativos implementados com Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). O método de análise filogenética Bayesiana (Huelsenbeck & Ronquist 2001) foi utilizado para avaliar as topologias de árvores através da estimativa das probabilidades utilizando MrBayes v.3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Análises de Máxima Verossimilhança (Tamura *et al.* 2004) foram geradas utilizando o programa PAUP (Swofford 2004) e o método de UPGMA (Sneath & Sokal 1973) também foi utilizado para avaliar a história evolutiva das árvores de haplótipos e suas distâncias foram calculadas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (Tamura *et al.* 2004). A rede de haplótipos foi estimada utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000), que utiliza os métodos de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992).

Resultados

Caracterização das sequencias e variabilidade

O sequenciamento de fragmentos do gene Citocromo Oxidase I originou 580 nucleotídeos analisáveis e a região controle do mtDNA resultou em 802 nucleotídeos analisáveis com diferenças significativas entre as espécies. Na composição nucleotídica do gene COI entre *R. terraenovae* e *R. porosus* foi observada uma divergência de 1.2%, entre *R. terraenovae* e *R. lalandii* 1.3% e entre *R. porosus* e *R. lalandii* a divergência nucleotídica foi de 1.5%. Na composição da região controle das espécies *R. terraenovae* e *R. porosus* observou-se uma divergência nucleotídica de 1.3%. Entre *R. terraenovae* e *R. lalandii* foi de 2.2% e entre *R. porosus* e *R. lalandii* a divergência encontrada foi de 3.5%. As proporções entre as bases purinas e pirimidinas, número de haplótipos e diversidade haplotípicas e nucleotídicas apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros básicos do gene COI e região controladora do DNA mitocondrial nas espécies *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii*. *n*, número de indivíduos; composição nucleotídica: A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina *N*, número de haplótipos; *h*, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica.

DNA sequences	species	<i>n</i>	A	T	C	G	<i>N</i>	<i>h</i>	π
COI	<i>R. terraenovae</i>	16	0.257	0.346	0.247	0.150	04	0.775	0.00324
	<i>R. porosus</i>	09	0.260	0.349	0.244	0.147	02	0.556	0.00096
	<i>R. lalandii</i>	05	0.259	0.345	0.252	0.145	02	0.667	0.00236
	All	30					08	0.884	0.00920
Control Region	<i>R. terraenovae</i>	64	0.312	0.351	0.205	0.131	20	0.749	0.00306
	<i>R. porosus</i>	321	0.306	0.352	0.209	0.133	53	0.881	0.00277
	<i>R. lalandii</i>	30	0.313	0.335	0.202	0.129	11	0.899	0.00252
	All	415					84	0.923	0.00849

As análises de variância molecular AMOVA denotaram uma forte estruturação formando três grupos distintos. Para o gene COI entre todas as amostras obteve-se $F_{ST}=0.863$ ($P<0.0001$) com percentual de variação entre as espécies de 82.56% e percentual de variação populacional de 15.80%. Para a região controle foi encontrado um índice $F_{ST}=0.842$ ($P<0.0001$) com percentual de variação entre espécies de 79.46% e percentual de variação populacional de 13.66%. Os índices de F_{ST} entre pares são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Índices de F_{ST} entre as três espécies utilizando as sequências do gene COI e região controle do DNA mitocondrial.

		<i>R. terraenovae</i>	<i>R. porosus</i>	<i>R. lalandii</i>
COI	<i>R. terraenovae</i>	-	-	-
	<i>R. porosus</i>	0.85357, $P<0.0001$	-	-
	<i>R. lalandii</i>	0.87488, $P<0.0001$	0.91852, $P<0.018$	-
Control Region	<i>R. terraenovae</i>	-	-	-
	<i>R. porosus</i>	0.82525, $P<0.0001$	-	-
	<i>R. lalandii</i>	0.84934, $P<0.0001$	0.87262, $P<0.0001$	-

Os fenogramas gerados com base em 8 sequências do gene COI (Figura 2) e 84 sequências do D-loop (Figura 3) utilizando as análises Bayesiana, Máxima Verossimilhança e UPGMA resultaram em topologias similares exibindo três grandes clades: *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii*. Nas análises baseadas nas sequências do gene COI estes clados foram separados com valores Bootstrap de 99-100%. Com as sequências D-loop os valores Bootstrap encontrados foram de 95-100%.

Figura 2. Relações filogenéticas entre *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii* baseados no gene COI. Os números ao longo dos ramos são os valores de Bootstrap da análise Bayesiana, Máxima Verossimilhança e UPGMA, respectivamente.

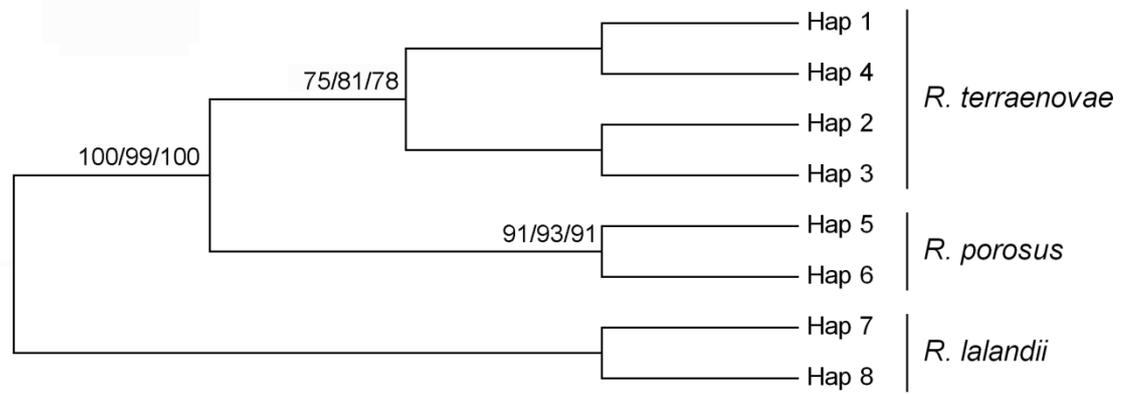
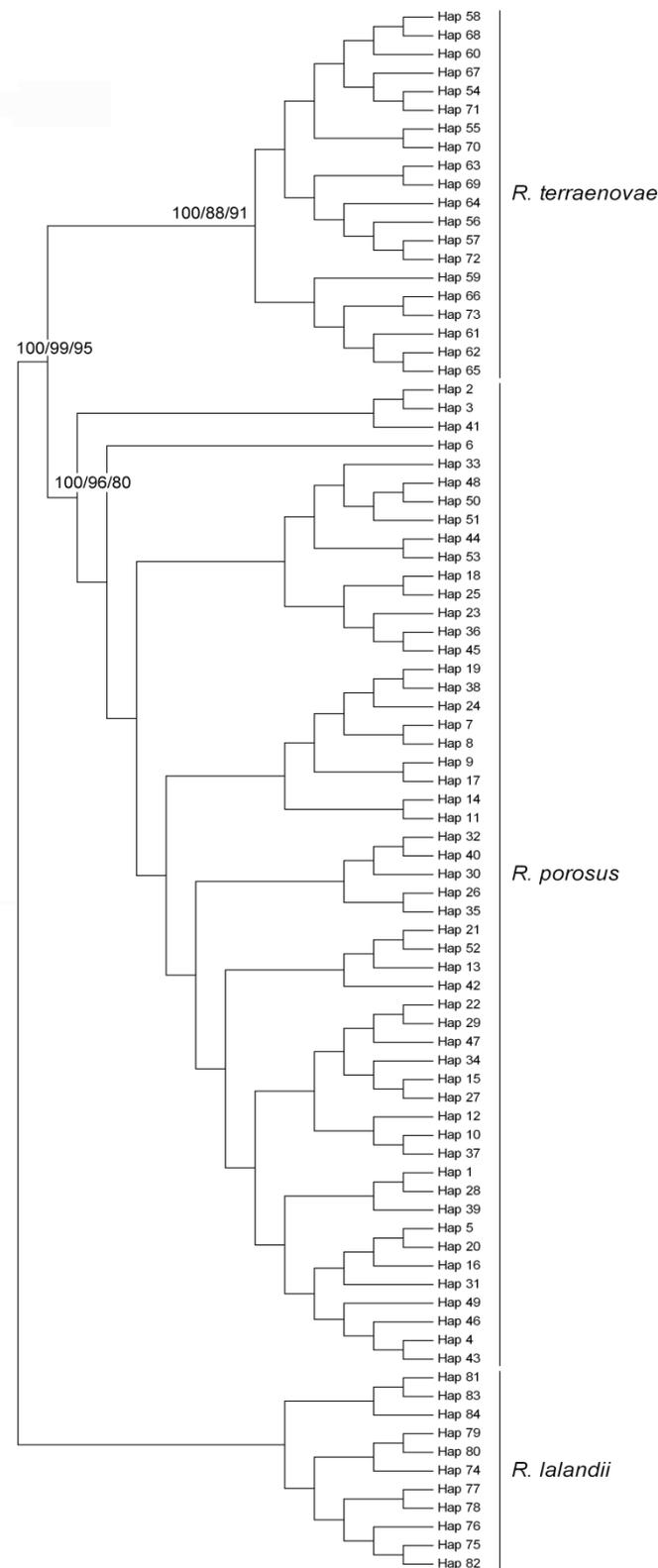


Figura 3. Relações filogenéticas entre *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii* baseados em sequências D-loop. Os números ao longo dos ramos são os valores de Bootstrap da análise Bayesiana, Máxima Verossimilhança e UPGMA, respectivamente.



Nos haplótipos originados nas sequencias do gene COI e região controle do mtDNA foi observado agrupamentos distintos entre os 3 clados, sem a existência de haplótipos compartilhados, com agrupamentos caracterizados por diversos passos mutacionais e haplótipos perdidos entre os clados (Figuras 4 e 5).

Haplótipos característicos de *R. terraenovae* não foram encontrados nas regiões compreendidas entre a costa do Caribe e sul do Brasil e desta mesma forma, haplótipos correspondentes à *R. porosus* não estiveram presentes nas áreas amostradas no Golfo do México e leste da Flórida.

Figura 4. Rede de haplótipos entre as espécies *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii* a partir de sequencias do gene COI. Os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequencias haplotípicas.

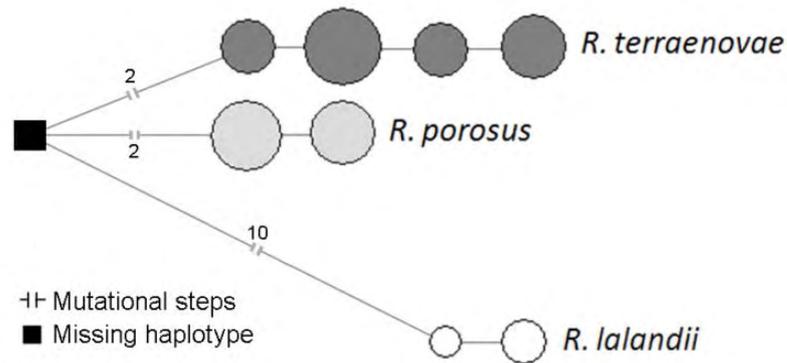
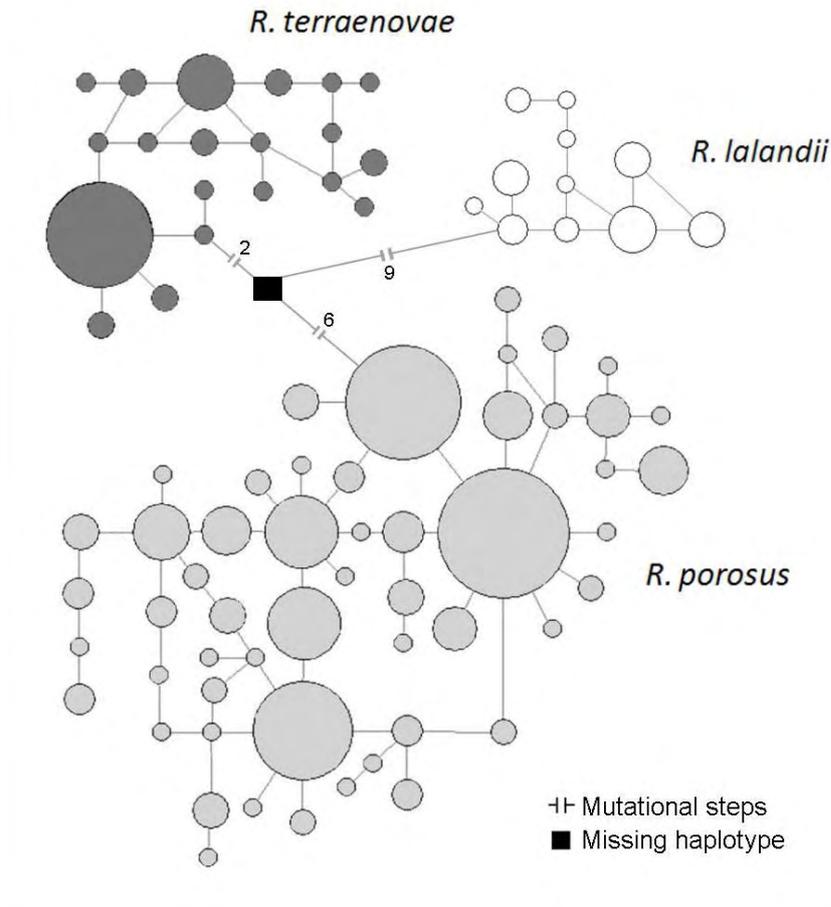


Figura 5. Rede de haplótipos entre as espécies *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii* a partir de seqüências da região controladora. Os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequências haplotípicas.



Discussão

Diversos estudos utilizando marcadores moleculares em peixes têm demonstrado a ocorrência de espécies anteriormente não reconhecidas como grupos de táxons distintos, que em muitas vezes permaneciam como crípticas morfológicamente (Carreras-Carbonell *et al.* 2005; Gharrett *et al.* 2006). Para a identificação de espécies de elasmobrânquios,

alguns trabalhos têm auxiliado na caracterização espécie-específica principalmente em análises forenses, atualmente bastante utilizadas para caracterizar partes dos animais, tais como as nadadeiras (Shivji *et al.* 2002; Abercrombe *et al.* 2005; Mendonça *et al.* 2009a; Mariguela *et al.* 2009; De-Franco *et al.* 2009). Alguns dos trabalhos tem sido desenvolvidos objetivando a identificação genética para a inclusão das espécies nos bancos mundiais de informação de DNA barcoding (Ward *et al.* 2008; Moura *et al.* 2008; Wong *et al.* 2009) e outros tem sido aplicados à detecção de espécies crípticas (Solé-Cava *et al.* 1983; Castilho *et al.* 2007; Corrigan *et al.* 2008).

No presente estudo, sequências do gene COI e região controladora do DNA mitocondrial entre as 415 amostras do gênero *Rhizoprionodon* do Atlântico Ocidental apresentaram níveis de divergências compatíveis com a delimitação de três espécies distintas. Na composição nucleotídica do gene COI das espécies *R. terraenovae*, *R. porosus* e *R. lalandii* foi encontrado diferenças significativas entre os arranjos de AT e CG sendo as médias nucleotídicas similares às encontradas por outros autores entre diversas espécies de tubarões (Ward *et al.* 2008; Moura *et al.* 2008; Mendonça *et al.* 2009a). Entre *R. terraenovae* e *R. porosus* foi observado uma divergência (1.2%) similar à encontrada entre *R. terraenovae* e *R. lalandii* (1.3%), sendo a maior divergência observada entre *R. porosus* e *R. lalandii* (1.5%). Estas divergências apresentaram índices mais conservativos quando comparados aos obtidos por Moura *et al.* (2008) entre espécies do gênero *Centrophorus* e *Centroscymnus* (cerca de 3%) e por Ward *et al.* (2008) entre diversas espécies de tubarões australianos, sendo as divergências entre táxons do mesmo gênero de 10.94% .

Na composição nucleotídica da região controle do mtDNA também foi observado uma importante diferenciação nas frequências nucleotídicas entre as 3 espécies, sendo de 1.3% entre *R. terraenovae* e *R. porosus*, 2.2% entre *R. terraenovae* e *R. lalandii* e 3.5%

entre *R. porosus* e *R. lalandii*. Os índices de divergência da região controle das espécies do gênero *Rhizoprionodon* foram semelhantes às encontradas entre espécies do gênero *Rhinobatos* (2.5%) avaliado por Sandoval-Castillo *et al.* (2004) e um pouco inferiores aos índices encontrados entre espécies crípticas do tubarão martelo *Sphyrna* spp. (5.3%) avaliado por Quattro *et al.* (2006) e índices encontrados por Corrigan *et al.* (2008) entre espécies do gênero *Chiloscyllium* (4.8%). As taxas de divergência encontradas neste estudado podem estar associadas ao tempo decorrido desde o período de especiação dos grupos, sendo a composição nucleotídica do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental evidencia de uma possível irradiação recente em relação às demais espécies citadas.

Utilizando a análise de variância molecular AMOVA foram encontrados altos índices de estruturação entre os 3 clados ($F_{ST}=0.863$ para o gene COI; $F_{ST}=0.842$ para a região controle). Nas análises entre os pares, os índices de estruturação apresentaram sutis diferenças com forte estruturação entre os clados, porém denotando uma maior diferenciação entre *R. porosus* e *R. lalandii* ($F_{ST}=0.918$ para o gene COI; $F_{ST}=0.872$ para a região controle) e uma maior relação filogenética entre *R. terraenovae* e *R. porosus* denotado pelo menor índice de distanciamento genético ($F_{ST}=0.853$ para o gene COI; $F_{ST}=0.825$ para a região controle). Uma diferenciação com um nível intermediário foi observado entre os pares *R. terraenovae* e *R. lalandii* ($F_{ST}=0.874$ para o gene COI; $F_{ST}=0.849$ para a região controle do mtDNA). Entre os teleósteos marinhos silver scabbardfish, gênero *Lepidopus* e John dory *Zeus faber* avaliados por Ward *et al.* (2008) também foi evidenciada a existência de espécies distintas apresentando altos valores de variância molecular ($F_{ST}=0.84$ e 0.96). Em elasmobrânquios a AMOVA foi utilizada para caracterizar a existência de espécies de raias do gênero *Gimmura* que apresentaram $F_{ST}=0.81$ (Smith *et al.* 2009). Para os tubarões, trabalhos abordando os índices de F_{ST} para

a distinção de espécies ainda não constam na literatura. No entanto, os valores de variância molecular encontrados neste estudo entre *R. porosus* e os outros 2 clados sugerem ser esta uma forma robusta de avaliação interespecífica também para este grupo de peixes. Embora tenha sido utilizado neste estudo um número discreto de indivíduos para análise do gene COI, seus parâmetros foram bastante similares aos obtidos na utilização da região controladora do mtDNA de populações representativas. Devido às características evolutivas conservativas, análises empregando o gene COI para avaliações entre espécies normalmente abrangem um pequeno número de indivíduos de cada táxon.

As topologias observadas entre as árvores filogenéticas e as redes de haplótipos originadas a partir de sequências do gene COI e região controle também evidenciaram os níveis de relacionamentos entre as espécies do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental e possibilitaram a visualização das diferenças entre os clados com alto grau de significância nos valores de bootstrap nos ramos das árvores e nas redes haplotípicas com um número significativo de passos mutacionais entre os haplótipos de clados distintos. Desta forma, foi constatado um maior relacionamento entre *R. terraenovae* e *R. porosus*, sendo *R. lalandii*, embora com uma distância maior, também mais relacionado à *R. terraenovae* do que a *R. porosus*. Os haplótipos gerados hipoteticamente nas redes haplotípicas poderiam ser pertencentes a um ancestral comum às três espécies do gênero *Rhizoprionodon*.

Os haplótipos correspondentes à espécie *R. terraenovae* não foram observados nas regiões amostradas na América do Sul, compreendendo desde a costa do Caribe até Sul do Brasil. Contudo, não foram realizadas amostragens em áreas da América Central, descritas por Springer (1964) como o limite geográfico entre *R. porosus* e *R. terraenovae* e desta forma a simpatria destas espécies não pode ser determinada nesta região, no presente estudo. De acordo com um trabalho realizado por Wong *et al.* (2009), haplótipos

correspondentes à estes 2 clados foram encontrados entre o Golfo do México e regiões ao norte do Caribe, podendo ser esta a evidencia de sobreposição de nichos. No entanto, em Wong *et al.* (2009) não houve uma delimitação territorial restrita das amostragens, inviabilizando a caracterização simpátrica pontual.

Conclusão

A identificação dos recursos pesqueiros ao menor nível taxonômico é fundamental não só pelo seu valor ecológico, mas também sob o ponto de vista da sua gestão. Entre as dificuldades para elaboração de planos eficientes de manejo de elasmobrânquios podemos considerar como os mais relevantes a escassez de dados de captura, desembarque e avaliação dos estoques em bases espécies-específicas. A ausência de dados históricos de captura por espécie tem gerando a impossibilidade de avaliar estoques e identificar populações e espécies inclusive as sobre-exploradas e potencialmente ameaçadas. Deve-se reconhecer que espécies individuais diferem em sua característica de história de vida e, portanto na sua susceptibilidade a exploração.

Considerando-se todos os parâmetros analisados entre os três clados, este estudo fornece fortes evidências para sustentar *R. terraenovae* e *R. porosus* como espécies biológicas distintas e apoiar a revisão taxonômica realizada por Springer (1964). Tendo sido avaliado uma importante parcela das áreas de ocorrência de *R. terraenovae* e *R. porosus* com amostragens populacionais representativas, pode-se sugerir também a distribuição alopátrica destas espécies delimitadas entre o Golfo do México e Norte do Caribe, corroborando com Springer (1964). Contudo, deve-se aceitar algum grau de sobreposição das distribuições geográficas na América Central, havendo ainda, a necessidade de análises populacionais mais detalhadas nesta região.

Referências

- Abercrombie DL, Clarke SC, Shivji MS (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genet*, 6, 755-788
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25, 4692-4693
- Bigelow HB, Schroeder WC (1948) *Fishes of the Western North Atlantic. Part one. Lancelets, cyclostomes, sharks.* Sears Foundation for Marine Research, Yale University, New Haven 576
- Carlin JL, Robertson DR, Bowen BW (2003) Ancient divergences and recent connections in two tropical Atlantic reef fishes *Epinephelus adscensionis* and *Rypticus saponaceus* (Percoidei: Serranidae). *Mar Biol* 143, 1057–1069
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate genegenealogies. *Mol Ecol* 9, 1657-1660
- Compagno LJV (1984) *FAO species catalogue Vol. 4, Part 2 Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date.* FAO Fisheries Synopsis, 125, 251-655
- Corrigan S, Huveneers C, Schwartz TS, Harcourt RG, Beheregaray LB (2008) Genetic and reproductive evidence for two species of ornate wobbegong shark *Orectolobus* spp. on the Australian east coast. *J Fish Biol* 73, 1662-1675
- De-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* 10, 197-199
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1, 47-50

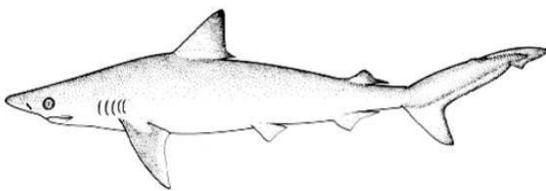
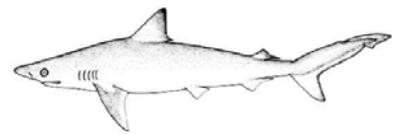
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet* 131, 479-491
- Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo, 343
- Hasegawa M, Kishino K, Yano T (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22, 160-174
- Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B* 270, 96-S99
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol Biol Evol* 8, 475-493
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinf* 17, 754-755
- Lopez JV, Culver M, Stephens JC, Johnson WE, O' Brien SJ (1997) Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol Biol Evol* 14, 277-286
- MacVector™ 6.5 1998. Oxford Molecular Ltd.
- MariguelaTC, De-Franco B, Almeida TVV, Mendonça FF, Gadig OBF, Foresti F, Oliveira C (2009) Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. *Conserv Genet Resour* 1, 393-396
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009a) 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
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009b) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropic Ichthyol* 7(2) 213-216
- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes, suggested by mitochondrial DNA sequence. *Nature*, 347(11) 550-553
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biol* 3, 2229-2238
- Moura T, Silva MC, Figueiredo I, Neves A, Muñoz PD, Coelho MM, Gordo LS (2008) Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation. *Mar Freshw Res* 59, 214-223
- Murgra B, Tola G, Archer SN, Vallerga S, Hirano J (2002) Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: Application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga), *Mar Biotech* 4, 119-126
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818
- Quattro J, Stoner D, Driggers W, Anderson C, Priede K, Hoppmann E, Campbell N, Duncan K, Grady J (2006). Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). *Mar Biol* 148, 1143-1155
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evol* 43, 223-225

- Rocha LA, Robertson DR, Roman J, Bowen BW (2005) Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proc. R. Soc. B* 272, 573-579
- Rocha-Olivares A, Rosenblatt RH, Vetter RD (1999) Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the Rockfish subgenus *Sebastomus* (Sbastes Scorpaenidae) based on Mitochondrial cytochrome b and control region sequences. *Mol Phylog Evol* 11(3) 441-458
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) *MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinf* 19, 1572-1574
- Sandoval-Castillo J, Rocha-Olivares A, Villavicencio-Garayzar C, Balrt E (2004) Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Mar Biol* 145, 983-988
- Shivji MS, Clarke S, Pank M *et al.* (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol*, 16, 1036-1047
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco
- Springer VG (1964) A revision of the carcharhinid shark genera *Scoliodon*, *Loxodon*, and *Rhizoprionodon*. *Proceedings of the US National Museum* 115, 559-632
- Swofford DL (2004) *PAUP - Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods*, version 4. Sunderland, MA, Sinauer Associates
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Science* 101, 11030-11035
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10, 512-526

- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotype associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genet*, 132, 619-633
- Ward RD, Holmes BH, White WT, Last PR (2008) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Mar Freshw Res*, 59, 57-71
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans Royal Soc B* 360, 1847-1857

Capítulo IV



Filogeografia e estrutura populacional do tubarão *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861).

Reviews in Fish Biology and Fisheries. Manuscrito submetido em setembro de 2010 - em análise.

Resumo

As espécies de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* desempenham papel central como predadores do sistema trófico costeiro, sendo um dos principais alvos da pesca em praticamente todo o mundo. Principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, *R. porosus* tem destaque nos desembarques da pesca costeira, colocando a espécie entre as mais exploradas na região. No entanto, informações a respeito do status destas populações e seus estoques permanecem insipientes, impedindo a elaboração de planos de exploração sustentável. Desta forma, no presente estudo foi buscado caracterizar a estrutura populacional de *R. porosus*, a partir de amostras obtidas em 10 diferentes áreas entre o Mar do Caribe até o extremo sul da costa brasileira (n=321 espécimes), utilizando sequências nucleotídicas da região controladora do DNA mitocondrial. As análises de 802 pb da região controle do DNA mitocondrial revelaram 53 haplótipos com uma forte estruturação genética entre as populações ($F_{ST} = 0,271$, $P < 0,0001$). Os resultados obtidos sugerem uma delimitação populacional com duas unidades distintas de manejo na América do Sul, separadas possivelmente pelas forças da Corrente Marítima do Equador. Ainda, eventos de expansão populacional e geográfica foram observados, bem como o número efetivo de fêmeas antes e após os eventos. Os eventos de expansão populacional foram datados a cerca de 275.000 anos atrás com o número de fêmeas chegando a 22.600.000 indivíduos distribuídos em toda a área de estudo.

Introdução

Utilizando marcadores moleculares presentes em população contemporâneas podem ser inferidos a estrutura genética e filogeográfica de espécies, processos históricos e de recolonização, locais de refúgio e pontos de estrangulamentos ou expansões demográficas (Avice 2000). Peixes marinhos de ampla distribuição, normalmente apresentam alta dispersão e baixos índices de estruturação populacional (Graves 1998; Heist 2004). As exceções a esse padrão de alta conectividade genética, invariavelmente, envolvem espécies que são sedentárias, têm distribuição disjunta, ou apresentam algum grau de filopatria (Grant & Waples 2000; Waples *et al.* 2001). Geralmente é aceito que entre as espécies marinhas com distribuições contínuas são esperados menores índices de diversidade genética quando comparados com aqueles que possuem distribuições descontínuas (Graves 1998). No entanto, apesar do grande número de estudos filogeográficos publicados durante as últimas duas décadas, as investigações sobre as relações genéticas e histórias evolutivas de populações de tubarões permanecem raras (Kenney & Heist 2006).

Apesar da grande relevância ecológica e econômica, estudos genético populacionais para espécies de tubarões ainda estão faltando. A este respeito as investigações mais recentes foram limitadas à parcelas restritas da distribuição geográfica de espécies costeiras (Keeney *et al.* 2005; Schultz *et al.* 2008; Mendonça *et al.* 2009) e espécies pelágicas (Pardini *et al.* 2001; Schrey & Heist de 2003; Castro *et al.* 2007; Chabot & Allen 2009).

Pertencente à família Carcharhinidae, as espécies do gênero *Rhizoprionodon* (Whitley 1929) habitam normalmente águas costeiras (Gadig 1994) e devido a sua ampla distribuição e hábitos associados à região litorânea desempenham papel central como predadores do sistema trófico e são alvo de pescarias realizadas em várias partes do

mundo. A predominância das capturas de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* em pescarias costeiras tem sido verificada em estudos em diversas partes do mundo (Codyand Avent 1980; Kasim, 1991; Simpfendorfer 1992; Grace & Henwood 1997; Castillo-Géniz *et al.* 1998). No Atlântico Ocidental a espécie *Rhizoprionodon porosus* (Poey 1861) ocorre desde o Caribe, incluindo as Bahamas, até o sul do Uruguai (Springer 1964; Figueiredo 1977; Compagno 1984) sendo uma das espécies de tubarões mais capturadas em pescarias costeiras em toda a sua faixa de distribuição. Contudo, estudos que demonstrem o estado populacional com informações relativas à viabilidade da exploração pesqueira são quase inexistentes, estando a espécie classificada como pouco preocupante pela IUCN Redlist (International Union for Conservation of Nature) com base em dados de distribuição e abundância, taxas reprodutivas e de crescimento (Lessa *et al.* 2009). No entanto, em uma região do litoral de São Paulo, sudeste brasileiro *R. porosus* foi classificada como abundante a pouco mais de 40 anos (Sadowsky 1967). Atualmente, nesta mesma área a ocorrência da espécie é considerada apenas como eventual o que pode evidenciar sua vulnerabilidade à atividade pesqueira. Ainda, segundo recomendações da IUCN, devido ao aumento nas capturas de tubarões em praticamente todo o mundo, e em particular, o aumento nas capturas artesanais, o estado de conservação de *R. porosus* deve ser monitorado.

Recentes declínios globais nas populações de tubarões têm chamado muito a atenção para os efeitos devastadores da sobre-exploração dos ecossistemas marinhos (Baum *et al.* 2003). No entanto, interpretações corretas e possíveis correções destes declínios exigem tanto o conhecimento demográfico quanto o genético. Assim, apresentamos aqui os resultados de um estudo a respeito da variabilidade genética da espécie *R. porosus* coletados desde o Mar do Caribe na Venezuela, até o extremo sul do Brasil, utilizando sequencias nucleotídicas do DNA mitocondrial. O objetivo do presente estudo foi buscar

informações que possam caracterizar a estrutura da populacional, bem como subsidiar estratégias de gestão para a exploração sustentável dessa espécie.

Material e Métodos

Caracterização das amostras, extração de DNA e sequenciamento

As amostras de *Rhizoprionodon porosus* foram obtidas em nove regiões da costa brasileira e em pontos do Mar do Caribe. Um total de 115 espécimes foram capturadas na costa sul brasileira (97 na costa do Estado do Rio de Janeiro, 9 em São Paulo, 4 no Paraná e 5 no Rio Grande do Sul), 85 espécimes na costa nordeste (45 amostras na costa do Estado do Rio Grande do Norte, 8 em Sergipe e 32 amostras na costa do Estado da Bahia) e mais 71 amostras na Região Norte do Brasil (41 espécimes na costa do Pará e 30 em regiões do Ceará). No Caribe, 50 espécimes foram coletados na Isla Margarita, Venezuela (Figura 1). Pequenas amostras de tecidos de cada espécime foram preservadas em etanol a 95%. Alguns exemplares inteiros, representando regiões amostradas, foram mantidas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista UNESP, São Paulo - Brasil.

O DNA genômico foi extraído de células epiteliais, usando o método de extração salina descrita por Aljanabi e Martinez (1997). As reações de amplificação da região controle foi realizada utilizando os primers D-loop F 5'-CTC CCA CCA AGA AAG TTC TG-3 e D-loopR 5'-GGC CGC TTA TGT AGG CTT CTT GG-3' descritos por Mendonça *et al.* (2009) utilizando 25 µl de solução com 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão da enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e 50 mM KCl), uma unidade da enzima Taq polimerase (Invitrogen) e 0,5 ng mM de primers. Cada ciclo de amplificação por PCR foi realizado basicamente pela desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com 35

repetições. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. Em seguida os produtos da PCR foram marcados com o BigDye versão Terminator Cycle Sequencing Kit 3,1 (Applied Biosystems, Inc.) e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. As sequências completas foram analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW Macvector-65 (1998) para a identificação de sítios polimórficos entre as espécies. As sequências de cada um dos haplótipos encontram-se depositadas no GenBank com número de acesso GU318244 a GU318296.

Análises populacionais

Para as análises populacionais foram calculadas as composições nucleotídica, diversidade das sequências, número de sites polimórficos e diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.01 de Excoffier & Schneider (2005). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.01 que utiliza a estatística F de Wright's (1951, 1965). A significância da F_{ST} - estatística é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.* 1992), com 1000 permutações. A hipótese de isolamento por distância foi avaliada utilizando o teste de Mantel (Mantel, 1967) implementado no software XLSTAT 2010. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões. A rede de haplótipos foi estimada utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000), que utiliza os métodos de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992).

Idade e tamanho populacional

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima, 1989) e Fu Fs (Fu, 1997) também foram feitos com o programa ARLEQUIN 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle de *R. porosus*. Para avaliar a história demográfica de *R. porosus* foi realizado o teste de distribuição das diferenças genéticas entre os pares de haplótipos de acordo com o modelo de expansão súbita (Mismatch distributions). Para o cálculo do tempo t decorrido desde a expansão, empregou-se a fórmula $t=\tau/2u$, onde t é o tempo decorrido desde o evento de expansão e u é a taxa global de evolução do haplótipo. Para estimar u multiplica-se a taxa de mutação por sítio por ano pelo número de nucleotídeos da molécula. Para o cálculo do tamanho populacional das fêmeas antes da expansão é utilizada a fórmula $Ne_0= \theta_0/2u$ e para o cálculo do tamanho populacional após a expansão usa-se $Ne_1= \theta_1/2u$. As taxas de mutação empregadas para a região controle foram de 0,8% por milhão de anos de acordo com Duncan *et al.* (2006).

Resultados

Caracterização e variabilidade das sequências

O sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de 321 indivíduos da espécie *R. porosus* resultou em 802 nucleotídeos analisáveis, com 22 sítios polimórficos originando 53 haplótipos. As frequências nucleotídicas observadas foram de A=0.306, T=0.352, C=0.209 e G=0.133. As diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) foram $h=0.881\pm 0.013$ e $\pi=0.00278$ respectivamente. O haplótipo (4) mais comum, compartilhado por 95 indivíduos, foi encontrado em todas as regiões estudadas, exceto entre os indivíduos do Paraná (Tabelas 1 e 2). As frequências haplotípicas e nucleotídicas totais apresentaram altos índices de diferenciação, sendo a maior diversidade observada

entre os indivíduos da Venezuela ($h=0.952$, $\pi=0.00414$) e a menor diversidade entre os indivíduos do Rio de Janeiro ($h=0.669$, $\pi=0.00166$) (Tabela 3).

Tabela 1. Sítios polimórficos da região controladora do mtDNA dos haplótipos da espécie *R. porosus*. Os diferentes haplótipos estão listados na coluna da esquerda e as posições dos sítios polimórficos apresentam-se na primeira linha.

Haplótipos	Sítios polimórficos																						
	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	5	6	6	6	6	6	7	7
	6	8	3	4	5	7	8	0	2	5	8	8	5	6	2	1	1	4	5	6	4	6	6
1	A	C	C	C	G	T	C	G	T	T	C	T	G	T	T	C	C	G	T	A	C	T	
2	.	T	.	T	A	C	T	A	.	A	T	
3	.	T	.	T	A	C	T	A	.	A	
4	C	
5	.	.	.	T	C	
6	.	.	.	T	C	A	T	
7	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	A	
8	.	T	.	T	A	.	.	.	C	.	.	.	A	
9	.	T	.	T	A	
10	A	.	.	.	C	.	.	.	A	
11	.	T	.	.	A	.	T	.	C	
12	A	.	.	.	C	.	.	.	A	A	
13	A	A	
14	.	T	.	.	A	.	T	.	C	
15	A	.	.	.	C	
16	.	.	.	T	C	
17	.	T	.	.	A	
18	.	T	C	
19	.	T	.	T	A	.	.	.	C	
20	.	.	.	T	A	.	.	.	C	
21	A	
22	C	T	
23	.	T	C	A	.	G	.	.	
24	.	T	.	T	A	.	.	.	C	T	
25	.	T	.	T	C	
26	.	T	T	.	A	.	.	.	C	
27	A	.	.	.	C	C	
28	.	.	.	T	
29	A	.	.	.	C	T	
30	.	.	T	.	A	
31	.	.	.	T	C	T	
32	.	.	T	.	A	.	.	.	C	
33	C	A	A	.	.	.	
34	A	.	.	.	C	
35	.	T	T	.	A	.	.	.	C	A	A	.	.	.	
36	.	T	C	A	A	.	.	.	
37	C	.	.	.	A	
38	.	T	.	T	A	.	.	.	C	
39	C	
40	.	.	T	C	
41	.	T	.	T	A	A	T	
42	A	
43	C	T	
44	C	.	.	.	A	.	A	
45	.	T	C	.	.	.	A	A	A	.	.	.	
46	C	T	
47	A	.	.	.	C	T	C	
48	C	A	A	.	.	.	
49	C	A	
50	C	.	.	.	A	A	A	.	.	.	
51	C	.	.	.	A	A	A	.	T	.	
52	A	
53	C	.	.	.	A	.	A	.	.	A	A	.	.	.	

Tabela 2. Distribuição geográfica dos haplótipos de *R. porosus* com os números de indivíduos de cada região. Em negrito estão os haplótipos exclusivos de cada área amostrada. CB, Caribe; PA, Pará; CE, Ceará; RN, Rio Grande do Norte; SE, Sergipe; BA, Bahia; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul.

Haplotypes	CB	PA	CE	RN	SE	BA	RJ	SP	PR	RS
1	4	.	.	16	.	.	17	3	.	.
2	3
3	1
4	6	6	3	4	1	14	53	3	.	5
5	4	.	3	.	4	5
6	1
7	4
8	2
9	1
10	1
11	3
12	1
13	2
14	4
15	5	3	13	2	3	2	1	.	.	.
16	2
17	1
18	2	.	2	2	.	1
19	1	8	.	1
20	1	.	3	11	.	1
21	1
22	.	1	.	.	.	4
23	.	2
24	.	3
25	.	4
26	.	1
27	.	2
28	.	1	.	.	.	2
29	.	2	.	.	.	2
30	.	1	.	2
31	.	1
32	.	1	.	2
33	.	2
34	.	1
35	.	1
36	.	1
37	.	.	2	.	.	.	2	.	2	.
38	.	.	1
39	.	.	.	4
40	.	.	.	1	.	.	1	.	.	.
41	1
42	1	.	.	.
43	1	.	.	.
44	6	1	.	.
45	1	.	.	.
46	2	.	.	.
47	1	.	.	.
48	2	.	.	.
49	1	.	.	.
50	3	1	2	.
51	1	.	.	.
52	4	.	.	.
53	1	.	.
Total	50	41	30	45	8	32	97	9	4	5

Tabela 3. Estatísticas populacionais de *R. porosus*: n , tamanho amostral; N , número de haplótipos; h , diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; D , teste Tajima; P , P valor do teste de Tajima; F_S , teste de F_S de Fu; P_{FS} , P valor do teste de F_S ; τ , tau; θ_0 , valor de theta inicial; valor de theta no tempo presente; N_{t0} , número de fêmeas antes da expansão; N_{t1} , número de fêmeas depois da expansão; Idade pop, Idade atual das populações em anos. As idades das populações são indicadas com 95% de intervalo de confiança de τ em populações com tamanho amostral suficiente para 1000 replicações.

População	Localidades	n	N	h	π	D	F	F_S	P_{FS}	τ	θ_0	θ_1	N_{t0}	N_{t1}	Idade pop
I	Caribe	50	21	0.952	0.0041	1.027	0.864	-10.214	0.000	3.002	0.110	354.37	14.779	46.623.742	403.355
	Pará	41	18	0.928	0.0033	0.417	0.707	-9.845	0.001	2.945	0.031	690.230	4.165	92.736.907	395.697
	Ceará	30	8	0.789	0.0018	0.501	0.731	-2.332	0.092	1.691	0.071	94.86	9.707	12.745.614	227.206
II	Rio G. Norte	45	10	0.807	0.0023	0.995	0.862	-2.389	0.117	2.541	0.002	8.45	268	1.135.362	341.414
	Sergipe	8	3	0.679	0.0013	1.621	0.979	0.390	0.518	1.781	0.004	6.24	546	838.421	239.299
	Bahia	32	9	0.778	0.0018	-0.087	0.943	-3.393	0.024	1.350	0.003	770.190	403	103.484.553	181.389
	Rio de Janeiro	97	16	0.669	0.0016	-1.206	0.097	-9.845	0.000	0.951	0.613	3.85	82.364	517.295	127.778
	São Paulo	9	5	0.833	0.0022	0.845	0.806	-1.112	0.138	2.117	0.011	12.89	1.477	1.731.930	284.445
	Paraná	4	2	0.667	0.0008										
Rio G. Sul	5	1	0.0000	0.0000											
Total		321	53	0.8813	0.00278	0.574	0.749	-26.841	0.000	2.016	0.158	162.812	21.229	21.876.881	270.874

Estrutura populacional

Na estimativa de diferenciação genética pelo método de Análise de Variância Molecular (AMOVA) observa-se uma forte estruturação entre todas as localidades estudadas ($F_{ST}=0.271$, $P>0.0001$). Na análise de estruturação a partir de comparações aos pares observa-se uma tendência ao aumento da diferenciação genética ao passo que as distâncias geográficas aumentam. A maior diferenciação é observada nas comparações entre os indivíduos da região do Estado do Paraná, na região Sul do Brasil, e as demais localidades. Contudo ressalta-se o pequeno número de amostras obtido nesta região, e desta forma, os haplótipos compartilhados por outras regiões podem não ter sido encontrados nesta localidade. Com exceção das comparações entre as amostras da região do Paraná, o maior distanciamento genético observado foi entre espécimes coletados na região do Pará e Rio de Janeiro (Tabela 4). Nos testes de Mantel, que correlacionam distâncias genéticas com as distâncias geográficas, o isolamento por distância foi significativo ($r=0.343$, $P<0.023$) quando todos os locais de amostragem foram comparados (Figura 2a). Excluindo as amostras do Paraná o índice de significância para as distâncias geográficas versus distâncias genéticas foram ainda maiores ($r=0.605$, $P <0.0001$) (Figura 2b).

Tabela 4. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de populações de *R. porosus*. Nível de significância de $p<0,05$ em 1000 permutações, *dados não significativos.

	CB	PA	CE	RN	SE	BA	RJ	SP	PR	RS
CB	-									
PA	0.0638	-								
CE	0.0599	0.0460	-							
RN	0.1214	0.1611	0.1630	-						
SE	0.1033	0.0855	0.0016*	0.0947	-					
BA	0.1558	0.1423	0.1498	0.1162	0.0258 *	-				
RJ	0.2509	0.2986	0.2449	0.1585	0.2120	0.1099	-			
SP	0.2445	0.2523	0.2921	0.1625	0.2688	0.1776	0.0228 *	-		
PR	0.2931	0.3808	0.4959	0.4515	0.5992	0.4726	0.3990	0.2199 *	-	
RS	0.2828	0.2581	0.2081	0.1978*	0.2815	0.0913 *	0.0330 *	0.1033 *	0.4058	-

Nas análises por hipóteses de cenários de estruturação foi observada uma maior diferenciação quando as diversas localidades de coleta foram agrupadas seguindo o padrão de bifurcação da Corrente Marítima do Equador que se movimenta vindo do continente africano, no sentido de leste para oeste e atinge a costa brasileira na região do Estado do Rio Grande do Norte, na costa extremo oriental da América do Sul. Neste ponto a Corrente Marítima do Equador se divide em Corrente Equatorial Norte e Corrente do Brasil (hipótese 2 da Tabela 5) com os indivíduos amostrados na Venezuela, Pará e Ceará formando um agrupamento ao norte da corrente marítma do Equador (População I) e os indivíduos do Rio Grande do Norte agrupados com o restante dos indivíduos coletados no nordeste e sul do Brasil, formando um agrupamento sul (População II). Na rede de haplótipos originada pelo TCS 1.13 (Figura 1) considerando apenas 2 agrupamentos se observa regiões que compartilham alguns dos haplótipos mais comuns, mostrando algum grau de relacionamento entre as populações. Contudo, é notória a diferenciação entre os haplótipos restritos à sua área de coleta, situados nas extremidades superior e inferior da rede haplotípica, além da tendência apresentada entre os haplótipos compartilhados a uma maior frequência também relacionada à sua área de coleta.

Tabela 5 Valores da AMOVA para os cenários de estruturação testados ($P < 0,05$). CB, Caribe; PA, Pará; CE, Ceará; RN, Rio Grande do Norte; SE, Sergipe; BA, Bahia; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul.

	Hipóteses de estruturação	F_{ST}	P	% of variation
<i>2 populações</i>				
1	CB X PA+CE+RN+SE+BA+RJ+SP+PR+RS	0.062	0.188	15.09
2	CB+PA+CE X RN+SE+BA+RJ+SP+PR+RS	0.237	0.008	9.18
3	CB+PA+CE+RN X SE+BA+RJ+SP+PR+RS	0.106	0.020	10.25
4	CB+PA+CE+RN+SE+BA+RJ X SP+PR+RS	0.075	0.058	15.28
<i>3 populações</i>				
5	CB X PA+CE+RN X SE+BA+RJ+SP+PR+RS	0.091	0.031	10.24
6	CB+PA+CE X RN+SE+BA+RJ X SP+PR+RS	0.121	0.000	8.85
<i>4 populações</i>				
7	CB X PA+CE X RN+SE+BA+RJ X SP+PR+RS	0.134	0.003	8.55
8	CB+PA+CE X RN+SE+BA+RJ X SP+PR X RS	0.121	0.000	8.80

Figura 1. Rede de haplótipos com o agrupamento das localidades de coleta formando duas grandes áreas geográficas. Todos os haplótipos são separados por uma mutação e os círculos sólidos em preto representam haplótipos hipotéticos não observados neste estudo. Os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequências dos haplótipos. Os círculos numerados em branco e cinza em torno da área de estudo representam o total de amostras analisadas em cada localidade. CB, Caribe; PA, Pará; CE, Ceará; RN, Rio Grande do Norte; SE, Sergipe; BA, Bahia; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul.

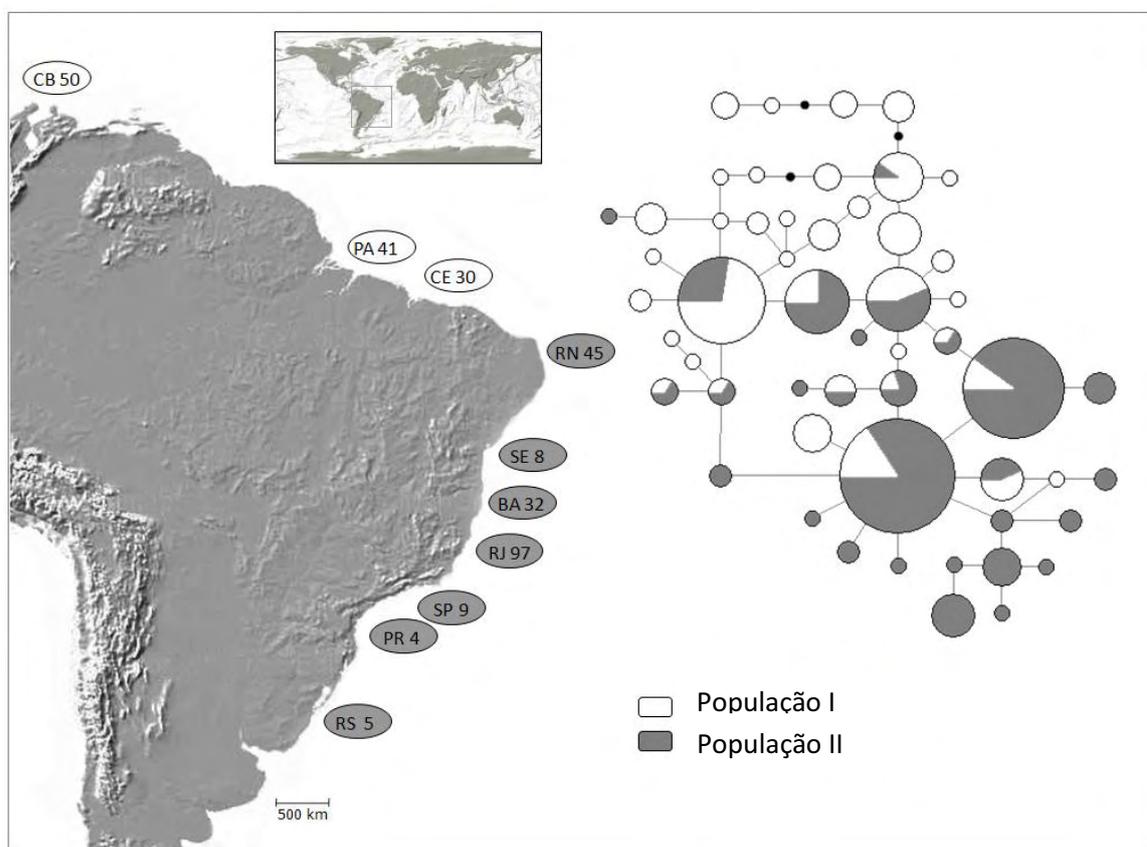
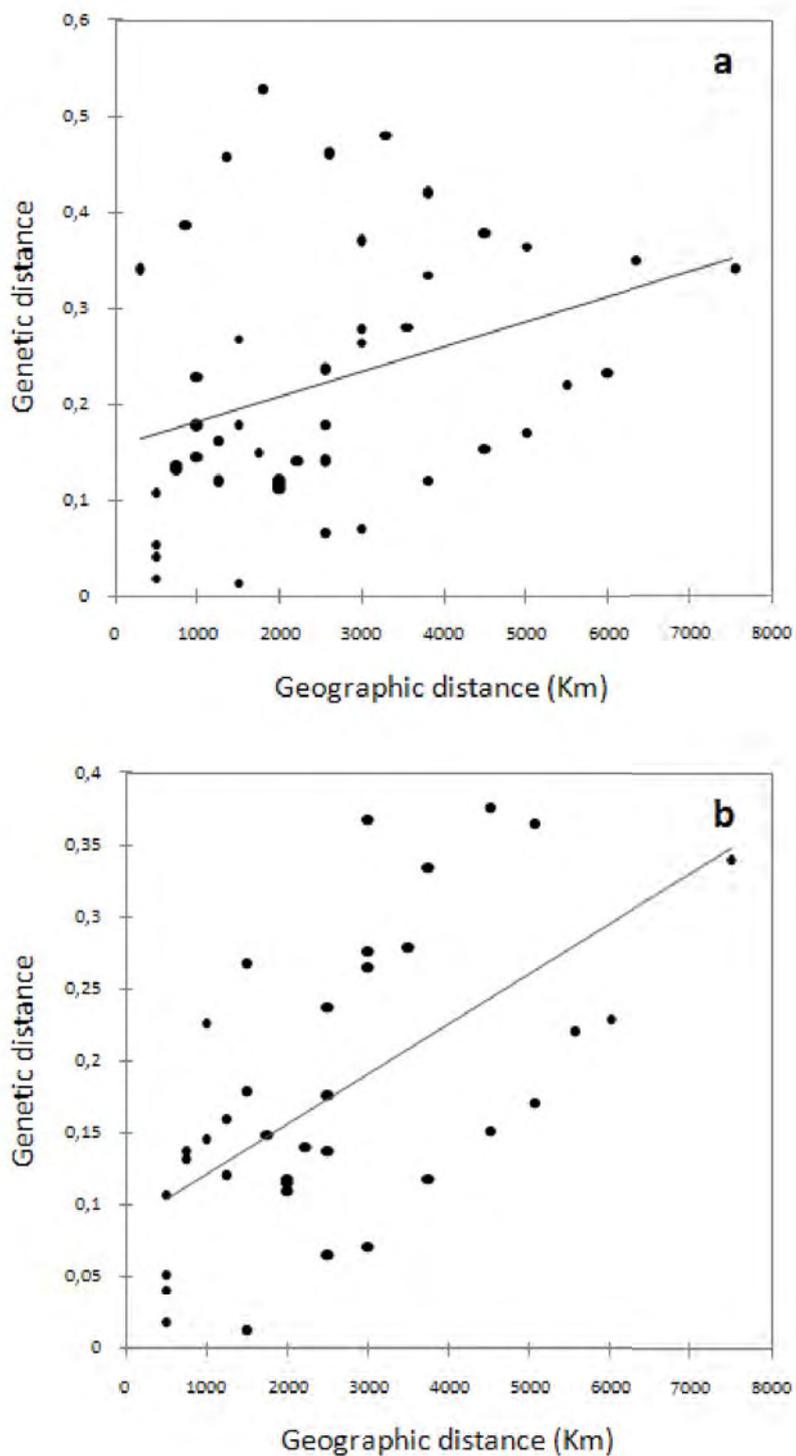


Figura 2. Isolamento por distância baseado em todas as localidades (a) e com a exclusão das amostras do Estado do Paraná (b). Distâncias geográficas x distâncias genéticas através de correlação de Pearson com 10.000 permutações.



Idade e tamanho populacional

Nos teste de Tajima D e F_s de Fu entre as populações de *R. porosus* foi revelado um desvio significativo da hipótese de neutralidade entre os tubarões da Venezuela, Pará, Bahia e Rio de Janeiro. Utilizando os parâmetros τ , θ_0 e θ_1 , calculados na análise de distribuição das diferenças foi possível estimar o tempo decorrido desde o evento de expansão, bem como os tamanhos populacionais antes e após o evento. Em duas das localidades amostradas, Paraná e Rio Grande do Sul, obteve-se um pequeno número amostral ($n < 6$) impossibilitando a análise de todos os parâmetros relacionados à idade e tamanho populacional. Nas demais localidades, os testes F_s de Fu apresentaram resultados significativos para os indivíduos do Caribe, Pará, Bahia e Rio de Janeiro e a hipótese de distribuição unimodal foi aceita para todas as localidades amostradas (Tabela 3, Figura 3). Por não haver, até o momento, dados sobre idade e crescimento para a espécie *R. porosus* os tamanhos populacionais foram calculados de acordo com tempo de geração estimado para *R. terraenovae* (5,8 anos) apresentado por Márquez-Farias & Castillo-Geniz (1998).

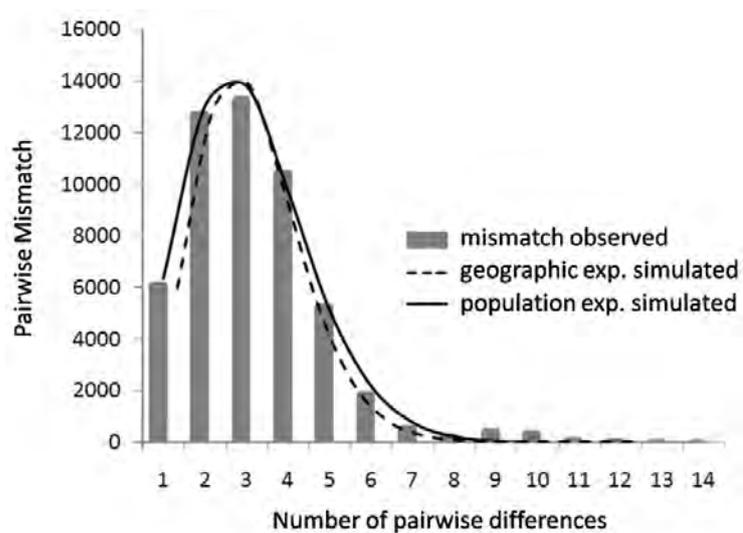
Nos três conjuntos de dados foi evidenciada a existência de eventos de expansão populacional e geográfica. Os padrões de distribuição propostos pela análise e Mismatch Distribution resultaram em curvas unimodais com a média das diferenças muito próximas de zero. Com a análise total das populações pode-se sugerir um período de expansão populacional para o gênero *Rhizoprionodon* na América do Sul a cerca 270.000 anos com a data mais recente a 127.000 anos e a mais antiga a 403.000 anos atrás. Simulações de Mismatch Distribution e testes de neutralidade também foram realizados agrupando as populações de acordo com a Corrente Norte Equatorial e a Corrente do Brasil (em direção Sul) (Tabela 6). Em ambos os casos foi observado curvas unimodais com as médias de diferenças próximas de zero. Para os tubarões influenciadas pela Corrente Norte do Equador (População I) o período de expansão foi estimado em cerca de 355.000 anos e

para as populações influenciadas pela Corrente do Brasil (População II) o período de expansão foi estimado a aproximadamente 188.000 anos atrás.

Tabela 6. Distribuição Mismatch e testes de neutralidade. D , teste Tajima; P , P valor dos testes de Tajima; F_S , teste de F_S de Fu; P_{FS} , P valor do teste F_S ; τ , tau; Idade, tempo estimado da expansão populacional.

População	D	P	F_S	P_{FS}	τ	Idade
I	-0.352	0.433	-26.631	0.000	2.644	355.254
II	-0.946	0.181	-21.860	0.000	1.640	188.107

Figura 3. Curva de Distribuição Mismatch entre todas as populações de *R. porosus* para as hipóteses de expansão populacional e geográfica.



Discussão

Entre populações de peixes marinhos, as análises genéticas normalmente revelam uma tendência a baixos níveis de estruturação populacional ao longo das plataformas continentais e alta dispersão entre as populações (Grant & Bowen, 1998; Waples 1998). Por outro lado, o fluxo gênico é frequentemente menor entre os peixes com distribuições disjuntas (Graves 1998).

Atualmente, um crescente banco de dados indica haver diferenciações genéticas significativas em populações de elasmobrânquios (Gardner & Ward 1998; Pardini *et al.* 2001; Keeney *et al.* 2003, 2005; Schrey & Heist 2003; Kenney & Heist 2006; Chabot & Allen 2009). A esse respeito, o comportamento filopátrico pode ser um componente importante em elasmobrânquios (Hueter 1998; Hueter *et al.* 2002). No entanto, principalmente devido aos desafios logísticos na aquisição de amostras genéticas e as dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de estudos de marcação e identificação de áreas de nascimento, tais aspectos permanecem praticamente desconhecidos para os elasmobrânquios (Duncan *et al.* 2006).

Os tubarões *R. porosus* são amplamente distribuídos ao longo da costa Leste Americana, já sendo conhecida sua dependência às áreas costeiras de berçário. Fator que também pode ser relacionado à estruturação populacional. Para as espécies do gênero *Rhizoprionodon* três áreas do berçário foram identificados ao longo da costa brasileira, duas no sul do Brasil, no estado de São Paulo, para *R. porosus* e *R. lalandii* (Motta, 2004), e no litoral de Santa Catarina para *R. lalandii* (Mazzoleni, 2006), e uma no norte ao longo da costa do Rio Grande do Norte, para a espécie *R. porosus* (Yokota & Lessa 2006). Considerando a possibilidade de que esses tubarões sejam fiéis aos locais de nascimento, tem-se uma condição que deve favorecer o desenvolvimento de populações peripátricas.

Pelas análises de variância molecular entre toda a área de estudo foi observado uma forte estruturação populacional para a espécie de tubarão *R. porosus*. Nas análises feitas entre os pares de populações observa-se que, de modo geral, as taxas de divergências genéticas tendem a aumentar de acordo com o distanciamento geográfico, caracterizando o isolamento por distância. Utilizando hipóteses de cenários de estruturação foi observada a maior diferenciação genética quando as populações foram agrupadas de acordo com o padrão de bifurcação da Corrente Marítima do Equador e desta forma, os padrões de migração da espécie parecem estar associados também às pressões de dinâmicas oceânicas.

A observação de uma barreira zoogeográfica para o king weakfish produzida pelas correntes marítimas opostas e divergentes na América do sul também foi descrita por Santos *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2006) usando o gene ribossomal 16S e o gene mitocondrial Citocromo *b*. Divergências nucleotídicas foram observadas entre os clados das regiões tropicais e subtropicais na América do Sul.

Barreiras biogeográficas marinhas têm sido reconhecidas há décadas, sendo as quebras nas composições de fauna e os níveis de endemismos utilizados para designar unidades geográficas ou "províncias zoogeográficas". Em habitats marinhos tropicais, apenas algumas barreiras zoogeográficas são aparentemente bem estudadas (Rocha *et al.* 2007). Sobre outras reconhecidas barreiras geográficas na costa Atlântica da América do Sul, ressalta-se a descarga do Rio Amazonas como a única barreira importante na separação das populações de peixes e outros organismos entre o Caribe e o Brasil (Gilbert, 1977; Rocha 2003; Rocha *et al.* 2005). Tal consideração se deve principalmente ao aporte do Rio Amazonas, que altera drasticamente as condições da plataforma continental, principalmente com relação à salinidade e matéria orgânica em suspensão. No entanto, destaca-se os valores de diferenciação populacional entre os indivíduos de *R. porosus* da

Venezuela e do Estado do Pará e entre Venezuela e Ceará, onde se observa não haver distanciamento genético que caracterize restrições ao fluxo gênico, sendo estes valores os mais baixos nas comparações entre pares. Uma hipótese possível para a alta taxa de migração dos tubarões entre as regiões norte do Brasil e sudeste caribenho pode ser atribuída à produtividade primária produzida pelo Rio Amazonas, que estaria agindo como atrativo para estas espécies, opostamente a limitação às migrações.

Uma observação semelhante pode ser feita entre os tubarões capturadas na região do extremo norte do Estado do Rio de Janeiro e as demais populações da região sul do Brasil. Devido ao evento de ressurgência produzido pela Corrente de Água Tropical e Água Central do Atlântico Sul na região central do Estado do Rio de Janeiro (Silva 1968), observa-se na plataforma continental temperaturas em torno de 16° C o que poderia determinar restrições ao fluxo gênico para algumas espécies. No entanto, os valores de F_{ST} para as comparações entre os espécimes de *R. porosus* do Rio de Janeiro e as demais amostras da região sul do Brasil demonstram não haver uma barreira efetiva. Esse fato também pode estar associado à produtividade primária presente em abundância nos eventos de ressurgência.

A análise de distribuição das diferenças vem sendo muito utilizada como ferramenta na detecção de eventos de expansão populacional e na datação desses eventos (Ostbye *et al.* 2005; Santos *et al.* 2006; Crottini *et al.* 2007). Contudo, esta análise apresenta como um problema a magnitude da expansão (θ_0 e θ_1) por possuir um intervalo de confiança altamente conservador, tornando os tamanhos populacionais das fêmeas superestimados (Schneider e Excoffier, 1999). Apesar de atraentes, as estimativas de tamanhos populacionais devem ser interpretadas com cautela, principalmente quando aplicados em programas de controle da pesca. Neste estudo, a estimativa do relógio

molecular utilizado (0,8% extraído de Duncan *et al.* 2006) deve ser visto apenas como uma aproximação.

Muitos autores sugerem que as glaciações do Pleistoceno compreenderam os eventos mais importantes para moldar os padrões filogeográficos, expressos no DNA mitocondrial e estruturação populacional, de espécies de peixes marinhos (Brunner *et al.* 2001; Planes *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002; Grunwald *et al.* 2002). De modo geral, neste estudo, para as hipóteses de expansão demográfica e geográfica, as topologias foram bastante semelhantes, sugerindo que os eventos de expansão possam ter ocorrido concomitantemente durante o período Pleistocênico Médio. Quando as populações foram analisadas conforme a distribuição em duas populações houve uma diferença significativa nos períodos estimados de expansão, tendo o evento mais antigo ocorrido na População I e o evento mais recente ocorrido na População II. Os altos valores negativos para o índice de F_s de F_u 's (Fu 1997) corroboram com a hipótese de expansão populacional recente e a alta diferença entre os períodos estimados entre as duas populações pode ser também um indício da diferenciação entre as populações destas duas áreas.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho avaliando os níveis de estruturação populacional da espécie *R. porosus*, com os dados apresentados por Heist *et al.* (1996) a respeito das populações de *R. terraenovae* (Atlantic sharpnose shark) na costa Atlântica dos EUA e oeste do Golfo do México, além dos resultados obtidos por Mendonça *et al.* (2009), que estudaram a dinâmica populacional de *R. lalandii* na região sul da costa brasileira, pode-se sugerir um padrão de diferenciação populacional para os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* na costa Atlântica Ocidental, relacionado à correntes marítimas, ocupação de áreas de berçários e principalmente ao distanciamento geográfico. Nos trabalhos de Heist *et al.* (1996) e Mendonça *et al.* (2009) não foram caracterizadas estruturas populacionais com estoques reprodutivos definidos. Contudo, estes trabalhos

foram realizados em áreas costeiras mais restritas e mesmo assim evidenciaram uma correlação significativa entre o distanciamento genético e geográfico. Ainda, em um estudo realizado por Mendonça *et al.* (ainda não publicado) foram analisadas populações da espécie *R. lalandii* entre as regiões do Caribe e sul do Brasil e assim como observado para *R. porosus*, os sinais de estruturação genética foram relacionados ao distanciamento geográfico e às correntes marítimas opostas e divergentes, caracterizando a mesma disposição de populações distintas. Talvez esta hipótese também seja válida para outras espécies de tubarões costeiros de pequeno porte que apresentem características biológicas, de abundância e distribuição semelhantes. Entretanto, conforme já mencionado, estudos a respeito da estruturação genética de tubarões são raros, sobretudo com relação aos tubarões costeiros. Desta forma, a formulação de hipóteses englobando diferentes áreas de ocorrência e até mesmo outras espécies, deve ser tratada com cuidado.

Conservação

Estudos filogeográficos que apresentam amostragens abrangendo escalas geográficas apropriadas, incluindo habitats com características ecológicas diferentes (como a oceânica e continental, tropical ou subtropical) têm uma chance ainda maior de detecção de unidades evolutivamente significativas, possibilitando o desenvolvimento e aplicação de medidas de conservação adequadas (Rocha *et al.* 2007).

Embora seja evidente a existência de certo grau de relacionamento entre as populações, pode-se assumir que os resultados apresentados pelas análises com base nos índices de F_{ST} para as espécies *R. porosus* evidenciam um sinal de diferenciação, com estruturação populacional e as distâncias genéticas sendo moduladas, possivelmente, pelo distanciamento geográfico, pelas correntes marítimas e por um possível comportamento filopátrico. Estes resultados sugerem a existência de 2 duas unidades básicas de manejo e,

ainda que apresentem um grau de relacionamento entre as populações destes dois grupos, devem ser tratadas como estoques diferenciados, sendo a primeira delimitada entre a costa norte do Rio Grande do Norte e a extensão de ocorrência da espécie em direção ao Caribe (Estoque da Corrente Norte) e a outra entre o lado nordeste do Rio Grande do Norte e toda a extensão de ocorrência da espécie em direção ao sul da costa Sul Americana (Estoque da Corrente do Brasil).

Embora o tamanho efetivo de fêmeas da população de *R. porosus* possa parecer grande, a dificuldade em obter exemplares desta espécie de tubarão no sul do Brasil provavelmente reflete o impacto da sobrepesca local. A conservação das regiões estuarinas e de berçários e o controle adequado da exploração pesqueira, incluindo-se a de pequena escala, são fundamentais para prevenir a extinção local, pois, dada a natureza costeira do gênero *Rhizoprionodon*, é improvável que esgotadas as populações, estas sejam repostas pela dispersão em curto ou médio prazo. Conectividades genéticas entre populações marinhas podem não ser suficientes para reconstruir o empobrecido populacional e mesmo populações ligadas por alguns migrantes ainda podem ser isoladas por muitas gerações em termos de biomassa (Waples 1998).

Espera-se que este trabalho possa ter repercussões significativas para a gestão da atividade pesqueira e iniciativas de conservação, como a delimitação de estoques biológicos para a pesca viabilizando a gerência eficiente por espécie e possivelmente, auxiliar no estabelecimento de quotas de captura adequadas para cada região.

Referências

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- 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. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 65–73.
- Brunner PC, Douglas MR, Osinov A, Wilson CC, Bernatchez L (2001) Holartic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 55, 573–586.
- Castillo-Géniz, J.L., Márques-Farias, J.F., Rodríguez De La Cruz, M.C., Cortés, C., CidDel Prado, A., 1998. The Mexican artisanal shark fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Mar. Freshwater Res.* 49, 611–620
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG *et al.* (2007) Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology*, 16, 5183–5192.
- Chabot CL, Allen LG (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Molecular Ecology*, 18: 545-552
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate genegenealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.

- Cody, T.J., Avent, R.M., 1980. Assessment of bottom longline fishing off the central Texas coast. Manage. Data Ser. Tex. Parks Wildl. Dep. 32.
- Compagno LJV (1984) FAO Species Catalogue. Vol. 4. Parts 1 & 2, Sharks of the world. FAO Fisheries Synopsis, p. 125.
- Crottini A, Andreone F, Kosuch J (2007) Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology*, 16, 2734–2754.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, de Couet GH (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239–2251.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Figueiredo. J.L. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo. 1977. 104 p.
- Fu YX (1996) Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics*, 144, 829–838.
- Gadig. O.B.F. 1994. Fauna de tubarões da costa Norte/Nordeste do Brasil (Chondrichthyes: Elasmobranchii). João Pessoa. 330 p. Dissertação de Mestrado em Zoologia. Universidade Federal da Paraíba.
- Gardner MG, Ward RD (1998) Population structure of the Australian gummy shark (*Mustelus antarcticus* Gunther) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and vertebrae counts. *Marine and Freshwater Research*, 49, 733–745

- Gilbert, C.R. 1967 A revision of the hammerhead sharks (Family Sphyrnidae). Proc. U.S. Natl. Mus. 119:1-88.
- Grace, M., Henwood, T., 1997. Assessment of the distribution and abundance of coastal sharks in the U.S. Gulf of Mexico and Eastern Seaboard, 1995 and 1996. Mar. Fish Rev. 59 (4), 23–32.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity, 89, 415–426.
- Grant WS, Waples RS (2000) Spatial and temporal scales of genetic variability in marine and anadromous species: implications for fisheries oceanography. In: Fisheries Oceanography: an Integrative Approach to Fisheries Ecology and Management (eds Harrison P, Parsons TR), pp. 61–93. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Graves JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. Journal of Heredity, 89, 427–437.
- Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R, Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. Molecular Ecology, 11, 1885–1898.
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology, 66, 591–600.
- Heist EJ (2004) Genetics of sharks, skates, and rays. In: Biology of Sharks and Their Relatives (eds Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR), pp. 471–485. CRC Press, New York.
- Heist EJ, Musick JA, Graves JE (1996) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis

of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 583–588.

Hueter RE (1998) Philopatry, natal homing and localized stock depletion in sharks. *Shark News*, 12, 1–2.

Hueter RE, Heupel MR, Heist EJ, Keeney DB (2002) The implications of philopatry in sharks for the management of shark fisheries. Northwest Atlantic Fisheries Organization Scientific Council Meeting, Serial no. N4744, NAFO SCR Doc. 02/122. From the IUCN/SSC Shark Specialist Group, Nature Conservation Bureau Ltd, Berkshire, UK.

Kasim, H.M., 1991. Shark fishery of Veraval coast with special reference to population dynamics of *Scoliodon laticaudus* (Müller and Henle) and *Rhizoprionodon acutus* (Ruppell). *J. Mar. Biol. Assoc. India* 33, 213–228.

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.

Keeney DB, Heupel M, Hueter RE, Heist EJ (2003) Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 143, 1039–1046.

Keeney DB, Heupel M, Hueter RE, Heist EJ (2003) Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 143, 1039–1046.

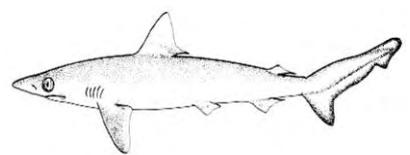
Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*)

- nurseries in the north western Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923.
- Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the north western Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923.
- Lessa, R., Quijano, S.M., Santana, F.M. & Monzini, J. 2006. *Rhizoprionodon porosus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2.
- Márquez-Farias JF & Castillo-Geniz LC (1998) Fishery biology and demography of the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the southern Gulf of Mexico. *Fisheries Research*, 2, 183-198.
- 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
- Ostbye K, L Bernatchez, TF Næsje, M Himberg & K Hindar (2005) The evolutionary history of European whitefish (*Coegonus lavaretus* L.) as inferred from mtDNA phylogeography and gillraker numbers. *Molecular Ecology* 14: 4371-4387.
- Pardini AT, Jones CS, Noble LR *et al.* (2001) Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412, 139–140.
- Planes S, Doherty PJ, Bernardi G (2001) Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the great barrier reef and the coral sea. *Evolution*, 55, 2263–2273.
- Rice WR (1989) Analyzing Tabelas of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.

- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr* 30:1161–1171.
- Rocha LA, Craig MT, Bowen BW (2007) Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. *Coral Reefs* 26:501–512.
- Rocha LA, Robertson DR, Rocha CR *et al.* (2005) Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14, 3921–3928.
- Sadowsky, V. 1967. Selachier aus dem litoral von São Paulo, Brazil. *Beiträge zur Neotropischen Fauna*, 5: 71-88.
- Santos S, Hrbek, Farias IP, Schneider H, Sampaio I (2006) Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology* 15, 4361–4373
- Santos S, Schneider H, Sampaio I (2003) Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 151–161.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1079–1089.
- Schrey AW, Heist EJ (2003) Microsatellite analysis of population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60, 670–675.
- 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

- Silva, P M C da (1968). O fenômeno ressurgência na costa meridional brasileira. *Publicações Inst. pesq. Mar*, 24: 1 – 31.
- Simpfendorfer CA, Milward NE (1993) Utilization of a tropical bay as a nursery area by sharks of the families Carcharhinidae and Sphyrnidae. *Environmental Biology of fishes*, 37, 337–345.
- Simpfendorfer, C.A., Milward, N.E., 1993. Utilization of a tropical bay as a nursery area by sharks of the families Carcharhinidae and Sphyrnidae. *Environ. Biol. Fishes* 37, 337–345.
- Springer. V.G.A. (1964) A revision of the Carcharhinidae shark genera *Scoliodon*, *Loxodon*, and *Rhizoprionodon*. *Proc. U. S. Natl. Mus.* v. 115(3493). p. 559-632.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526. Templeton *et al.* 1992;
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Waples RS, Gustafson RG, Weitkramp LA *et al.* (2001) Characterizing diversity in salmon from the Pacific Northwest. *Journal of Fish Biology*, 59, 1–41.
- Yokota L & Lessa RP (2006) Nursery area for sharks and rays in Northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75:349-360.

Capítulo V



Diversidade e Estruturação populacional do tubarão *Rhizoprionodon lalandii* (Müller & Henle, 1839).

Reviews in Fish Biology and Fisheries. Manuscrito submetido em Junho de 2010 - Em análise.

Resumo

Atualmente a pesca de tubarões em todo o mundo vem levando diversas espécies a declínios populacionais sem precedentes, colocando diversas espécies nas listas de risco de extinção. No Atlântico oeste, principalmente na costa brasileira, a espécie *Rhizoprionodon lalandii* merece especial atenção, compreendendo cerca de 50% das espécies de tubarões costeiros capturados. No entanto, dados para a avaliação destas populações e sua exploração sustentável são escassos na literatura, estando a espécie atualmente sem classificação na lista de espécies ameaçadas da IUCN. Assim, neste estudo foram analisadas populações de *R. lalandii* distribuídas entre a costa do Caribe e extremo sul do Brasil utilizando sequências da região controle do mtDNA. Nas análises de variância molecular foi observada uma forte estruturação entre populações do Caribe e as demais populações da costa brasileira ($F_{ST}=0.254$, $P>0.0001$) com importantes diferenças nas taxas de diversidade genética entre as populações. Os dados obtidos sugerem que os padrões de diferenciação genética das populações de *R. lalandii* estejam relacionados aos regimes das correntes marítimas que ocorrem na área de distribuição da espécie formando estoques reprodutivos diferenciados, devendo estes serem considerados como unidades distintas para programas de controle e manejo da pesca.

Introdução

De acordo com os planos mais recentes para a gestão da pesca no Atlântico os tubarões são divididos em três categorias: tubarões pelágicos, grandes espécies costeiras e as pequenas espécies costeiras (Poffenberger 1999). De modo geral, as capturas de pequenas espécies costeiras ainda não são regulamentadas. Tal fato é devido principalmente porque na maioria dos países, considera-se que estas espécies apresentam parâmetros e história de vida que prevêm uma taxa relativamente alta de recrutamento. No entanto, para a gestão adequada de uma espécie, além das estimativas dos estoques e taxas de recrutamento, é necessário também compreender as características de estrutura populacional da espécie. Atualmente o número de estudos sobre a estrutura genética de populações de tubarões e raias é bastante reduzido, contrastando com o aumento do número de elasmobrânquios capturados, a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção e a falta de conhecimento adequado para a sustentabilidade e manejo das espécies exploradas (Mendonça *et al.* 2009b).

O gênero *Rhizoprionodon* (Whitley 1929) é representado em todo o mundo por sete espécies de tubarões costeiros de pequeno porte, pertencentes à família Carcharhinidae (Compagno 1984). Devido à sua abundância e hábitos, esses tubarões são capturados em várias partes do mundo, sendo sua importância local relatada por diversos autores (Sadowsky 1967; Lessa 1986, Grace e Henwood 1997; Géniz Castillo *et al.* 1998). Dentre estes, *Rhizoprionodon lalandii* (Müller & Henle 1839) é observada na plataforma continental do Atlântico Ocidental, desde o Panamá (América Central) até o sul do Brasil. Em águas brasileiras constitui um importante recurso para a pesca artesanal de áreas costeiras, especialmente nas regiões Sudeste e Sul, onde as capturas variam em torno de 46 a 66% do total de tubarões pescados (Figueiredo 1977; Motta *et al.* 2005). No entanto, atualmente existe pouca informação disponível sobre a sua biologia básica e aspectos

quantitativos da pesca em toda a sua área de distribuição. Segundo a International Union for Conservation of Nature (2006) o status desta espécie quanto à sustentabilidade das populações frente às capturas, ainda não pode ser determinado devido à escassez de dados.

Recentemente, a diversidade genética de *R. lalandii* foi avaliada entre indivíduos de 3 localidades da costa de São Paulo no sul do Brasil, compreendendo um território com cerca de 500 Km da faixa costeira (Mendonça *et al.* 2009b). Neste estudo foi encontrada uma baixa diversidade nucleotídica (0.004843 ± 0.002941) e índices de diferenciação genética que sustentam a hipótese de fluxo gênico ($F_{ST}=0.08394$, $P<0.01$) dos tubarões *R. lalandii* nesta região. No entanto, os resultados obtidos também sugerem algum grau de estruturação populacional que pode estar sendo modulado pelas distâncias geográficas e possivelmente por correntes oceânicas.

Para o desenvolvimento de mecanismos de controle da pesca adequados à espécie *R. lalandii* é necessário um conhecimento consistente a respeito da biologia populacional, incluindo a determinação da variabilidade genética, fluxo gênico e estruturação populacional ao longo da distribuição da espécie. Assim este estudo buscou tais parâmetros analisando populações distribuídas na costa sul do Caribe e regiões da costa sudeste e sul do Brasil utilizando sequencias da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop).

Material e Métodos

Coleta de amostras, extração de DNA e sequenciamento

Foram obtidas 242 amostras de *Rhizoprionodon lalandii* junto a pescadores locais e em expedições científicas (2005 a 2009) entre o mar do Caribe e sul do Brasil, abrangendo uma área de cerca de 12.000 km de linha costeira (Figura 1). Destas amostras, 32 foram obtidas na região sul do Mar do Caribe (Isla Margarita, Venezuela 11°10'42"N

63°37'58"W) e as demais em território brasileiro: 8 amostras na costa do Rio de Janeiro (22°30'45"S 40°15'14"W), 65 amostras na costa de São Paulo (24°36'25"S 45°26'22"W), 47 amostras na costa do Paraná (26°21'8"S 47°43'28"W), 28 amostras obtidas na costa de Santa Catarina (29°4'31"S 40°4'38"W) e 62 amostras na costa do Rio Grande do Sul (32°54'59"S 51°30'14"W). Pequenos fragmentos de tecido de cada um dos indivíduos foram preservados em etanol (95%) e alguns exemplares inteiros foram fixados em formol, seguido de etanol (70%) e depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista UNESP, São Paulo.

O DNA genômico foi extraído de células epiteliais, usando o método de extração salina descrita por Aljanabi e Martinez (1997). As reações de amplificação da região controle foram realizadas segundo Mendonça *et al.* (2009). Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. Em seguida os produtos da PCR foram marcados com o BigDye versão Terminator Cycle Sequencing Kit 3,1 (Applied Biosystems, Inc.) e aplicados no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems. As sequências completas foram analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW Macvector-65 (1998) para a identificação de sítios polimórficos entre as espécies. As sequências de cada um dos haplótipos encontram-se depositadas no GenBank com número de acesso HM446216 a HM446245.

Análises populacionais

Para as análises populacionais foram calculadas as composições nucleotídica, diversidade das sequências, número de sites polimórficos e diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.01 de Excoffier & Schneider (2005). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi realizada para testar a

heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.01 que utiliza a estatística F de Wrigth's (1951, 1965). A significância da F_{ST} - estatística é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.* 1992), com 1000 permutações. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões. A rede de haplótipos foi estimada utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000), que utiliza os métodos de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992). A hipótese de isolamento por distância foi avaliada utilizando o teste de Mantel (Mantel, 1967) implementado no software XLSTAT 2010.

Idade e tamanho populacional

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1989) e Fu Fs (Fu 1997) também foram feitos com o programa ARLEQUIN 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle de *R. lalandii*. Para avaliar a história demográfica de *R. lalandii* foi realizado o teste de distribuição das diferenças genéticas entre os pares de haplótipos de acordo com o modelo de expansão súbita (Mismatch distributions). Para o cálculo do tempo t decorrido desde a expansão, empregou-se a fórmula $t=\tau/2u$, onde t é o tempo decorrido desde o evento de expansão e u é a taxa global de evolução do haplótipo. Para estimar u multiplica-se a taxa de mutação por sítio por ano pelo número de nucleotídeos da molécula. Para o cálculo do tamanho populacional das fêmeas antes da expansão é utilizada a fórmula $Ne_0= \theta_0/2u$ e para o cálculo do tamanho populacional após a expansão usa-se $Ne_1= \theta_1/2u$. As taxas de mutação empregadas para a região controle foram de 0,8% por milhão de anos de acordo com Duncan *et al.* (2006).

Resultados

Caracterização das sequências e diversidade genética

O sequenciamento da região D-loop de 242 indivíduos da espécie *R. lalandii* resultou em 792 nucleotídeos analisáveis, com 13 sítios polimórficos e 30 haplótipos. A frequência nucleotídica observada foi A=0.317, T=0.356, C=0.201 e G=0.127. A diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) entre todas as populações foi de $h=0.881\pm 0.0013$ e $\pi=0.00278$ respectivamente. Do total de haplótipos encontrados, 24 são restritos a uma única área de coleta, representando 22% dos indivíduos analisados. O haplótipo 2, representado por 71 indivíduos (30% do total), foi observado em todas as áreas amostradas no sul do Brasil, com exceção da costa do Rio de Janeiro. Este mesmo haplótipo foi observado também em 7 indivíduos capturados no Caribe. O haplótipo 11, presente em 60 indivíduos (25%), foi encontrado em toda a região sul do Brasil, não havendo representantes entre os indivíduos do Caribe. Apenas o haplótipo 7, com uma frequência relativa de 14%, foi observado em todas as áreas amostradas (Tabelas 1, 2 e Figura 1). Nas frequências haplotípicas e nucleotídicas foram observados os maiores índices de diversidade na população do Caribe e os menores índices de diversidade foram encontrados entre as populações do Paraná e Santa Catarina, não tendo sido considerado nesta análise a população do Rio de Janeiro devido a baixo número amostral (Tabela 3).

Tabela 1. Posições polimórficas entre os haplótipos de *R. lalandii*. Os diferentes haplótipos estão listados na coluna à esquerda e os sítios polimórficos apresentam-se na linha superior.

Haplótipos	Sítios polimórficos													
	1	1	2	2	2	3	3	4	6	6	7	7	5	6
	1	5	6	3	8	8	0	3	6	0	2	4	8	5
1	T	A	T	T	C	T	C	T	A	A	G	C	C	
2	.	G	T	.	G	.	.	A	.	
3	.	G	T	C	G	.	.	A	.	
4	C	T	.	G	.	.	A	.	
5	T	.	G	
6	A	.	
7	T	A	.	
8	T	C	A	.	
9	T	C	T	A	.	
10	.	G	.	.	T	C	.	.	G	.	.	A	.	
11	.	G	.	C	.	.	T	.	G	.	.	A	.	
12	.	G	C	.	.	.	T	C	G	.	.	A	.	
13	T	.	G	.	.	A	.	
14	C	T	A	.	
15	.	G	T	A	.	
16	.	G	.	C	.	.	T	A	.	
17	.	G	C	.	.	.	T	A	.	
18	T	C	T	.	G	.	.	A	.	
19	A	.	.	.	T	C	T	.	.	.	A	A	T	
20	A	T	.	.	.	A	A	T	
21	A	G	.	C	.	.	T	.	G	.	.	A	.	
22	.	G	T	.	G	.	A	A	.	
23	.	G	.	.	T	C	T	.	G	.	A	A	T	
24	A	G	T	.	G	.	.	A	.	
25	T	C	T	A	T	
26	.	G	.	C	.	.	T	.	G	C	.	A	.	
27	.	G	.	C	.	.	T	.	G	.	A	A	T	
28	A	G	T	.	G	.	A	A	T	
29	.	G	T	.	G	.	.	A	T	
30	A	T	A	.	

Tabela 2. Distribuição geográfica dos haplótipos de *R. lalandii* com os números de indivíduos de cada região. Em negrito estão os haplótipos exclusivos de cada área amostrada. CB, Caribe, Isla Margarita - Venezuela; as demais regiões pertencem à costa brasileira. RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul.

Haplótipos	CB	RJ	SP	PR	SC	RS
1	5
2	7	.	19	19	11	15
3	1
4	1
5	2
6	5
7	5	5	9	2	7	5
8	2
9	1	.	3	7	.	2
10	3
11	.	3	16	17	10	14
12	.	.	1	.	.	.
13	.	.	3	1	.	.
14	.	.	3	.	.	.
15	.	.	8	.	.	.
16	.	.	2	.	.	2
17	.	.	1	.	.	.
18	.	.	.	1	.	.
19	1
20	1
21	3
22	3
23	1
24	6
25	2
26	2
27	1
28	1
29	1
30	2
Total	32	8	65	47	28	62

Tabela 3. Estatísticas populacionais de *R. lalandii*: n , tamanho amostral; N , número de haplótipos; h , diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; D , teste Tajima; P , P valor do teste de Tajima; F_s , teste de F_s de Fu; P_{FS} , P valor do teste de F_s ; τ , tau; θ_0 , valor de theta inicial; valor de theta no tempo presente; N_{t0} , número de fêmeas antes da expansão; N_{t1} , número de fêmeas depois da expansão; Idade pop, Idade atual das populações em anos. As idades das populações são indicadas com 95% de intervalo de confiança de τ em populações com tamanho amostral suficiente para 1000 replicações.

População	Localidade	n	N	h	π	D	F	F_s	P_{FS}	τ	θ_0	θ_1	N_{t0}	N_{t1}	Idade pop
I	Caribbean	32	10	0.903	0.0032	1.113	0.887	-2.435	0.077	2.801	0.193	33.711	26.259	4.586.680	381.100
	Rio de Janeiro	8	2	0.536	0.0013	1.600	0.962	2.988	0.903	4.016	0.000	2.561	0.000	341.575	546.412
	São Paulo	65	10	0.824	0.0020	0.301	0.661	-2.285	0.137	1.625	0.024	7.100.909	3.244	947.090.935	220.959
II	Paraná	47	6	0.696	0.0021	1.300	0.892	0.572	0.673	5.584	0.280	2.141	37.345	291.302	759.752
	Santa Catarina	28	3	0.702	0.0018	1.504	0.922	2.178	0.867	2.100	0.038	2.886	5.170	392.665	285.723
III	Rio G. Sul	62	17	0.812	0.0031	0.688	0.775	-6.986	0.003	1.139	1.278	6.901.426	173.883	939.276.226	154.971
	All	242	30	0.825	0.0026	-0.135	0.444	-25.185	0.000	1.084	1.317	35.508	179.189	4.831.178	147.487

Estrutura populacional

Na estimativa de diferenciação populacional utilizando o método AMOVA foi encontrada uma forte estruturação entre todas as localidades amostradas ($F_{ST}=0.254$, $P>0.0001$). Nas análises de comparações aos pares é observado uma tendência de aumento do sinal de estruturação populacional relacionado ao aumento das distâncias geográficas, caracterizando o isolamento por distância que também foi verificado nos testes de Mantel ($r=0.812$, $P<0.001$) (Figura 2). A maior diferença populacional foi observada entre indivíduos do Caribe e Santa Catarina ($F_{ST}=0.268$, $P>0.0001$) e o menor distanciamento genético foi encontrado entre São Paulo e Santa Catarina ($F_{ST}=0.001$, $P>0.0001$). Dentre os tubarões da região Sul do Brasil é observado uma leve diferenciação com estruturação moderada entre os indivíduos do Rio de Janeiro e as demais localidades ($F_{ST}=0.100$ a $F_{ST}=0.137$) (Tabela 4).

Tabela 4. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de populações de *R. porosus*. Nível de significância de $p<0,05$ em 1000 permutações, *dados não significativos. CB, Caribe; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul.

	CB	RJ	SP	PR	SC	RS
CB	-					
RJ	0.087*	-				
SP	0.174	0.044*	-			
PR	0.228	0.116*	0.001*	-		
SC	0.219	0.137	0.025	0.011*	-	
RS	0.206	0.100	0.043	0.024*	0.027	-

A partir dos resultados da AMOVA, hipóteses de estruturação foram elaboradas de acordo com a distribuição geográfica das frequências haplotípicas havendo uma separação em três populações diferentes, sendo a População I constituída pelos indivíduos do Caribe, a População II formada pelos tubarões capturados no Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina e a População III formada pelos tubarões do Rio Grande do Sul no extremo sul do Brasil. Na rede haplotípica pode-se observar uma tendência ao distanciamento genético dos haplótipos que são exclusivos das regiões do Caribe (População I) e Rio Grande do Sul (População III). A População II (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina) é representado por 148 amostras distribuídas em 10 haplótipos, sendo apenas 5 deles exclusivos. Os outros 5 haplótipos são compartilhados entre indivíduos do Rio Grande do Sul e apenas 2 entre indivíduos do Caribe (Figura 1).

Figura 1. Rede de haplótipos apresentando três grupos populacionais. Todos os haplótipos são separados por uma mutação e os tamanhos dos círculos estão em proporção às frequências haplotípicas. Os círculos numerados em torno da área de estudo representam o total de amostras analisadas em cada localidade.

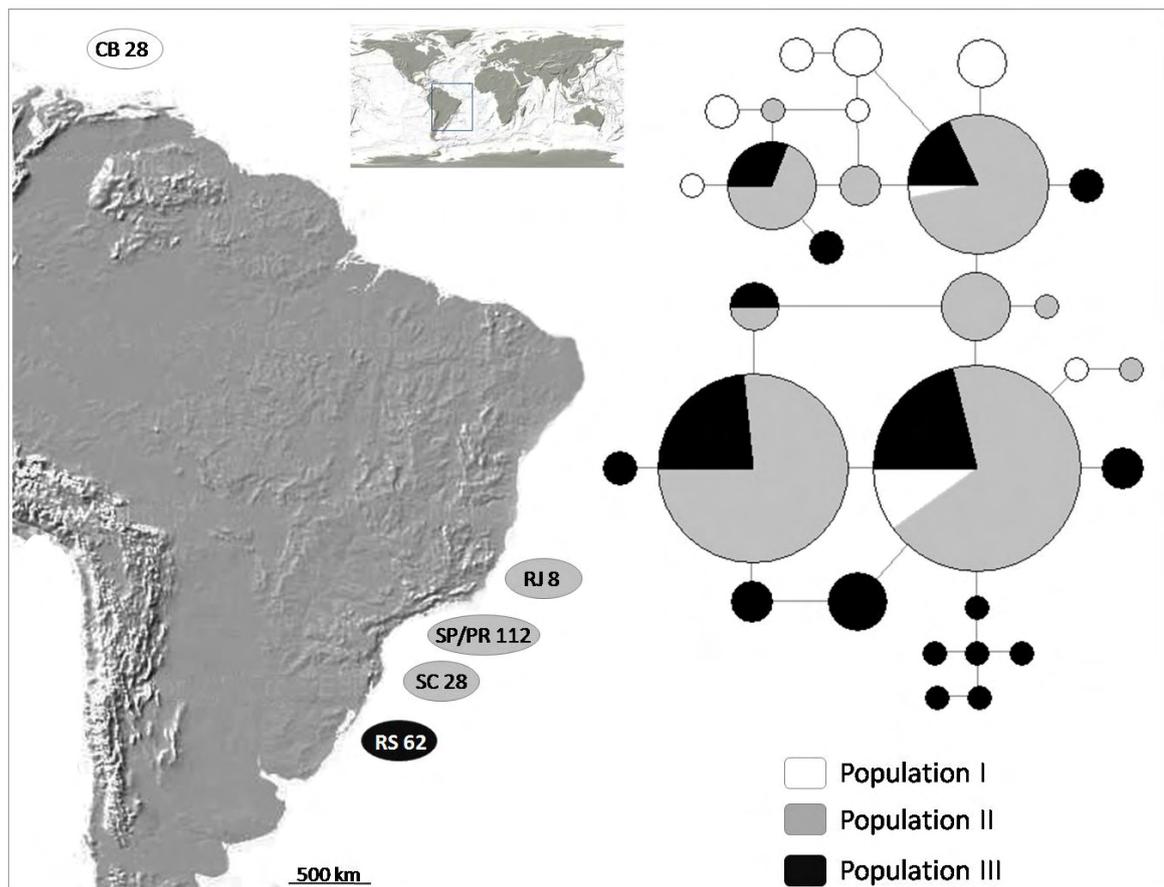
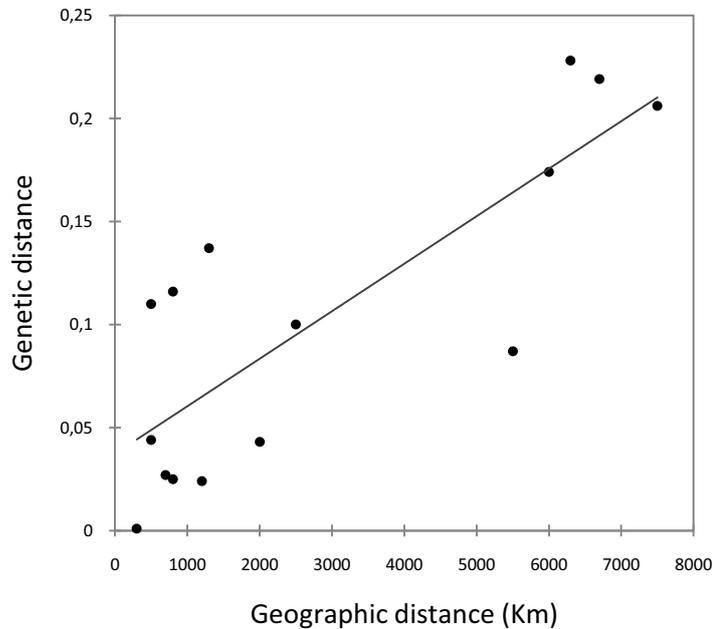


Figura 2. Isolamento por distância baseado em todas as localidades amostradas. Distâncias geográficas x distâncias genéticas através de correlação de Pearson com 10.000 permutações.

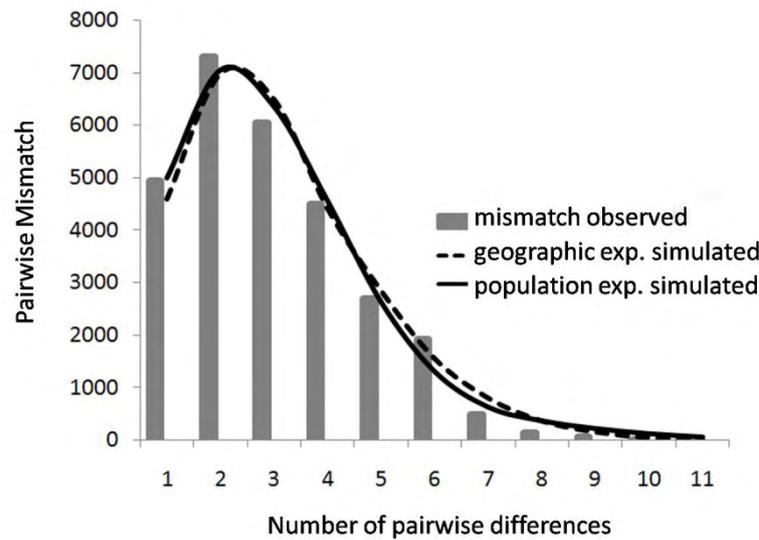


Idade e tamanho populacional

Os testes de neutralidade (Tajima D) não mostraram valores estatisticamente significativos. No entanto, foi observada uma forte significância nos testes de F_s de F_u para os tubarões do Caribe e Rio Grande do Sul e quando avaliado todas as amostras como um único grande grupo (F_s de $F_u = -25.185$, $P < 0.00001$). Para os tubarões da População II os testes de F_s de F_u apresentaram baixa significância estatística e a hipótese de distribuição unimodal ($P > 0,05$) foi aceita por todas as populações (Tabela 3, Figura 2). Os padrões de distribuição propostos pela análise mismatch resultou em curvas unimodais com uma diferença média próxima de zero. Analisando-se todas as populações conjuntamente pode-se sugerir um período de expansão a cerca de 147.500 anos atrás.

Para a População I foi estimado um evento de expansão populacional ocorrido a cerca de 381.000 anos atrás, para a População II este evento teria ocorrido a cerca de 107.000 anos atrás e para a População III tal evento teria ocorrido a cerca de 155.000 anos.

Figura 2. Curva de Distribuição Mismatch entre todas as populações de *R. lalandii* para as hipóteses de expansão populacional e geográfica.



Discussão

Neste estudo as frequências nucleotídicas nas sequências da região controle do mtDNA de *Rhizoprionodon lalandii* entre todas as populações estudadas, foram bastante semelhantes às registradas por Mendonça *et al.* (2009) estudando esta mesma espécie apenas na costa de São Paulo (sudeste do Brasil), sendo observado ainda, índices totais de diversidade haplotípica e nucleotídica semelhantes às encontrados para a espécie *R. terraenovae* no Sudeste Atlântico (Heist *et al.* 1996), para o *Carcharhinus limbatus* entre populações dos oceanos Atlântico e Pacífico (Keeney e Heist, 2006) e espécies de tubarões-martelo *Sphyrna lewini*, *S. zygaena* e *S. mokarran* analisadas em estudos

globais (Duncan *et al.* 2006). No entanto, os índices de variabilidade genética encontrados neste estudo se mostraram diferentes quando ponderadas entre as três diferentes populações, apresentando diversidades maiores nas populações do Caribe (População I) e Rio Grande do Sul (População III) e menores índices de diversidade genética entre as populações do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (População II). Entre os indivíduos da População I, 77% dos haplótipos encontrados são exclusivos da região Caribenha, entre os indivíduos da População III 70% dos haplótipos são exclusivos da região sul do Brasil e entre os tubarões da População II, mesmo com um maior número de indivíduos analisados (61% do total) apenas 50% dos haplótipos são exclusivos da região.

A caracterização dos índices de variabilidade genética com taxas diferenciais entre as três populações estudadas é reforçada pelas análises AMOVA que resultaram em fortes indicadores de estruturação, sendo principalmente relevante a distinção entre as populações do Caribe e as populações das demais localidades brasileiras. Apesar das divergências entre os níveis de variabilidade genética observados entre os tubarões do extremo sul do Brasil e a População II, estes resultados sugerem um alto grau de fluxo gênico na região. Contudo, muito provavelmente a direção deste fluxo deve ocorrer pela migração de indivíduos do sul em direção norte, o que poderia ser justificado pela Corrente Marítima das Falklands, que segue pelo sul da Argentina em direção norte, podendo chegar até a região do Rio de Janeiro, no Brasil. Desta forma, as populações de *R. lalandii* do extremo sul do Brasil poderiam atuar como centros dispersores da variabilidade da espécie.

Este tipo de pressão ambiental sobre as populações de *R. lalandii* no Atlântico Ocidental, seguindo os padrões das correntes marítimas, foi bem observado para a espécie *R. porosus*. Em um estudo que buscou caracterizar estruturas populacionais desta espécie, foi constatada a diferenciação seguindo os padrões de deslocamento da Corrente

do Equador, que ao atingir o extremo leste da costa brasileira divide em Corrente do Brasil, se estendendo de um lado, em direção a Argentina e Corrente Norte, seguindo em direção ao Caribe (Mendonça *et al.* submetido). Fortes níveis de barreiras geográficas a espécies de peixes costeiros, produzidas por correntes marítimas na América do Sul foram bem documentadas por Silva (1968), Santos *et al.* (2003 e 2006) e Rocha *et al.* (2007).

Diversos autores sugerem que o período das glaciações do Pleistoceno deve ter sido preponderante para moldar a padrões filogeográficos expressos no DNA mitocondrial e na estrutura populacional de espécies de peixes marinhos (Brunner *et al.* 2001; Planes *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2002; Grunwald *et al.* 2002). No presente estudo esta afirmação é corroborada, tendo sido estimado os períodos de expansões demográficas e geográficas, considerando-se todos as três populações de *R. lalandii* a aproximadamente 147.500 anos atrás, no Pleistoceno Médio. Analisando as três populações separadamente obteve-se valores estatisticamente significativos para as populações do Caribe e Rio Grande do Sul com um diferença de aproximadamente 226.000 anos entre os eventos de expansão de cada região. Para outras espécies de tubarões que tiveram estimados os eventos de expansão populacional foi observado datações similares para *Sphyrna lewini* por Duncan *et al.* (2006), *Negaprion brevirostris* por Schultz *et al.* (2008) e *Rhizoprionodon porosus* por Mendonça *et al.* (submetido). As discrepâncias nas estimativas de expansão entre as diferentes populações pode ser um reflexo dos níveis de divergência genética existentes, corroborando os resultados de forte estruturação encontrados.

A análise de distribuição mismatch tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para detectar eventos de expansão populacional e a datação desses eventos (Ostbye *et al.* 2005; Santos *et al.* 2006; Crottini *et al.* 2007). No entanto, apesar de atraentes, as estimativas de tamanhos populacionais devem ser interpretadas com cautela.

Neste estudo, através destas análises foi estimado um significativo número de fêmeas atuais entre todas as populações. No entanto, diversas coletas foram realizadas nas regiões das costas norte e nordeste do Brasil, onde foram encontrados apenas indivíduos da espécie *R. porosus* representando este gênero. Este fato pode ser considerado uma evidência de fortes declínios populacionais de *R. lalandii* nestas regiões.

Os resultados apresentados neste estudo, avaliando os níveis da estrutura populacional da espécie *R. lalandii*, com os dados apresentados por Heist *et al.* (1996) sobre as populações de *R. terraenovae* nos EUA, além dos resultados obtidos por Mendonça *et al.* (2009), que estudaram a dinâmica populacional de *R. lalandii* na costa sul do Brasil e com resultados obtidos por Mendonça *et al.* (submetido) avaliando a estrutura populacional da espécie *R. porosus*, podem sugerir um padrão de diferenciação entre populações de tubarões do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico ocidental, relacionado com as correntes oceânicas e principalmente, à distribuição e distanciamento geográfico. Ainda, esta hipótese pode ser válida também para outras espécies de pequenos tubarões costeiros apresentando características biológicas e abundância e distribuição semelhantes.

Conservação

Populações marinhas com distribuição abrangendo áreas com diferentes características ecológicas como regiões costeiras, oceânicas, tropicais ou subtropicais possuem uma grande chance de apresentar unidades evolucionárias distintas, sendo necessário identificar quais são estas unidades e avaliar a necessidade de ações para a conservação, principalmente em espécies exploradas pelo homem.

Neste estudo fica evidente um alto grau de diferenciação entre as populações do Caribe e as demais localidades avaliadas ao sul do Brasil. Uma especial atenção deve ser dada à População II (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina), que apresenta

uma reduzida variabilidade genética e conseqüentemente baixo potencial evolutivo. Fato agravado por serem estas provavelmente as populações de tubarões mais explorados pela pesca brasileira (Figueiredo, 1977; Motta *et al.* 2005). Deve-se ressaltar ainda as observações a respeito do fluxo gênico existente entre as populações do Rio Grande do Sul e as populações da População II onde possivelmente deve ocorrer o fluxo gênico predominantemente unidirecional. Assim, para efeitos de conservação é apropriado que se considere estas três populações como unidades de manejo distintas. Uma redução das populações do extremo sul do Brasil pode agravar ainda mais o atual nível de variabilidade genética encontrado entre as populações situadas nas regiões entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina (População II) levando estas populações a uma situação real de risco de extinção.

Referências

- 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.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- 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. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 65–73.
- Brunner PC, Douglas MR, Osinov A, Wilson CC, Bernatchez L (2001) Holartic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 55, 573–586.
- Castillo-Géniz JL, Márques-Farias JF, Rodríguez De La Cruz MC, Cortés C, CidDel Prado A (1998) The Mexican artisanal shark fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Marine Freshwater Research*, 49, 611–620.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate genegenealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
- Compagno LJV (1984) *FAO Species Catalogue. Vol. 4. Parts 1 & 2, Sharks of the world*. FAO Fisheries Synopsis, 125.
- Crottini A, Andreone F, Kosuch J (2007) Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology*, 16, 2734–2754.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, de Couet GH (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239–2251.

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Figueiredo JL (1977) Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações. raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo, 104.
- Fu YX (1996) Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics*, 144, 829–838.
- Grace M, Henwood T (1997) Assessment of the distribution and abundance of coastal sharks in the U.S. Gulf of Mexico and Eastern Seaboard, 1995 and 1996. *Marine Fish Review*, 59 (4), 23–32.
- Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R, Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, 11, 1885–1898.
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591–600.
- Heist EJ, Musick JA, Graves JE (1996) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 583–588.
- 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.
- 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.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology*, 7(2) 213-216.
- Motta FS, Gadig OBF, Braga FMS, Namora RC (2005) Size and sex compositions, length–weight relationship, and occurrence of the Brazilian sharpnose shark, *Rhizoprionodon lalandii*, caught by artisanal fishery from southeastern Brazil. *Fishing Research*, 74: 116-126.
- Poffenberger J (1999) Atlantic Shark Fisheries. Federal fisheries management plan (FMP). Miami 6:1.
- Rice WR (1989) Analyzing Tabelas of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Rocha LA, Craig MT, Bowen BW (2007) Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. *Coral Reefs* 26:501–512.
- Santos S, Hrbek, Farias IP, Schneider H, Sampaio I (2006) Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology* 15, 4361–4373.
- Santos S, Schneider H, Sampaio I (2003) Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 151–161.

- 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.
- Silva PMC (1968). O fenômeno ressurgência na costa meridional brasileira. *Publicações do Instituto de Pesquisas Marinhas, São Paulo* 24: 1 –31.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotype associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619–633.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

Considerações finais

5 Considerações finais

As últimas décadas têm revelado uma aplicação crescente de metodologias genéticas nas mais diferentes áreas da Biologia. Os marcadores genéticos deixaram o campo das ciências básicas e passaram a ser efetivamente aplicados como ferramentas para uma diversificada gama de objetivos. No presente estudo, a funcionalidade dos marcadores moleculares possibilitou a resolução de questões extremamente relevantes para a área da conservação biológica, com o desenvolvimento de marcadores específicos de identificação das espécies e a formulação de hipóteses abrangentes sobre a distribuição e características genéticas populacionais de algumas das espécies de tubarões francamente exploradas pela pesca.

Em relação ao método de identificação de tubarões a partir de protocolos de PCR-multiplex, ressalta-se que, a despeito do pequeno número de espécies para o qual já foram desenvolvidos primers de reconhecimento espécie-específico, o potencial de aplicação destes marcadores para um grande número de espécies ainda está sendo explorado. A utilização desta ferramenta em avaliações pesqueiras poderá ser de grande auxílio na caracterização e acompanhamento da exploração de estoques. Ainda, a identificação precisa dos espécimes, mesmo na ausência de caracteres morfológicos utilizados no reconhecimento direto, como no caso de exemplares já processados, também pode ser realizada para o aproveitamento de um número elevado de exemplares capturados, viabilizando novos trabalhos de investigação científica. Esta prática já vem sendo adotada no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IB – UNESP) que atualmente conta com um banco de mais de 5.000 exemplares de elasmobrânquios de diversas regiões da América do Sul, EUA e África. Desta forma, novos estudos populacionais estão sendo desenvolvidos, utilizando amostras sem identificações morfológicas que antes eram

descartadas. Como exemplos podem ser citados os estudos de estruturação populacional desenvolvidos com a espécie de raia *Rhinobatos horkelli* e tubarões *Prionace glauca* e *Alopias superciliosus*.

O estudo filogeográfico dos tubarões do gênero *Rhizoprionodon* no Atlântico Ocidental produziu importantes informações a respeito das espécies analisadas, com a elucidação da identificação taxonômica das espécies *R. terraenovae* e *R. porosus*, além de informações sobre a distribuição destas espécies no Mar do Caribe e na costa brasileira. As relações filogenéticas destas três espécies, com a elucidação dos processos de especiação e identificação de um ancestral comum, ainda devem ser avaliadas para um melhor entendimento dos processos de colonização de suas populações. Por outro lado, este estudo possibilitou a formulação de algumas hipóteses sobre a estruturação populacional destas espécies nas suas áreas de distribuição, promovida principalmente pelos padrões de deslocamentos das correntes marítimas. Considera-se que as informações obtidas podem ser aplicadas também para o entendimento dos mecanismos e processos envolvidos na distribuição de outras espécies de tubarões costeiros de pequeno porte.

A distribuição das amostras do gênero *Rhizoprionodon* obtidas ainda aparece como fator limitante para a elaboração de uma hipótese filogeográfica única para estas espécies em toda a costa da América do Sul. Para a espécie *R. porosus* os dados foram mais consistentes na caracterização da estruturação populacional, tendo aparentemente como elemento principal a presença da corrente do Equador no Norte do Brasil. Para a espécie *R. lalandii*, devido à amostragem local, foi possível observar um forte sinal de diferenciação das populações por influência da Corrente das Falklands. No entanto, sendo estas espécies bastante semelhantes com relação a aspectos morfológicos e biológicos, é presumível que as pressões ambientais causadas pelas correntes do Equador e das Falklands sejam efetivas para ambas as espécies.

Uma observação de interesse pode ser feita com respeito às distribuições das espécies *R. porosus* e *R. lalandii* e suas abundâncias relativas. É fato que a abundância relativa atual da espécie *R. porosus* passa a ser muito maior em relação à *R. lalandii* a partir da costa do Rio de Janeiro, seguindo em direção Norte. Do mesmo modo, a abundância relativa de *R. lalandii* é maior do que a de *R. porosus* a partir desta mesma região, seguindo em direção ao Sul do Brasil (Ferreira 1988; Silva e Gadig 1994). Como exceção a esse padrão, a cerca de 40 anos atrás foi relatado por Sadowsky (1967) o fato de que na região de Cananéia, litoral Sul do Estado de São Paulo, foi encontrada uma maior abundância de *R. porosus* em relação à *R. lalandii*. No Mar do Caribe, em trabalhos de campo acompanhando os desembarques da pesca costeira na Isla Margarita, Venezuela, pesquisadores relataram a abundância de *R. lalandii* em volumes de captura semelhantes aos observados para *R. porosus* (comunicação pessoal). Considerando que nesta região do Caribe a pesca costeira é realizada de forma quase exclusivamente artesanal e a captura de tubarões também é tida apenas como acidental, pressupõe-se que seu impacto nas populações locais deva ser baixo. Assim, a relação de abundância atual entre *R. porosus* e *R. lalandii* na costa brasileira, onde os volumes de captura são altos, pode estar refletindo os efeitos da sobre-pesca destas espécies, que através de algum mecanismo biológico pode estar exibindo um favorecimento para *R. porosus* na região situada ao Norte do Rio de Janeiro e o favorecimento de *R. lalandii* na região situada ao sul desta mesma região.

Considera-se, pois, que os resultados obtidos neste trabalho poderão servir de auxílio aos planos de manejo e de controle da pesca das espécies estudadas, sobretudo na costa brasileira onde as avaliações populacionais e a fiscalização das capturas ainda são realizadas de modo extremamente precário.

A resolução da provável distribuição simpátrica das espécies de tubarões *R. porosus* e *R. terraenovae* ao Norte do Caribe e seus limites de ocorrência na região ainda

se apresenta como espaço de investigação. Com relação às demais espécies do gênero, muitos dos aspectos populacionais também permanecem desconhecidos, havendo ainda problemas de definições taxonômicas e distribuição. A busca pela elucidação destas questões será constante e marcará a continuidade do trabalho apresentado nesta Tese.

6 Referências

- Abercrombie DL, Clarke SC, Shivji MS (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics*, 6, 755-788
- Abercrombie D (2004) Efficient PCR-based identification of shark products in global trade: applications for the management and conservation of commercially important mackerel sharks (Family Lamnidae), thresher sharks (Family Alopiidae) and hammerhead sharks (Family Sphyrnidae). M.S. thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.
- 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.
- Alves-Gomes JA, Ortí G, Haygood M, Meyer M, Heiligenberg W (1995) Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12(2): p. 298-318.
- Alves-Gomes JA (1998) The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi; Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. p. 447-460.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice JC, Giblin-Davidson C, Laerm J, Patton JC, Lansman RA (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc Natl Acade Sci USA*. 76:6694-6698.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Sauders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.

- Avise JC (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans Roy Soc London B*. 312: 325-342.
- Avise JC (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet*. 25:45-69.
- Avise JC. (1994) Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.
- 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.
- Bechenbach AT, Thomas WK, Soharabi H (1990) Intraspecific sequenci variation and mitochondrial genome of raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genome*. 33:13-15.
- 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. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 269, 65–73.
- 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; an chimaeroids, In: *Fishes of the Western North Atlantic*. Tee-Van, J., Breder, C.M., Parr, A.E., Schroeder, WC, Schultz, L.P. (Eds.). Sears Foundation of Marine Research, New Haven, CT.
- Bigelow HB, Schroeder WC (1948) *Fishes of the Western North Atlantic*. Part one. Lancelets, cyclostomes, sharks. Sears Foundation for Marine Research, Yale University, New Haven, 576
- Billington N, Herbert P (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquati Sci*. 48: 80-94.
- 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.
- Bonfil R (1994). Overview of world elasmobranch fisheries. Fisheries technical paper 341. Food and Agriculture Organization, Rome.

- Bonhomme F, Naciri M, Bahri-Sfar L, Lemaire C (2002) Comparative analysis of genetic structure of 2 species of marine fish *Dicentrarchus labrax* and *Dicentrarchus punctatus*. *C R Biol* 325:213-20
- Broughton RE, Dowling TE (1994) Length variation and mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spilopleura*. *Genetics*. 138: 179-190.
- Brown BL, Chapman RW (1991) Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Evolution*. 45:1147-1161.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. (1979) Rapid evolution of animals mitochondrial DNA. *Proc Natl Acade Sci USA*. 76: 1967-1971.
- Brunner PC, Douglas MR, Osinov A, Wilson CC, Bernatchez L (2001) Holartic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 55, 573–586.
- Camhi M, Fowler S, Musick J, Fordham FS (1998) Sharks and their relatives. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 20-39.
- Camhi M (1999) Sharks on the line II: an analysis of Pacific state shark fisheries. Living oceans program. National Audubon Society, Islip, New York.
- Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2005) Rapid radiation and cryptic speciation in Mediterranean triplefin blennies (Pisces: Tripterygiidae) combining multiple genes. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 37, 751-761
- Carvalho GR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Ver. Fish Biol. Fish.* 4: 326-350
- Castilho R, Freitas M, Silva G, Fernandez-Carvalho J, Coelho R (2007) Morphological and mitochondrial DNA divergence validates blackmouth, *Galeus melastomus*, and Atlantic sawtail catsharks, *Galeus atlanticus*, as separate species. *Journal of Fish Biology* 70, 346-358
- Castillo-Géniz JL, Márques-Farias JF, Rodríguez De La Cruz MC, Cortés C, CidDel Prado A (1998) The Mexican artisanal shark fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Mar. Freshwater Res.* 49, 611–620
- Castro ALF, Stewart BS, Wilson SG (2007) Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology*, 16, 5183–5192.
- 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,11-17.

- Castro JI (1993) A field guide to the sharks commonly caught in commercial fisheries of the southeastern United States. Technical memorandum NMFS-SEFSC-338. National Oceanic and Atmospheric Administration, Miami.
- Castro, J. I., C. M. Woodley, and R. L. Brudek. (1999) A preliminary evaluation of the status of shark species. Fisheries technical paper 380.
- Cavalcanti MJ, Gomes UL, Tomás ARG (1996) Discriminação morfológica entre *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861) e *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) (Elasmobranchii, Carcharhiniformes, Carcharhinidae): um estudo multivariado. Acta Biologica Leopoldensia. 18:103-118;
- Chabot CL, Allen LG (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. Molecular Ecology, 18: 545-552
- 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
- Chapman, D., D. Abercrombie, C. Douady, E. Pikitch, M. Stanhope, and M. Shivji. (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. Conservation Genetics 4: 415-425.
- Clarke, S.C., J.E. Magnussen, D.L. Abercrombie, M.K. McAllister and M.S. Shivji. (2006) Identification of Shark Species Composition and Proportion in the Hong Kong Shark Fin Market Based on Molecular Genetics and Trade Records, *Conservation Biology* 20(1): 201-211.
- Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28:693-705.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate genegenealogies. Molecular Ecology, 9: 1657–1660.
- Cody TJ, Avent RM (1980) Assessment of bottom longline fishing off the central Texas coast. Manage. Data Ser. Tex. Parks Wildl. Dep. 32.
- Compagno LJV (1984) FAO species catalogue Vol. 4, Part 2 Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. FAO Fisheries Synopsis, 125, 251-655

- 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 (1977) Phyletic relationships of living sharks and rays. *Ann. Zool*, 17: 303-322.
- Compagno LJV (1999) Checklist of living elasmobranchs. In Hamlett W.C. (ed.) Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, pp. 471–498.
- Corrigan S, Huveneers C, Schwartz TS, Harcourt RG, Beheregaray LB (2008) Genetic and reproductive evidence for two species of ornate wobbegong shark *Orectolobus* spp. on the Australian east coast. *Journal of Fish Biology* 73, 1662-1675
- Costa FES, Braga FMS, Amorim AF, Arfelli CA (1996) Fishery analysis on Shortfin Mako, *Isurus oxyrinchus*, off southeast and south of Brazil (Elasmobranchii: Lamnidae). *Arquivos de Ciências do Mar*, 30: 5-12.
- Crottini A, Andreone F, Kosuch J (2007) Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology*, 16, 2734–2754.
- Cunha M R, Gomes UL (1994) Estudo comparativo dos órgãos copuladores de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861). *Rev Brasil Biol.* 54 (4)575-586.
- De Carvalho MR (1996) Higher level elasmobranch phylogeny, basal squalians, and paraphyly. In: Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD (Eds.), *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, pp. 35-62.
- De Queiroz K (2005) Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(1) 6600-6607.
- De-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. *Molecular Ecology Resources*. 10, 197-199
- 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.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, de Couet GH (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239-2251.

- Ebert DA, Compagno LJV (2007) Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes* 80, 111–124.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491
- FAO (2009) FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791
- Ferguson JWH (2002) On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 509-516
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^o edição, Brasília, EMBRAPA-CENARGEN
- Ferreira BP (1988) Ciclo reprodutivo de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey) (Selachii, Carcharninidae) na região de Barra de Guaratiba, RJ. *An Acad bras Ci* 60(1) 91-101.
- Ferreira CM, Nunes JA, Oliveira EC, Tessier MF, Sampaio CLS (2003) Análise dos desembarques da frota artesanal da Pituba, Salvador, Bahia. In: I Congresso Brasileiro de Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. Resumos CD Rom.
- Ferris SD, Sage SD, Huang CM, Nielsen JT, Ritte U, Wilson AC (1983) Flow of mitochondrial DNA across species boundary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:2290-2294.
- Figueiredo JL (1977) Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações. raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo, 104.
- Fishing Research, 74: 116-126. Rice WR (1989) Analyzing Tabelas of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Frézal L, Leblois R (2008) Four years of DNA barcoding: curren advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 727-736
- Fu YX (1996) Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics*, 144, 829 –838.

- Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo, 343
- Gadig OBF (1994) Fauna de tubarões da costa Norte/Nordeste do Brasil (Chondrichthyes: Elasmobranchii). João Pessoa. Dissertação de Mestrado em Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, 330.
- Gagnaire PA, Tsukamoto K, Aoyama J, Minegishi Y, Valade P, Berrebi P (2007) RFLP and semi-multiplex PCR-based identification of four eel species from the south-western Indian Ocean region. *J. Fish Biol.* 71 (Supplement B), 279-287.
- Gardner MG, Ward RD (1998) Population structure of the Australian gummy shark (*Mustelus antarcticus* Gunther) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and vertebrae counts. *Marine and Freshwater Research*, 49, 733–745
- Garrick JAF (1982) Sharks of the genus *Carcharhinus*. NOAA Technical Report, NMFS Circular 445: 194
- Gharrett AJ, Mecklenburg CW, Seeb SW, Li S, Matala AP, Gray AK, Heifetz J (2006) Do genetically distinct rougheye rockfish sibling species differ phenotypically. *Trans. American Fish Society* 135,792-800
- Gilbert CR (1967) A revision of the hammerhead sharks (Family Sphyrnidae). *Proc. U.S. Natl. Mus.* 119:1-88.
- Gomes UL, Siqueira AE (1995) Estudo comparativo do condroneurocrânio de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) e *Rhizoprionodon porosus* (Poey, 1861) (Elasmobranchii, Carcharhinidae). *Rev Bras. Biol.* 63: 285-294.
- Grace M, Henwood T (1997) Assessment of the distribution and abundance of coastal sharks in the U.S. Gulf of Mexico and Eastern Seaboard, 1995 and 1996. *Marine Fish Review*, 59 (4), 23–32.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89, 415–426.
- Grant WS, Waples RS (2000) Spatial and temporal scales of genetic variability in marine and anadromous species: implications for fisheries oceanography. In: *Fisheries Oceanography: an Integrative Approach to Fisheries Ecology and Management* (eds. Harrison P, Parsons TR), pp. 61–93. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Graves JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89, 427–437.

- Gruber SH (1990) Life style of sharks. In: Gruber, S.H. (ed.) Discovering sharks. American Litoral Society, Special Publication 14.
- Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R, Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology*, 11, 1885–1898.
- Haig SM (1998) Molecular contribution conservation. *Ecology*, 79:413-425.
- Haimovici M, Cergole MC, Lessa RP, Madureira LS, Jablonski S, Rossi-Eongtschowski CLDB (2006) Panorama Nacional. In: Programa REVIZEE. Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva: relatório executivo. MMA - Secretaria de Qualidade Ambiental. Brasília, p. 77-120.
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591–600.
- 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.
- Harrison GR (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol* 1989; 4:6-11.
- Hazin FH, Lessa RP (2005) Synopsis of biological information available on blue shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic ocean. *Collective Volume Scientific Papers, ICCAT*, 58(3): 1179-1187.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 96-S99.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Ward JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270, 313-322.
- Heist EJ (2004) Genetics of sharks, skates, and rays. In: *Biology of Sharks and Their Relatives* (eds Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR), pp. 471–485. CRC Press, New York.
- Heist EJ, Musick JA, Graves JE (1996) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 583–588.
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology Evolution* 8, 475-493

- Hoelzel AR (1993) Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Curr Opin Geneti Dev.* 3:891-895.
- Hueter RE (1998) Philopatry, natal homing and localized stock depletion in sharks. *Shark News*, 12, 1–2.
- Hueter RE, Heupel MR, Heist EJ, Keeney DB (2002) The implications of philopatry in sharks for the management of shark fisheries. Northwest Atlantic Fisheries Organization Scientific Council Meeting, Serial no. N4744, NAFO SCR Doc. 02/122. From the IUCN/SSC Shark Specialist Group, Nature Conservation Bureau Ltd, Berkshire, UK.
- IBAMA (2008) Estatística da Pesca – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília-DF, <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros>.
- IUCN (2006) IUCN red list of threatened species. www.iucnredlist.org. Downloaded July 2006.
- Kasim, H.M., 1991. Shark fishery of Veraval coast with special reference to population dynamics of *Scoliodon laticaudus* (Müller and Henle) and *Rhizoprionodon acutus* (Ruppell). *J. Mar. Biol. Assoc. India* 33, 213–228.
- 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.
- Keeney DB, Heupel M, Hueter RE, Heist EJ (2003) Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 143, 1039–1046.
- Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the north western Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Vilablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acade Sci USA* 1989; 86:6196-6200.
- Köhler, F. (2007). From DNA taxonomy to barcoding - how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Zool Reihe*, 83:44-51.

- 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.
- Lahaye, R., Bank, M., Bogarin, D., *et al.* (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2923-2928.
- 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
- Lessa RPT (1986) Contribuição ao conhecimento da biologia de *Carcharhinus porosus* Ranzani, 1839 (Pisces, Chondrichthyes) das reentrâncias maranhenses. *Acta Amazônica*; 16/17: 73-86.
- Lessa RPT, Santana FM, Rincon G, Gadig OBF, El-Deir ACA (1999) Biodiversidade de Elasmobrânquios do Brasil. Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 154.
- Lessa R, Quijano SM, Santana FM, Monzini J (2006) *Rhizoprionodon porosus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2.
- Levy JA & Cassano VPF (1994) Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107 B (4): 515-517
- Li M, Wei F, Goossense B, Freng Z, Tamate HB, Bruford MW, Funk SM (2005) Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fungens*): Implication for conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36:78-89.
- Li W-H (1993) So, what about the molecular clock hypothesis? *Curr Opin Genet Dev.* 3:896-901.
- Lima MC, Gomes UL, Souza-Lima W, Paragó C. Estudo anatômico comparativo da região cefálica pré-branquial da *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith) e *Rhizoprionodon*

- lalandii* (Valenciennes) (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) relacionados com a presença do cefalofólio em *Sphyrna rafinesque*. Revta bras Zool 1997; 14 (2) 347-370.
- Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q (2003) The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. Trends Ecol Evol, 18:65-66.
- Lopez JV, Culver M, Stephens JC, Johnson WE, O' Brien SJ (1997) Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. Molecular Biology Evolution 14, 277-286
- MariguelaTC, De-Franco B, Almeida TVV, Mendonça FF, Gadig OBF, Foresti F, Oliveira C (2009) Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. Conservation Genetics Resources 1, 393-396
- 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.
- Martin Ap, Palumbi SR (1993) Body size, metabolic rate, geration time, and the molecular clock. Proc. Natl. Acade. Sci. USA. 90:4087-4091.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009a) Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. Molecular Ecology Resources 9,771-773
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2009b) Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. Neotropical Ichthyology, 7(2) 213-216.
- 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.
- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes, suggested by mitochondrial DNA sequence. Nature, 347(11) 550-553
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. Plos Biology, 3, 2229-2238

- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. 2004. Instrução Normativa N° 05, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28 de maio de 2004.
- Moritz C, Cicero C (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. PLoS Biol, 2:1529-1531.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animals mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann Rev Eol Syst. 18:269-292.
- Motta FS, Gadig OBF, Braga FMS, Namora RC (2005) Size and sex compositions, length–weight relationship, and occurrence of the Brazilian sharpnose shark, *Rhizoprionodon lalandii*, caught by artisanal fishery from southeastern Brazil.
- Moura T, Silva MC, Figueiredo I, Neves A, Muñoz PD, Coelho MM, Gordo LS (2008) Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation. Marine and Freshwater Research, 59, 214-223
- Murgra B, Tola G, Archer SN, Vallerga S, Hirano J (2002) Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: Application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga), Mar. Biotechnol, 4, 119-126
- Natanson LJ & Cailliet GM (1986) Reproduction and development of the Pacific angel shark, *Squatina californica*, off Santa Barbara, California. Copeia 1986(4): 987-994.
- Nelson DR (1990) Telemetry studies of sharks: A review, with applications in resource management. In 'Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries'. Proceedings of the second United States-Japan workshop East-West Center, Honolulu, Hawaii 9-14 December 1987. pp. 239-56.
- Nunes AS, Dominguez JML (2004) Habitats essenciais para peixes – HEP – na Costa do Dendê, Bahia. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, XVI Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí (SC). Resumos 7.
- Nunes JA, Tessier M, Ferreira CM, Sampaio CLS (2003) A bicuda, *Sphyræna guachancho* Cuvier, 1829 (Actinopetygii), e elasmobrânquios desembarcados pela frota artesanal da Pituba, Salvador (BA). In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. Resumos 214-220.

- Ong T-L, Stabile J, Wirgin I, Waldman JR (1996) Genetic divergence between *Acipenser oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as assessed by mitochondrial sequencing analysis. *Copeia*. 464-469.
- Ortí G, Petry P, Porto JIR, Jégo M, Meyer A (1996) Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol Evol*. 42: 169-182.
- Ostbye K, Bernatchez L, Næsje TF, Himberg M, Hindar K (2005) The evolutionary history of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) as inferred from mtDNA phylogeography and gillraker numbers. *Molecular Ecology* 14: 4371-4387.
- Pardini AT, Jones CS, Noble LR. (2001) Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412, 139–140.
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Anu. Ev. Ecol. Syst.* 25: 547
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N, Shivji M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Marine Biotechnology* 3: 231-240.
- Pantano Neto J, Souza AM (1999) Morfologia do Aparelho respiratório de *Rhizoprionodon lalandei* (Valenciennes, 1841) Carcharhinidae, Elasmobranchii. In: Encontro Brasileiro de ictiologia, Resumos 13:363.
- Peach MB, Rouse GW (2004) Phylogenetic trends in the abundance and distribution of pit organs of elasmobranches. *Acta Zool.* 85: 233-244.
- Pestano J, Brown RP (1999) Geographical structuring of mtDNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266, 815–823.
- Planes S, Doherty PJ, Bernardi G (2001) Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the great barrier reef and the coral sea. *Evolution*, 55, 2263–2273.
- Quattro J, Stoner D, Driggers W, Anderson C, Priede K, Hoppmann E, Campbell N, Duncan K, Grady J (2006). Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). *Marine Biology* 148, 1143-1155
- Rice WR (1989) Analyzing Tabelas of statistical tests. *Evolution*, 43, 223-225

- 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.
- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr* 30:1161–1171.
- Rocha LA, Craig MT, Bowen BW (2007) Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. *Coral Reefs* 26:501–512.
- Rocha LA, Robertson DR, Rocha CR. (2005) Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14, 3921–3928.
- Rocha-Olivares A, Rosenblatt RH, Vetter RD (1999) Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the Rockfish subgenus *Sebastes* (*Sbastes* Scorpaenidae) based on Mitochondrial cytochrome b and control region sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 11(3) 441-458
- Sadowsky V (1967) Selachier aus dem litoral von São Paulo, Brazil. *Beiträge zur Neotropischen Fauna*, 5: 71-88.
- Saitoh K, Miya M, Inoue JG, Ishiguro NB, Nishida M (2003) Mitochondrial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J Mol Evol.* 56:464-472.
- Sandoval-Castillo J, Rocha-Olivares A, Villavicencio-Garayzar C, Balrt E (2004) Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology* 145, 983-988
- Sanetra M, Crozier RH (2003) Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol.* 12: 2281-2295.
- Santos S, Hrbek, Farias IP, Schneider H, Sampaio I (2006) Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Molecular Ecology* 15, 4361–4373
- Santos S, Schneider H, Sampaio I (2003) Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 151–161.

- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1079–1089.
- Schrey AW, Heist EJ (2003) Microsatellite analysis of population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60, 670–675.
- 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.
- Shivji MS, Clarke S, Pank M (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, 16, 1036-1047
- 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.
- Silva PMC (1968). O fenômeno ressurgência na costa meridional brasileira. *Publicações do Instituto de Pesquisas Marinhas, São Paulo* 24: 1 –31.
- Simpfendorfer CA, Milward NE (1993) Utilization of a tropical bay as a nursery area by sharks of the families Carcharhinidae and Sphyrnidae. *Environmental Biology of fishes*, 37, 337–345.
- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G (2001) Population structure and geography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South american rivers. *Mol Ecol.* 10: 407-417.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution.* 47: 264-279.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science.* 236:787-792.
- Smith WD, Bizzarro JJ, Richards VP, Nielsen J, Marquez-Farias F, Shivji MS (2009) Morphometric convergence and molecular divergence: the taxonomic status and evolutionary history of *Gymnura crebripunctata* and *Gymnura marmorata* in the eastern Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology* 75, 761-783
- Sneath PHA & Sokal RR (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

- Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios – SBEEL (2005) Plano Nacional de Ação para a Conservação e o Manejo dos estoques de Peixes Elasmobrânquios no Brasil. Recife www.sbeel.org.br/downloads/plano.pdf
- Solé-Cava AM, Levy J, Vooren C (1983) Isozymic differentiation of two sibling species of *Squatina* (Chondrichthyes) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75,354-358
- Souza AM, Kakimoto JE, Intlizano W (1999) Anatomia descritiva dos cíngulos peitoral e pelvino, e respectivos pterigióforos de *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1839) (Carcharhinidae, Elasmobranchii). *Publ Avul Inst.Pau Brasil*. 2:13-33.
- Springer VG (1964) A revision of the carcharhinid shark genera *Scoliodon*, *Loxodon*, and *Rhizoprionodon*. *Proceedings of the US National Museum*, 115, 559-632
- Stepien CA, Faber JE (1998) Population genetic structure., Philogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. *Mol Ecol*. 7: 1757-1769.
- Stevens JD (2004) Taxonomy and field techniques for identification: with listing of available regional guides. *In: Musick, J. A. & Bonfil, R. Elasmobranch Fisheries Management Techniques*. Asia Pacific Economic Cooperation, IUCN. 370.
- Stingo V (1979) New developments in vertebrate cytotaxonomy. II. The chromosomes of the cartilaginous fishes. *Genetica*, 50: 227-239.
- Strauss E (1999) Can mitochondrial clocks keep time? *Science*. 283:1435-1438.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends ecol Evol*. 15:199-203
- Szymura JM, Spolsky C, Uzzell T (1986) Concordant change in mitochondrial and nuclear gene in a hybridzone between two frog species (genus *Bombina*). *Experientia*. 41:1469-1470.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11030-11035
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotype associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619–633.

- Thacker CE (2003) Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol.* 26: 354-368.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Travassos MF, Hazin FHV (2005) National report of Brazil - Brazilian tuna fisheries - 2005 Annual meeting of the ICCAT standing committee on research and statistics (SCRS) - ICCAT.
- 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.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* (31) 3688-3691.
- Vooren CM, Klippel S, Galina AB (2005) Biologia e status de conservação dos tubarões-marelo, *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena*. In: Vooren, C. M. & Klippel (editores) *Ações para conservação de tubarões e raias no Sul do Brasil*. Editora Igaré, Porto Alegre. 262 p.
- Waples RS, Gustafson RG, Weitkramp LA (2001) Characterizing diversity in salmon from the Pacific Northwest. *Journal of Fish Biology*, 59, 1–41.
- Ward RD, Holmes BH, White WT, Last PR (2008) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research*, 59, 57-71
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 20
- Waugh J (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29:188-197.
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8392–8396.
- Wong EHK, Shivji M, Hannner R (2009) Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. *Molecular Ecology Resources*, 9, 243-256
- Yokota L & Lessa RP (2006) Nursery area for sharks and rays in Northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75:349-360.