



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**

**Instituto de Biociências de Botucatu - IBB**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia**

**Dissertação de Mestrado**

**Estrutura genética populacional de *Squatina guggenheim***

**(Squatiniformes, Squatinidae): um endêmico e**

**ameaçado cação-anjo do Atlântico Sudoeste**

**Ingrid Vasconcellos Bunholi**

**Botucatu - SP**

**2020**

INGRID VASCONCELLOS BUNHOLI

**Estrutura genética populacional de *Squatina guggenheim*  
(Squatiniformes, Squatinidae): um endêmico e ameaçado  
cação-anjo do Atlântico Sudoeste**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça

Coorientador: Dr. Rodrigo Rodrigues Domingues

**Botucatu - SP**

**2020**

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

Bunholi, Ingrid Vasconcellos.

Estrutura genética populacional de *Squatina guggenheim* (Squatiniformes, Squatinidae) : um endêmico e ameaçado cação-anjo do Atlântico Sudoeste / Ingrid Vasconcellos Bunholi. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Fernando Fernandes Mendonça  
Coorientador: Rodrigo Rodrigues Domingues  
Capes: 20406010

1. Peixe. 2. Elasmobrânquios. 3. Genética populacional. 4. Variação genética. 5. Levantamentos demográficos.

Palavras-chave: Elasmobrânquios; Genética da conservação; Genética populacional; Marcadores moleculares; Peixes.

*Dedico aos meus pais, Marli e Norival, como parte da gratidão que tenho por tudo que fazem por mim.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por toda a força e sabedoria fornecidas durante essa etapa, cada oração foi fundamental para a iluminar minhas escolhas e decisões. Hoje me orgulho muito deste trabalho e tenho certeza que Ele também.

Agradeço aos meus pais, Marli e Norival, e meu irmão, Willian, que tanto me incentivam a seguir minha trajetória acadêmica e valorizam meus estudos. Obrigada por acreditarem em mim e me aconselharem tanto em meio as turbulências, principalmente nessa reta final. Sem o apoio de vocês nada disso teria sido possível. Serei eternamente grata pela oportunidade que me deram de estudar e estarei buscando orgulhá-los cada vez mais. Em geral, agradeço a todos os membros da minha família que, de alguma forma, me apoiaram ao longo desse percurso.

Na mesma intensidade, agradeço ao meu companheiro Leonardo, que tanto me auxiliou, me acalmou, e mais inúmeras tantas coisas que foram essenciais durante esse período. Obrigada por ser meu equilíbrio e por se esforçar tanto para entender sobre tubarões e genética, mesmo sendo um assunto totalmente fora de suas especialidades. Você tem grande parcela nessa minha conquista, principalmente na manutenção da minha sanidade e paz. Obrigada por tanto.

Agradecimento especial ao meu querido orientador Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça, por tudo que fez por mim e por acreditar no meu trabalho, desde o começo. Serei sempre muito grata por todas as oportunidades proporcionadas para meu desenvolvimento acadêmico. Grande obrigada ao Bruno (Pitera) por todas as análises ensinadas durante esse período, saiba que esse trabalho não seria possível sem seus ensinamentos. De forma geral, obrigada a todos meus queridos parceiros do Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação (GenPesC), meu co-orientador Rodrigo, Vitoria e Letícia, por todo o suporte, ensinamentos e

amizade. Durante 5 anos pude fazer parte desse grupo de pesquisa e espero ter contribuído para seu desenvolvimento.

Gostaria de agradecer também a todo o pessoal do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBPG) – UNESP Botucatu por me acolherem tão bem durante minhas idas e vindas. Posso dizer que sempre me senti em casa com vocês, tanto no laboratório como nos “churras”. De forma especial agradeço a Aisni Mayumi, minha grande amiga que me acolheu tão bem em sua casa desde as primeiras disciplinas. Obrigada por tudo amiga, por todas as vezes em que você acordou as 4h da manhã para me buscar na rodoviária (desculpe por isso) e por todas as nossas trocas de conselhos.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica (Zoologia) da UNESP de Botucatu, a Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP pela infraestrutura fornecida e aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 8888720082620180) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2017/17605-3), que proporcionaram a realização do meu trabalho.

## Resumo

Recursos pesqueiros compreendem importantes fontes econômicas e são essenciais em muitas regiões, porém, seu acesso não regulamentado e insustentável pode ocasionar acentuados declínios populacionais em muitas espécies. O cação-anjo *Squatina guggenheim* é um tubarão costeiro e endêmico do Atlântico Sudoeste e um dos principais alvos da pesca incidental. Em decorrência disso, esses tubarões apresentam fortes sinais de declínio populacional e estão atualmente classificados como “Em Perigo” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). A partir desse cenário, este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de diversidade genética, estrutura populacional e aspectos demográficos de *S. guggenheim* no Atlântico Sudoeste, utilizando marcadores moleculares mitocondriais: Região Controle (RC), Citocromo B (CytB), Citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) e o marcador molecular nuclear: *internal transcribed spacer 2* (*its-2*). Detectamos altos índices de diversidade genética para os marcadores mitocondriais concatenados em 122 amostras ( $h_{RC+COI+CytB} = 0.838$ ;  $\pi_{RC+COI+CytB} = 0.0017$ ) e uma significativa estruturação populacional para os mesmos marcadores ( $\Phi_{ST\ RC+COI+CytB} = 0.2992$ ,  $p=0.001$ ), enquanto o marcador nuclear demonstrou ausência de estruturação. A maior divergência genética foi observada entre as populações Sudeste do Brasil (SEBR) e Sul do Atlântico Sudoeste (SASO). As análises filogenéticas apresentam a presença de duas linhagens matrilineares simpátricas para a espécie, que divergiram 1,26 milhões de anos atrás (Mia) durante o Pleistoceno. Sinais de expansão demográfica leve foram detectadas no mesmo período geológico para ambas as populações, porém ocorridas em eventos glaciais-interglaciais diferentes. Essas descobertas refletem uma alta fragilidade desta espécie ameaçada de tubarão frente aos impactos da pesca local e fornecem informações relevantes para a elaboração de planos de conservação eficazes para preservar seu potencial evolutivo, principalmente nas regiões mais frágeis.

**Palavras-chave:** Espécie endêmica, espécies ameaçadas, genética populacional, diversidade genética, filogeografia, genética da conservação

## Abstract

Fishery resources are essential economic sources and a profitable activity in many regions however its unregulated and unsustainable access can provide major population declines for many species. The angel shark *Squatina guggenheim* is a coastal and endemic shark from the southwestern Atlantic Ocean and has been the main victims of bycatch fishing. As a result, this shark set out high signs of population decline and is currently listed as “Endangered” by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). In this view, the present study aimed to investigate the levels of genetic diversity, population structure and demographic aspects of *S. guggenheim* in the Southwest Atlantic using three mitochondrial DNA (mtDNA) molecular markers: mitochondrial control region (CR), Cytochrome b (CytB), Cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and one nuclear molecular marker: internal transcribed spacer 2 (*its-2*). We detected high mitochondrial genetic diversity in 122 samples for concatenated mtDNA markers  $h_{CR+COI+CytB} = 0.838$ ;  $\pi_{CR+COI+CytB} = 0.0017$  and significant population genetic structure ( $\phi_{ST}^{CR+COI+CytB} = 0.2992$ ,  $p=0.001$ ), whereas no population structure was detected in the nuclear marker. The highest genetic divergence was observed between two populations: Southeast Brazil (SEBR) and South-Southwest Atlantic (SASO). Phylogenetics analyses show the presence of two sympatric matrilineal lineages, which diverged about 1.26 million years ago during the Pleistocene. Signs of smooth demographic expansion were also detected at the same geologic period for both populations but occurring during distinct glacial events. These findings reflect a high fragility for this endangered shark to local fishing impacts and provide relevant information for the elaboration of effective conservation plans to preserve its evolutionary potential mostly in the more fragile regions.

**Keywords:** Endemic species, threatened species, population genetics, genetic diversity, phylogeography, conservation genetics.

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>5</b>
1.1. Aspectos gerais dos elasmobrânquios .....	5
1.2. Os impactos da pesca nos elasmobrânquios.....	6
1.3. O cação-anjo <i>Squatina guggenheim</i> .....	9
1.4. A importância das ferramentas moleculares na conservação de tubarões .....	15
1.5. Estudos genético-populacionais e filogeográficos em elasmobrânquios .....	16
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivos específicos.....	19
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1 Locais de coleta e amostragem.....	19
3.2 Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciamento .....	21
3.3 Processamento dos dados genéticos.....	23
3.4 Estimativas de diversidade genética e estruturação populacional.....	24
3.5 Relações filogenéticas e estimativas demográficas .....	25
<b>4. Resultados.....</b>	<b>27</b>
4.1 Dados gerais .....	27
4.2 Variabilidade genética e estruturação populacional .....	28
4.3 Relações filogenéticas e história demográfica .....	37
<b>5. Discussão.....</b>	<b>43</b>
5.1 Diversidade genética e estruturação populacional .....	43
5.2 Filogeografia e demografia histórica.....	48
5.3 Dados genéticos e a contribuição para a conservação .....	51
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>54</b>

## Lista de Acrônimos

+I – Proporção de Sítios Invariáveis

$\mu$  - Taxa de Mutação

AMOVA - Análise de Variância Molecular

AUCFZ - Zona de Pesca Comum da Argentina e Uruguai

BEAST – *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSP - *Bayesian Skyline Plot*

BSSP – Baixada Santista São Paulo

CITES - Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção

cm – Centímetros

COI – Citocromo *c* oxidase subunidade I

CT – Comprimento Corporal Total

CTMFM - *Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo*

CytB – Citocromo B

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNAmT – DNA mitochondrial

FAO – (*Food and Agriculture Organization*) Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

$F_s$  – Teste de neutralidade  $F_s$  de Fu (1987)

$F_{ST}$  – Índice de Fixação (F) de Wright

GenPesC - Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação da Universidade Federal de São Paulo

$H$  – Número de haplótipos

$h$  – Diversidade haplotípica

HKY - Modelo de substituição de nucleotídeos Hasegawa, Kishino & Yano (1985)

IBD – *Isolation by distance*

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

*its-2* - Espaçador da unidade ribossomal nuclear 2

K – Número de clusters

L1 - Linhagem 1

L2 - Linhagem 2

LNSP – Litoral Norte de São Paulo

LSSP – Litoral Sul de São Paulo

m - Metros

Ma – Milhares de Anos Atrás

MCMC – *Markov Chain Monte Carlo*

Mia - Milhões de Anos Atrás

MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*

n – Número de indivíduos

*Nef* - Tamanho Efetivo Populacional de fêmeas

OIS 6 - *Oxygen Isotopic Stages*

pb – Pares de Bases Nucleotídicas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PPG – Período da Penúltima Glaciação

$PR_2$  - p-valor  $R_2$

$P\Phi_{ST}$  - p-valor do Índice F de Wright

$R_2$  – Teste de Neutralidade  $R_2$  de Ramos-Orsins & Rozas (2002)

RC – Região Controle do DNAm

S - Número de sítios polimórficos

SASO – População Sul do Atlântico Sudoeste

SEBR – População Sudeste do Brasil

SOBR – Sul do Brasil

t - Toneladas

T – Tempo de Divergência entre as linhagens

TrN - Modelo de substituição de nucleotídeos Tamura-Nei

TTOL - *Timetree: the timetree of life*

UMG – Último Máximo Glacial

UYAG – Uruguai-Argentina

WCS – *The World Conservation Strategy*

$\alpha$  – Valor de Gamma

$\pi$  - Diversidade nucleotídica

$\Phi_{ST}$  – Índice análogo ao F de Wright

## Lista de Figuras

- Figura 1** - Exemplos dos cações-anjo endêmicos do Atlântico Sudoeste. A – Exemplar de *Squatina guggenheim*; B – Exemplar de *Squatina occulta*; C – Exemplar de *Squatina argentina*. Fonte: Gadig, Otto Bismarck Fazzano (11.12.01) fishbase.org ..... 10
- Figura 2** - Exemplar de *Squatina guggenheim*. Fonte: Andy Murch – elasmodiver.com ..... 11
- Figura 3** - Distribuição geográfica endêmica do Atlântico Sudoeste de *Squatina guggenheim*. ..... 12
- Figura 4** - Mapa da amostragem do cação-anjo *Squatina guggenheim* coletadas para este estudo. LNSP: Litoral Norte – SP (-23.697 S; -44.809 W); BSSP: Baixada Santista (-24.371 S; -46.606 W); LSSP: Litoral Sul – SP (-25.058 S; -47.653 W); SOBR: Sul do Brasil (-29.12 S; -47.828 W); UYAG: Uruguai-Argentina (-36.826 S; -55.195 W)..... 21
- Figura 5** - Possíveis barreiras ao fluxo gênico identificadas na população de *Squatina guggenheim*, por meio do software BARRIER 2.2. A espessura das linhas vermelhas indica barreiras mais e menos significativas. Os haplótipos distribuídos entre as regiões amostrais são referentes a Região Controle do DNAm e foram obtidos pelo software PopART 1.7. LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina. .... 33
- Figura 6** - Análise de estruturação genética espacial bayesiana em *Squatina guggenheim* - output GENELAND; **A.** O histograma mostra a frequência do valor K inferido entre as corridas, evidenciando K = 2 como o número de clusters mais provável; **B.** Cluster 1 – SASO (regiões: SOBR e UYAG); **C.** Cluster 2 – SEBR (regiões: LNSP; BSSP e LSSP). ..... 34
- Figura 7** - Rede de Haplótipos *Median-Joining* dos genes individuais de *Squatina guggenheim*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo; os segmentos representam um evento mutacional e os pontos negros, haplótipos hipotéticos não amostrados. LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina..... 36
- Figura 8** - Inferência Filogenética obtida a partir de 1522 pb (RC-COI) de *Squatina guggenheim*. (a) Rede haplotípica *Median-joining* baseada na matriz RC-COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. Os segmentos representam um evento

mutacional. (b) Inferência Filogenética Bayesiana com idade dos nós em anos obtidos a partir da matriz RC-COI. As cores indicam clados que apresentam isolamento geográfico. O táxon terminal circulado é o indivíduo representante do haplótipo mais frequente (Hap\_2). L1: linhagem 1, L2: linhagem 2. ARJ: Rio de Janeiro; ARG: Argentina; CAN: Cananéia; GJA: Guarujá; IC: Ilha Comprida; MO: Mongaguá; PE: Peruíbe; PR: Paraná; SAN: Santos; SC: Santa Catarina; TOR: Torres; UBA: Ubatuba; URY: Uruguai. ....38

**Figura 9** - Rede de Haplótipos *Median-joining* entre as linhagens mitocondriais de *Squatina guggenheim* utilizando matriz molecular RC-COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo; os segmentos representam um evento mutacional e os pontos negros, haplótipos hipotéticos não amostrados.....40

**Figura 10** - *Bayesian Skyline Plot* (BSP) de *Squatina guggenheim*. O eixo x está em unidades de milhões de anos atrás (Mia) e o eixo y é o produto do tamanho efetivo da população (*N<sub>ef</sub>*) multiplicado pelo tempo de geração. A linha sólida é a estimativa mediana; a sombra azul mostra os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD); e a sombra cinza refere-se ao Período da Penúltima Glaciação (PPG) – 180 Ma – 140 Ma (*Oxygen Isotopic Stages – OIS 6*). SEBR: população Sudeste do Brasil; SAO: população sul do Atlântico Sudoeste. ....42

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Informações sobre os pares de iniciadores utilizados em *Squatina guggenheim* para cada gene e suas referências. (D-LOOP refere-se: RC).....22
- Tabela 2** - Estatísticas populacionais da espécie *Squatina guggenheim* para cada dataset molecular. Número de indivíduos ( $n$ ); número de haplótipos ( $H$ ); número de sítios polimórficos ( $S$ ); diversidade haplotípica ( $h$ ); diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). .....29
- Tabela 3** - Análise AMOVA para cenários populacionais hipotéticos de *Squatina guggenheim*.  $\phi_{ST}$ , Índice F de Wright;  $P \phi_{ST}$ , p-valor do Índice F de Wright; Os valores em negrito são significativos ( $P < 0.05$ ) após correção Benjamini-Hochberg; LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina.....30
- Tabela 4** - Análise de comparação por pares  $\phi_{ST}$  para cada matriz gênica (abaixo da diagonal) de *Squatina guggenheim* entre as regiões amostradas no Atlântico Sudoeste e os p-valores (acima). Os valores em negrito são significativos após correção Benjamini-Hochberg; os valores em itálico são significativos antes da correção e n.s. são os valores não significativos ( $P > 0.05$ ); LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina.....32
- Tabela 5** - Estatísticas populacionais de *Squatina guggenheim* utilizando somente a matriz molecular RC-COI.  $n$ , número de indivíduos;  $S$ , número de sítios polimórficos;  $H$ , número de haplótipos;  $h$ , diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica. L1 = Linhagem 2 e L2 = Linhagem 2. ....39
- Tabela 6** - Estimativas dos Testes de Neutralidade para *Squatina guggenheim* entre as regiões amostradas e as linhagens identificadas.  $F_s$ , Fu's  $F_s$  teste;  $P F_s$ , P valor de Fu's  $F_s$  teste (significância  $P < 0.02$ );  $R_2$ , Ramos-Onsins & Rozas teste;  $P R_2$ , P valor de  $R_2$  teste (significância  $P < 0.05$ ) Em negrito valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.....41

## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos gerais dos elasmobrânquios

Os tubarões, juntamente com as raias e quimeras, são peixes cartilagosos que compreendem a classe dos Chondrichthyes, composta por duas subclasses: Elasmobranchii (tubarões e raias) e Holocephali (quimeras) (Ebert *et al.*, 2013). Esses animais compõem uma linhagem única e importante na evolução dos vertebrados. No entanto, representam apenas uma pequena fração da fauna moderna de peixes (< 3.0%) (Nelson, Grande & Wilson, 2016; Weigmann, 2016).

Informações atuais relatam a existência de aproximadamente 1.188 espécies de peixes cartilagosos em todo o mundo, sendo a subclasse Elasmobranchii a mais representativa com 509 espécies de tubarões e 630 de raias (Weigmann, 2016). No entanto, em comparação aos teleósteos marinhos, os elasmobrânquios apresentam baixa riqueza de espécies (Domingues *et al.*, 2018). Apesar de representarem a minoria entre os peixes modernos, esses animais constituem uma das linhagens de vertebrados mais antigas e ecologicamente diversas, caracterizados por uma rápida radiação adaptativa que proporcionou a conquista do papel de predadores de cadeia (Compagno, 1990; Kriwet, Kiessling & Klug, 2009; Dulvy *et al.*, 2014). Além disso, esses animais apresentaram características adaptativas a diversos ecossistemas que, conseqüentemente, garantiram menores taxas de extinção histórica após diversas pressões seletivas (Ferretti *et al.*, 2010; Grogan *et al.*, 2012; Ebert *et al.*, 2013; Domingues *et al.*, 2018). O papel ecológico desses animais é essencial para a regulação de todo o ecossistema, pois, como predadores de topo de cadeia, são capazes de manter as populações de diversos níveis tróficos em equilíbrio, contribuindo para a manutenção da diversidade nos ambientes marinho (Camhi *et al.*, 1998).

Mesmo compondo uma das linhagens de vertebrados mais antigas e terem apresentado potencial evolutivo frente a pressões seletivas históricas, os elasmobrânquios possuem

características biológicas únicas que os tornam intrinsicamente sensíveis a pressões seletivas antrópicas, como a sobrepesca. Essas características biológicas influenciam na capacidade de restabelecimento populacional, pois são animais de crescimento lento, maturação gonadal tardia, baixa prole e alta longevidade, caracterizando-os, em sua maioria, como “k-estrategistas”, que possuem períodos de gestação mais longos entre os vertebrados e um dos mais altos níveis de investimento materno no reino animal (Cortés, 2000; Grogan *et al.*, 2012; Dulvy *et al.*, 2014). Dessa forma, as populações de elasmobrânquios são altamente suscetíveis a impactos no tamanho, estrutura e abundância sazonal (Myers & Worm, 2005; Burrows *et al.*, 2011; Molinos *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2017).

### *1.2. Os impactos da pesca nos elasmobrânquios*

A pressão seletiva antrópica que lidera os declínios populacionais de diversas populações marinhas é a sobrepesca, tanto através da mortalidade de recursos-alvo quanto aos múltiplos efeitos colaterais em espécies não-alvo (Crain *et al.*, 2009). A complexidade da cadeia trófica explica a influência indireta da sobrepesca em todos os níveis, como por exemplo, a alta exploração de um predador que pode acarretar no desbalanceamento em cascata de todos os níveis tróficos (Brander, 2007; Ramírez *et al.*, 2017). Além disso, o impacto da sobrepesca na diversidade genética deve ser considerado como uma das principais ameaças aos elasmobrânquios, elevando os riscos de extinção (Olsen *et al.*, 2004; Allendorf, Luikart & Aitken, 2013).

Em geral, os elasmobrânquios são frequentemente capturados pela pesca incidental, porém, o interesse na obtenção desses animais tem aumentado à medida que as espécies-alvo (teleósteos de alto valor econômico) se tornam menos acessíveis e, também, devido ao alto interesse econômico nas nadadeiras de tubarão (Dulvy *et al.*, 2014). Tendo em vista a estratégia de vida k-estrategista na maioria das espécies e as características biológicas únicas, os elasmobrânquios são um dos principais grupos de peixes ameaçados pela sobrepesca,

possuindo baixas taxas de recuperação, uma vez que as populações sofreram decréscimos populacionais (Stevens *et al.*, 2000; Musick, 2005; Dulvy *et al.*, 2014; Davidson, Krawchuk & Dulvy, 2016).

Segundo a revisão recente efetuada por Okes & Sant (2019), referente aos dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) para elasmobrânquios da última década completa (2007 a 2017), o Brasil foi elencado dentro dos top 20 países com maior índices de captura reportada, ocupando a 9º posição mundial, com 19,877 toneladas (t) por ano. De forma geral, quase 80% das capturas recentes foram relatadas no Oceano Atlântico e em mares adjacentes, destacando a vulnerabilidade da diversidade de elasmobrânquios exclusiva dessa região. Neste contexto, um total de 153 espécies de tubarões e outros 28 grupos taxonômicos de espécies de tubarões, raias e quimeras foram registrados como capturados pelas pescarias internacionais em todo o mundo (FAO, 2019; Okes & Sant, 2019).

Dentre os impactos pesqueiros em elasmobrânquios, o comércio internacional de barbatanas é a atividade pesqueira mais alarmante e divulgada, tendo os tubarões como foco principal (Clarke *et al.*, 2013; Dulvy *et al.*, 2014). A alta demanda das barbatanas de tubarão advém do mercado asiático para a produção das sopas de barbatanas, considerada uma iguaria gastronômica cultural chinesa (Dulvy *et al.*, 2014). Durante muitos anos, o Brasil foi um dos principais líderes de exportação de barbatanas para o mercado asiático, refletindo em um declínio populacional forte de muitas espécies endêmicas da América do Sul e da costa brasileira (Okes & Sant, 2019). Além disso, o processamento desses produtos, como a secagem das nadadeiras, prejudica os diagnósticos de identificação através de características morfológicas, comprometendo a aplicação de efetivas leis de fiscalização e proteção de espécies ameaçadas (Fields *et al.*, 2018, Ferrette *et al.*, 2019b). No entanto, apesar da existência de ações de manejo e conservação, pesquisas atuais demonstram que muitos desembarques

pesqueiros não são reportados pelos órgãos regulamentadores, principalmente quando se trata de dados de pescas artesanais de pequena escala e pescas incidentais, tais quais ainda refletem a pesca de espécies protegidas (De-Franco *et al.*, 2012; Zeller *et al.*, 2015; Almerón-Souza *et al.*, 2018; Bunholi *et al.*, 2018; Ferrette *et al.*, 2019b).

A pesca incidental também apresenta forte impacto nas espécies de elasmobrânquios, causada principalmente por alguns artefatos de pesca em que o recurso-alvo são peixes adultos e camarões (redes de emalhe e arrasto de fundo) que frequentemente capturam altos percentuais de espécies não-alvo sem valor comercial ou exemplares-alvo de pequeno tamanho, que influenciam negativamente o ciclo de vida e a recomposição natural do estoque (Chaves & Silva, 2019). Estima-se que essas espécies não-alvo compreendam 50% do total desembarcado no arrasto dirigido a peixes e de 70 a 90% no arrasto dirigido a camarões (Klippel *et al.*, 2005). Algumas estimativas globais sugerem que até 39,5 milhões de toneladas de peixe podem ser capturadas como captura incidental a cada ano (Davies *et al.*, 2009). Uma grande parcela das espécies capturadas é vendida ou devolvida ao mar (vivas ou mortas), e caracterizam principalmente espécies ameaçadas de extinção ou protegidas por lei (Gray & Kennelly, 2018; Ferrette *et al.*, 2019a). A pesca incidental também afeta uma variedade de outros táxons, como aves marinhas, tartarugas marinhas, peixes e mamíferos marinhos (Lewison *et al.*, 2014). Além disso, a comercialização dos elasmobrânquios em países em desenvolvimento é geralmente efetuada por meio do nome popular, sem a identificação adequada da espécie. No Brasil, esses animais são vendidos como “cação”, e grande parte dos consumidores não tem conhecimento de que essa denominação se refere a qualquer espécie de tubarão, o que sustenta o comércio de diversas espécies ameaçadas de extinção (Bornatowski *et al.*, 2013).

Os impactos pesqueiros mencionados juntamente às características biológicas dos elasmobrânquios, refletem os índices de espécies ameaçadas de extinção atualmente observados, que podem ser visualizado em números por meio da análise efetuada pelo Grupo

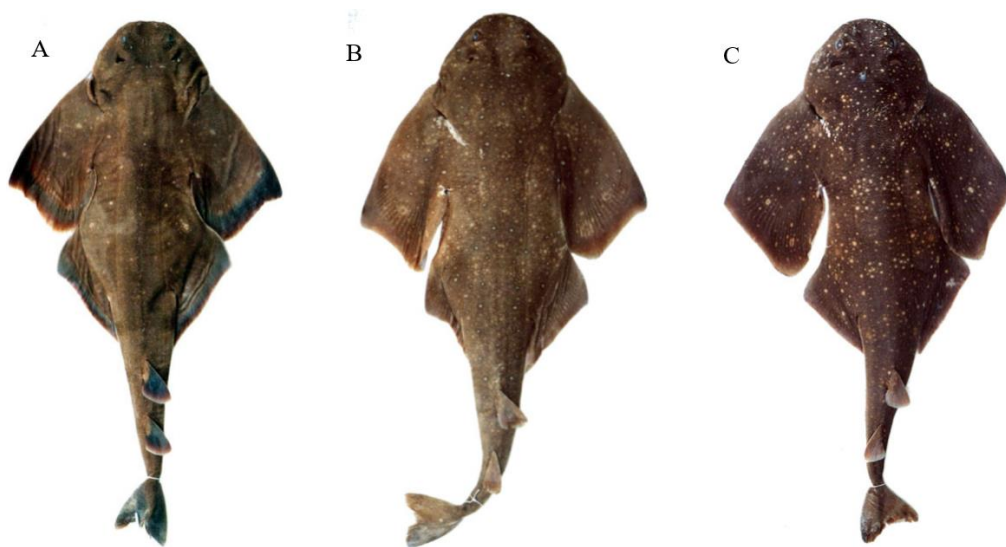
de Especialistas em Tubarões da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), mostrando que 24% das espécies de Chondrichthyes estão ameaçadas de extinção, dentro das categorias de Criticamente Ameaçadas, Em Perigo ou Vulneráveis (Dulvy *et al.*, 2014). Esse grupo diverso possui membros considerados espécies-alvo e também espécies não-alvo, e em sua maioria, possuem características que os enquadram dentro dos peixes com alto potencial de colapsos populacionais devido a sobrepesca.

### 1.3. O cação-anjo *Squatina guggenheim*

Dentre os elasmobrânquios, há um grupo de tubarões tão diferenciado que foi necessário criar uma divisão taxonômica exclusiva: a ordem Squatiniformes (de Buen, 1926), com a única família Squatinidae (Bonaparte, 1838) e único gênero *Squatina* (Dumeril, 1806). Esses animais possuem o corpo achatado dorso ventralmente, duas nadadeiras dorsais, duas nadadeiras pélvicas e a nadadeira caudal, com ausência de nadadeira anal. As nadadeiras peitorais são grandes em proporção com o resto do corpo e estendem-se para frente e para trás aos lados da cabeça e do abdômen. As extensões da nadadeira peitoral não são fixas à cabeça nem ao abdômen, e as cinco fendas branquiais são situadas na face lateral da cabeça. (Vooren & Klippel, 2005). Os cações-anjo, como são comumente conhecidos no Brasil, diferem-se dos demais tubarões na forma corporal, no modo de vida e em sua biologia e consistem em um grupo de tubarões extremamente antigo, com idade paleontológica de 120 milhões de anos e sem alterações estruturais desde o período Jurássico (Cappetta, 1987).

A família Squatinidae (Bonaparte, 1838) possui um único gênero formado por 22 espécies (Ebert *et al.*, 2013) em que 3 são endêmicas do Atlântico Sudoeste: o cação-anjo-espinhoso *Squatina guggenheim* (Marini, 1936), o cação-anjo-de-asa-curta *Squatina occulta* (Vooren & Silva, 1991) e o cação-anjo-de-asa-longa *Squatina argentina* (Marini, 1930). As espécies de cações-anjo são visivelmente difíceis de identificar e as capturas são em grande parte reportadas em nível genérico, principalmente devido à sobreposição da distribuição

geográfica das três espécies no Atlântico Sudoeste e a alta semelhança morfológica (Bunholi *et al.*, 2018). Especificamente para os cações-anjo do Atlântico Sudoeste, as diferenças morfológicas entre as 3 espécies são pequenas (Figura 1), se baseando na conformação da nadadeira peitoral, na presença ou ausência de uma fileira de espinhos ou tubérculos entre a cabeça e a 1ª nadadeira dorsal e nos tamanhos do neonato e do adulto (Vooren & Klippel, 2005).



**Figura 1** - Exemplos dos cações-anjo endêmicos do Atlântico Sudoeste. A – Exemplo de *Squatina guggenheim*; B – Exemplo de *Squatina occulta*; C – Exemplo de *Squatina argentina*. Fonte: Gadig, Otto Bismarck Fazzano (11.12.01) fishbase.org

*Squatina guggenheim* (Figura 2) é um pequeno tubarão demersal endêmico que atinge um comprimento corporal total (CT) máximo de 95 centímetros (cm) e idade máxima de 12 anos, sendo consideravelmente de menor tamanho e tempo de vida em comparação aos outros cações-anjo do Atlântico Sudoeste (Ebert *et al.*, 2013). A espécie habita substratos de areia ou lamosos da plataforma continental e do talude, desde águas costeiras rasas de 10 a 100 metros (m) (habitat mais comum) até a profundidades de 1300 m (Vooren & Klippel, 2005), distribuídos entre o Rio de Janeiro (24°S) e norte da Patagônia (42°S) (Figura 3) (Awruch *et*

*al.*, 2008), podendo variar de acordo com mudanças sazonais relacionadas ao ciclo reprodutivo da espécie (Vooren & Klippel, 2005).



**Figura 2** - Exemplar de *Squatina guggenheim*. Fonte: Andy Murch – elasmodiver.com

O Atlântico Sudoeste, região de distribuição endêmica de *S. guggenheim*, é caracterizado por uma alta complexidade oceanográfica (Acha *et al.*, 2004). As áreas marinhas costeiras desta região são afetadas pela confluência de diferentes massas de água, a corrente subtropical do Brasil e a corrente subantártica de Malvinas, que convergem entre 30°S e 40°S, representando parte da Convergência Subtropical que ocorre nessa região (Piola *et al.*, 2000). Além disso, grandes descargas de água doce ocorrem nessa região devido à presença da Lagoa dos Patos (32°S) e do Rio da Prata (35°S), que geram uma pluma estuarina estendida de 50 km e 240 km, respectivamente (Odebrecht & Castello, 2001; Acha *et al.*, 2004). Esse processo de mistura oceanográfica contribui para uma alta variabilidade físico-química nessa região, caracterizando a alta capacidade de resiliência *S. guggenheim*.



**Figura 3** - Distribuição geográfica endêmica do Atlântico Sudoeste de *Squatina guggenheim*.

Um dos berçários já constatados de *S. guggenheim* ocorre em águas rasas com menos de 30 m de profundidade ao longo da costa do Rio Grande do Sul, entre as cidades de Torres e Chuí (31°50'S e 33°30'S), no período de outubro a fevereiro, evidenciado pela abundância de neonatos e fêmeas prenhes encontrados nessas regiões (Vooren & Klippel, 2005). A fase reprodutiva é iniciada aproximadamente aos 4 anos de idade e 73-80 cm CT em ambos os sexos e o modo de reprodução desta espécie consiste na viviparidade lecitotrófica, na qual o ovócito maduro contém o vitelo necessário para o crescimento do embrião. Em cada gestação, a fêmea produz cerca de aproximadamente 300 gramas de vitelo, consistindo em 10% de seu peso corporal (Vooren & Klippel, 2005). Devido ao estilo de vida lento, a preparação gestacional ocupa cerca de 2 anos da vida da fêmea de *S. guggenheim*, e o período gestacional 12 meses, totalizando um ciclo reprodutivo de 3 anos (Silva, 1996). Além disso, esse tubarão possui baixo

potencial reprodutivo, produzindo cerca de 3 a 9 embriões por ciclo, com intervalo de geração de 8 anos (Vieira, 1996). Neste sentido, é importante ressaltar que a existência de uma abundante população de cações-anjo é resultado de um longo e lento processo de crescimento populacional, evidenciando a fragilidade da espécie aos impactos da sobrepesca, principalmente nas regiões de berçário, onde a captura causa impacto direto ao recrutamento da população de *S. guggenheim* (Vooren & Klippel, 2005).

A alimentação desses tubarões baseia-se principalmente em peixes, crustáceos e cefalópodes, que são capturados através de métodos particulares de caça. Os cações-anjo aguardam suas presas enterrados e imóveis na camada superficial do sedimento, e no momento correto realizam a captura através de um rápido movimento da cabeça (Vooren & Klippel, 2005), eles também selecionam suas presas com tamanhos adequados para serem engolidas por inteiro (Compagno, 1984). Apesar da baixa e lenta frequência reprodutiva dos cações-anjo, é sabido que esses animais possuem poucos inimigos naturais, de modo que, sem os impactos da sobrepesca, a pequena taxa de reprodução é o suficiente para manter a população saudável (Vooren & Klippel, 2005).

No entanto, devido seu hábito de vida em zonas costeiras, os cações-anjo são um dos animais mais suscetíveis a pesca incidental, principalmente pela frota industrial de pesca-de-arrasto e espinhel de fundo (Chiaramonte, 1998; Paesch & Domingo, 2003; Villwock de Miranda & Vooren, 2003). No Brasil, em consequência da sobrepesca, dados sobre estatísticas pesqueiras entre os anos de 1986 e 2002 constatam que a população de *S. guggenheim* declinou cerca de 85% e atualmente está classificada como “Criticamente Ameaçada” no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através de considerações regionais realizadas (ICMBio, 2018). É importante ressaltar que o livro elenca a necessidade de avaliação estadual costeira de São Paulo, que é a única região com ausência de informações populacionais desta

espécie (ICMBio, 2018). Globalmente, a espécie está classificada como “*Endangered*” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (Oddone et al., 2019).

A partir deste cenário de alerta, constituiu-se a Instrução Normativa nº 005, de 21 de maio de 2004, revalidada pela Portaria Nº 445, de 17 de dezembro de 2014 do Ministério do Meio Ambiente, a qual deliberou a proibição da captura, transporte, armazenamento, manuseio, processamento e comercialização das três espécies de cação-anjo endêmicas do Atlântico Sudoeste (*S. guggenheim*, *S. occulta* e *S. argentina*) no Brasil (Bunholi et al., 2018). Conseqüentemente, segundo dados da UNIVALI (2013), foi possível observar que os desembarques anuais de cação-anjo no sul do Brasil diminuíram acentuadamente de 431 t em 2004 para 5 t em 2012 (Oddone et al., 2019).

No Uruguai e Argentina, não há uma lei de proteção a essas espécies, e sim uma regulamentação de limite de capturas para alguns grupos de elasmobrânquios (incluindo os cações-anjo) na Zona de Pesca Comum da Argentina e Uruguai (AUCFZ) que é fiscalizada pela *Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo* (CTMFM). Porém, não foi observada uma tendência clara de diminuição dos desembarques nos dados de 1996 a 2018 (CTMFM, 2018). Por outro lado, a efetividade dessas ações é questionável, visto que a população de *S. guggenheim* ainda continua em declínio e muitos dos desembarques são constantemente identificados sem regulamentação (Almerón-Souza et al., 2018; Bunholi et al., 2018).

Devido ao estilo de vida dos cações-anjo, muito se é questionado sobre o comportamento populacional. Segundo Vooren & Klippel (2005), as populações desses tubarões são sedentárias e mantêm seu equilíbrio entre nascimentos e mortes mediante o recrutamento dentro de cada área, sem grandes eventos migratórios, como reportados em muitas espécies de tubarões, ou seja, para os cações-anjo, movimentos de dispersão ou migração entre populações vizinhas ocorrem em baixa intensidade e não provocam impactos a curto prazo sobre a estrutura dessas populações. Em face disso, ações de conservação devem

conhecer melhor o status de ameaça da espécie e as características ambientais de seu habitat, considerar o grau de fragmentação populacional e conhecer as taxas de fluxo gênico dentro e entre as populações.

#### *1.4. A importância das ferramentas moleculares na conservação de tubarões*

De acordo com a *The World Conservation Strategy* (WCS) (UNEP – WWF, 1980), a diversidade genética é uma das três prioridades globais na conservação da biodiversidade, pois, em função das mudanças ambientais serem processos contínuos, a diversidade genética permite uma flexibilidade fenotípica para tais mudanças, de forma a contribuir para a evolução dos indivíduos inseridos nestes cenários (Frankham, Briscoe & Ballou, 2002). Em geral, as variações genéticas fornecem informações sobre linhagens evolutivas de táxons, visão intraespecífica e interespecífica sobre a estrutura genética atual e o potencial evolutivo de populações e espécies, que são informações essenciais para o desenvolvimento de planos de manejo sustentável e ações de conservação efetivas (Allendorf *et al.*, 2013).

Estudos recentes vem demonstrando a aplicabilidade das ferramentas moleculares na conservação de elasmobrânquios em diversos âmbitos, sendo utilizados para identificação de espécies ameaçadas vítimas da sobrepesca (De-Franco *et al.*, 2012; Álmeron-Souza *et al.*, 2018; Bunholi *et al.*, 2018; Ferrette *et al.*, 2019a,b), delimitação de unidades de conservação (Avise, 1998; Waples, Punt & Cope, 2008) e identificação de fluxo gênico e estruturação populacional (Chabot *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2019; Hull *et al.*, 2019; Melis *et al.*, 2019).

Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os advindos do DNA mitocondrial (DNAm) possuem propriedades particulares que auxiliam na obtenção de dados genéticos, principalmente por conter taxas de substituição nucleotídica relativamente altas, um sistema de reparo menos eficiente em relação aos DNA nuclear (DNAn) (Rand, 2001, Avise, 2009, Hickerson *et al.*, 2010) e maior sensibilidade à deriva genética devido à herança matrilinear (Birky *et al.*, 1989; Moritz, 1994). Essas e outras características tornam os

marcadores moleculares do DNAm mais informativos para o acesso da estrutura genética populacional e inferências demográficas históricas (Heist, 2005, Avise, 2009). De forma mais específica, a Região Controle do DNAm (RC) é o marcador molecular mais amplamente utilizado em estudos populacionais de elasmobrânquios por ser considerada a região mais variável e com maior taxa de evolução do DNAm. Outra região do DNAm, o gene citocromo c oxidase subunidade I (COI), conhecido como sendo o “código de barras do DNA”, tem sido amplamente utilizado para avaliar variações genéticas em elasmobrânquios (Dudgeon *et al.*, 2012; Domingues *et al.*, 2018).

No entanto, apesar da utilidade dos dados genéticos para medidas de conservação, métricas de diversidade genética e estruturação genética populacional existem apenas para 10% das 1041 espécies de tubarões e raias atualmente listadas pela IUCN, sendo que 25% encontram-se em alguma categoria de ameaça (Domingues *et al.*, 2018). Além disso, muitos dos dados genéticos existentes continuam sendo ignorados para diversas espécies marinhas, inclusive espécies altamente exploradas de tubarões e raias (Kenchington, 2003; Laikre, 2010; Ovenden, 2013; Domingues *et al.*, 2018). Desta forma, ações de conservação baseiam-se majoritariamente somente em estudos de biologia básica e ecologia populacional (Simpfendorfer *et al.*, 2011; Domingues *et al.*, 2018).

### *1.5. Estudos genético-populacionais e filogeográficos em elasmobrânquios*

A avaliação precisa e constante de dados genéticos de uma espécie é essencial para a criação de diretrizes efetivas de conservação, no entanto, para muitos tubarões, a elaboração é restringida devido a dados limitados ou não confiáveis. A identificação de padrões de estrutura populacional e o comportamento filogeográfico das espécies são informações importantes principalmente pois, cada região de distribuição de uma espécie é pertencente a um país/estado diferente e, conseqüentemente, são expostos a diferentes pressões pesqueiras e políticas públicas de conservação.

A estrutura genética de populações pode ser definida como a mudança nas frequências alélicas causadas principalmente pelas mutações, seleção natural, deriva genética e fluxo gênico, enquanto a filogeografia visa entender os padrões e processos históricos responsáveis pelo atual padrão de distribuição de espécies e populações (Avice, 2000; Allendorf, 2009). De acordo com Frankham *et al.* (2008), o comportamento populacional está altamente relacionado a parâmetros demográficos e biológicos da espécie e aspectos ecológicos da área de distribuição, como por exemplo a redução na densidade populacional devido a frequentes gargalos populacionais, aspectos comportamentais da espécie (hábitos migratórios, dispersão baseada em sexo, áreas de berçário) e a presença de barreiras biogeográficas (ilhas oceânicas, correntes marinhas, gradientes de salinidade/temperatura). Esses fenômenos podem ocasionar o isolamento de um grupo de indivíduos, com o possível surgimento de “populações locais”, que apresentam características distintas da “população original” (Hellberg, 2009).

Com relação aos estudos genéticos de elasmobrânquios, os marcadores moleculares do DNAmT impulsionaram principalmente estudos filogeográficos e genético-populacionais através de embasamentos de processos históricos e contemporâneos (Dudgeon *et al.*, 2012; Domingues *et al.*, 2018). No entanto, muitos desses estudos se direcionam apenas a espécies oceânico-pelágicas de distribuição global, enquanto poucos estudos vêm sendo realizados com espécies bentônicas e de distribuição restrita, e. g. *Mustelus schmitti* (Pereyra *et al.*, 2010); *Rhizoprionodon porosus* (Mendonça *et al.*, 2011); *Squatina californica* (Ramírez-Amaro *et al.*, 2017).

De forma mais específica, estudos genético populacionais e filogeográficos de elasmobrânquios no Atlântico Sudoeste são ainda mais restritos, apesar dessa região abrigar diversas espécies endêmicas de tubarões e raias com algum grau de ameaça de extinção a nível global, como “Críticamente em Perigo” (CR), no caso de *Pseudobatos horkelii*, *Mustelus fasciatus* e *Squatina occulta*, e “Em Perigo” (EN) como no caso de *Atlantoraja castelnaui* e

*Rhinoptera brasiliensis*. As regiões costeiras do Atlântico Sudoeste são fortemente afetadas por diferentes massas de água, compondo uma alta complexidade oceanográfica para a região (Acha *et al.*, 2004). Além disso, essa região sofreu intensos eventos de regressão marinha durante o Pleistoceno, que expuseram até 92% da plataforma continental habitável e, como consequência, originou modificações drásticas nos sistemas de rios e lagos costeiros e padrões extremos de circulações termohalinas (Elderfield *et al.*, 2012; García, 2012; Ludt & Rocha, 2015), com efeitos marcantes na história demográfica de muitas espécies costeiras e estuarinas (Beheregary *et al.*, 2002; García, Vergara & Gutiérrez, 2008; Silva *et al.*, 2016). Nesse sentido, o entendimento da dinâmica genética populacional e a relação com características biogeográficas é imperativo para a elaboração de efetivos planos de manejo e conservação de espécies presentes nessa região, que é fortemente ameaçada pela sobrepesca (Lucifora *et al.*, 2012).

Com relação ao cação-anjo *S. guggenheim*, o único trabalho genético-populacional existente na literatura revelou baixos níveis de diversidade genética e a presença de um grupo isolado referente a região amostral mais distante da costa (*outer shelf*) (García *et al.*, 2014). Presume-se que o estudo não identificou a presença de estruturação populacional latitudinal em *S. guggenheim* devido a amostragem geográfica restrita da espécie e o uso marcadores moleculares menos informativos em nível populacional: Citocromo B (CytB) e o *internal transcribed spacer 2 (its-2)*, apresentando resultados que podem não refletir a dinâmica populacional da espécie.

## **2. Objetivos**

Tendo em vista o atual status de conservação de *Squatina guggenheim* e a ausência de informações genético-populacionais completas, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de dados a respeito da estrutura genética populacional em grande parte de sua

distribuição geográfica Atlântico Sudoeste, de forma a obter suporte à conservação desta espécie ameaçada de extinção.

### 2.1 *Objetivos específicos*

- Quantificar os níveis de diversidade genética de *S. guggenheim* no Atlântico Sudoeste, utilizando a Região Controle do DNAm (RC) e do Citocromo *c* oxidase subunidade I (COI);
- Quantificar os níveis de diversidade genética de *S. guggenheim* no Atlântico Sudoeste, utilizando os mesmos marcadores moleculares implementados por García *et al.* (2014) – Citocromo B (CytB) e *internal transcribed spacer 2 (its-2)* para viés comparativo;
- Testar a hipótese nula da panmixia para *S. guggenheim* ao longo de sua distribuição geográfica no Atlântico Sudoeste, utilizando marcadores moleculares (RC, CytB, COI e *its-2*);
- Verificar a influência das barreiras biogeográficas do Atlântico Sudoeste na população através de análises filogeográficas;
- Reconstruir a demografia histórica de *S. guggenheim* e descrever os possíveis processos históricos que modularam tais padrões genéticos;

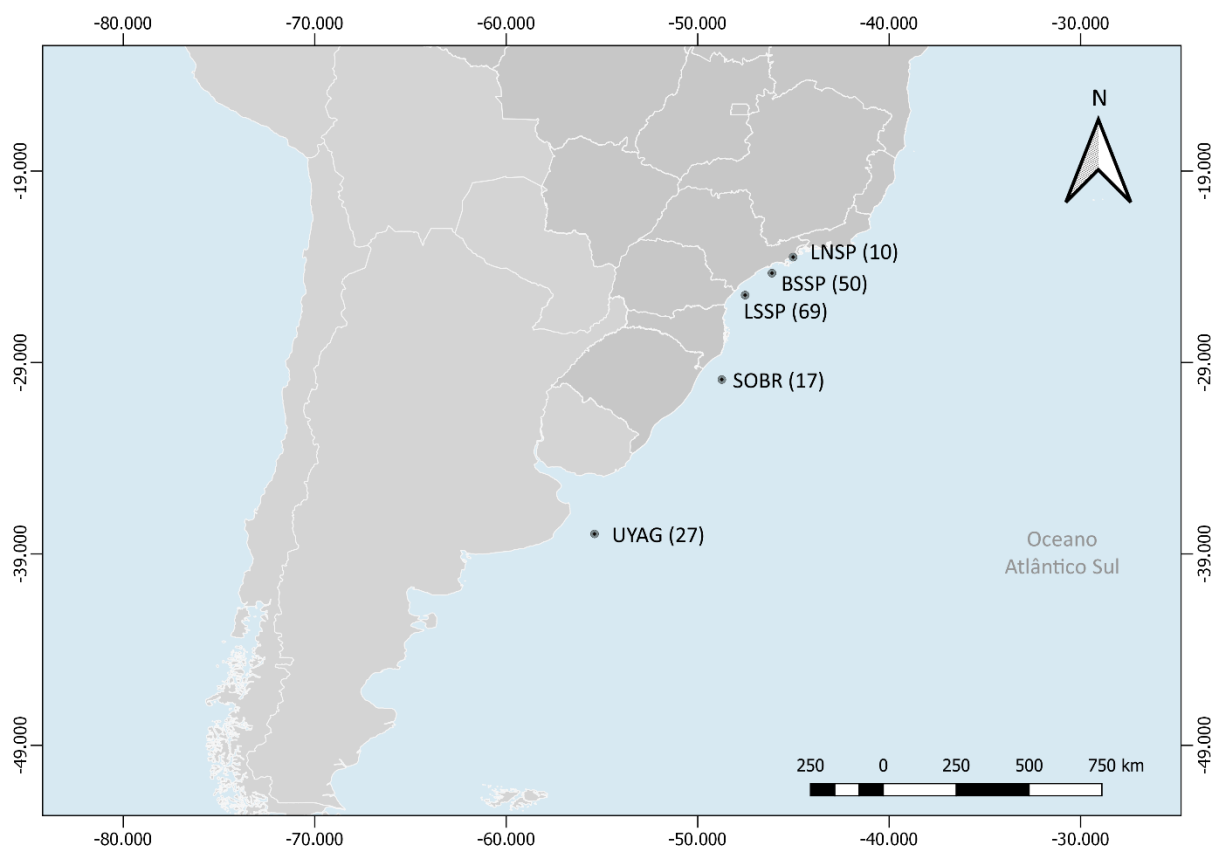
## 3. **Materiais e Métodos**

### 3.1 *Locais de Coleta e Amostragem*

Amostras de tecido muscular e nadadeiras dos exemplares de *Squatina guggenheim* foram coletadas em diferentes regiões da costa de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina, abrangendo grande parte da região de distribuição geográfica da espécie. O processo de amostragem foi desenvolvido em

colaboração científica entre pesquisadores do Acervo Zoológico da Universidade Santa Cecília (AZUSC - UNISANTA) de Santos - SP, do Instituto de Pesca (IP) do Estado de São Paulo e do Laboratório de Biologia de Teleósteos e Elasmobrânquios (LABITEL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. A colaboração internacional ocorreu por meio da *Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina*.

No total, foram obtidas 173 amostras de tecido (barbatana ou muscular), sendo 129 capturadas no Sudeste do Brasil (Litoral do Estado de São Paulo), 17 do Sul do Brasil (Litoral do Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e 27 provenientes do Uruguai (Punta del Este) e Argentina (Buenos Aires) (Figura 4), obtidas no desembarque de pescas de arrasto e espinhel de fundo. Todas as amostras foram preservadas em álcool etílico a 95% em temperatura de -20°C, armazenadas e registradas na coleção do Laboratório de Genética Pesqueira e Conservação (GenPesC) do Instituto do Mar (IMar) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).



**Figura 4** - Mapa da amostragem do cação-anjo *Squatina guggenheim* coletadas para este estudo. LNSP: Litoral Norte – SP (-23.697 S; -44.809 W); BSSP: Baixada Santista (-24.371 S; -46.606 W); LSSP: Litoral Sul – SP (-25.058 S; -47.653 W); SOBR: Sul do Brasil (-29.12 S; - 47.828 W); UYAG: Uruguai-Argentina (-36.826 S; -55.195 W).

### 3.2 Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA genômico total dos espécimes amostrados foi extraído através do kit DNAQIAmp Tissue (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). A quantificação e verificação da qualidade do DNA extraído foi efetuada em espectrofotômetro. O processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado para selecionar e amplificar exclusivamente as sequências nucleotídicas do DNAMt (RC, CytB e COI) e do DNAn (*its-2*). O acesso aos fragmentos foi feito por meio de iniciadores previamente desenvolvidos para cada marcador molecular (Tabela 1).

Inicialmente, a amplificação foi realizada seguindo os protocolos do kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) com: 2,0µL 10X PCR Buffer, 0,5µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µL dNTP mix (2mM), 0,4µL Primer mix (10mM), 0,1µL Platinum® Taq DNA Polymerase, 0,1µL DNA e completar o volume até 20µL ddH<sub>2</sub>O autoclavada. O protocolo utilizado no termociclador seguem as seguintes condições: 1º: 94°C por 2 minutos para a desnaturação da dupla fita de DNA, 2º: 35 ciclos de 94°C por 60 segundos de desnaturação, 50°C - 63°C (específica para cada par de iniciadores – Tabela 1) por 45 segundos de anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos de extensão com uma extensão final de 10 minutos. Após o término da reação de PCR as reações foram armazenadas a uma temperatura de -20°C. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, com o uso do corante para ácidos nucleicos Blue Green Loading Dye I (LCG Biotecnologia), visualizados sob luz ultravioleta.

**Tabela 1** - Informações sobre os pares de iniciadores utilizados em *Squatina guggenheim* para cada gene e suas referências. (D-LOOP refere-se: RC)

Primer	Gene Alvo	Sequência 5' - 3'	Temperatura de Anelamento	Referência
DL-F-T	<b>D-LOOP F</b>	CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG	50°C	Mendonça et al., 2009
12S rRNA-R	<b>D-LOOP R</b>	AAG GCT AGG ACC AAA CCT	50°C	Keeney et al., 2003
GLUDG-L	<b>CytB F</b>	TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG	50°C	Palumbi et al., 1991
CB3H-R	<b>CytB R</b>	GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC	50°C	Palumbi et al., 1991
Fish-F1	<b>COI F</b>	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	55°C	Ward et al., 2005
Fish-R1	<b>COI R</b>	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	55°C	Ward et al., 2005
FISH5.8SF	<b>ITS-2 F</b>	TTA GCG GTG GAT CAC TCG GCT CGT	63°C	Pank et al., 2001
FISH28SR	<b>ITS-2 R</b>	TCC TCC GCT TAG TAA TAT GCT TAA ATT CAG C	63°C	Pank et al., 2001

Os produtos de PCR foram primeiramente purificados em uma reação que utiliza duas enzimas em conjunto, uma exonuclease e uma fosfatase alcalina, seguindo o protocolo de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems™). Após a purificação, os produtos de PCR foram submetidos a reação de sequenciamento, em termociclador, seguindo os protocolos do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™). As

sequências de DNA foram geradas na plataforma de sequenciamento automático ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da UNESP.

### 3.3 *Processamento dos dados genéticos*

Os eletroferogramas das sequências de DNA advindas dos 4 marcadores moleculares foram visualizados com auxílio do software Geneious 4.8.5 (Kearse *et al.*, 2012), o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento. A identidade das sequências foi confirmada utilizando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) na plataforma de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo MUSCLE 3.8.425 (Edgar, 2004) implementado no software Geneious 4.8.5, tal qual foi verificado e finalizado manualmente (sítio a sítio). De forma complementar, as sequências dos genes mitocondriais (RC, CytB e COI) foram concatenadas (RC-COI e RC-CytB-COI) para posteriores análises, utilizando o software SequenceMatrix 1.8 (Vaidya, Lohman & Meier, 2011). A abordagem de concatenação dos genes foi usada devido às vantagens estatísticas previamente descritas (Gadagkar, Rosenberg & Kumar, 2005). No entanto, apenas 122 espécimes foram concatenados devido à problemas de amplificação de todos os marcadores moleculares em algumas amostras.

Com o intuito de complementar a amostragem geográfica, a ideia inicial da presente dissertação era utilizar as sequências dos genes CytB e *its-2* disponíveis no GenBank do trabalho desenvolvido por García *et al.* (2014) para a espécie *S. guggenheim*. No entanto, após o alinhamento das sequências de forma conjunta, foram observadas discrepâncias significativas entre as matrizes do presente trabalho e do trabalho de García *et al.* (2014), refletindo no

número de haplótipos encontrados. Devido a isso, as sequências não foram incorporadas nesse trabalho.

### *3.4 Estimativas de Diversidade Genética e Estruturação Populacional*

Para as análises estimativas de diversidade genética foram calculadas a composição nucleotídica (% A-T-G-C), o número de sítios polimórficos (S) e de haplótipos (H) e as diversidades haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) pelo software DnaSP 6.11.01 (Rozas *et al.*, 2017).

O teste da hipótese nula de panmixia e a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos foram realizados através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), tal qual foi testada para diferentes cenários de estruturação, utilizando o programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), que utiliza a estatística F de Wright (1951; 1965) com 50.000 permutações e  $\alpha = 0,05$ . Para evitar erros estatísticos, as probabilidades estimadas nas análises foram corrigidas pelo método de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) no software Bonferroni Calculator (Lesack & Naugler, 2011). De forma complementar, o algoritmo de diferença máxima de Monmonier (Manni, Guerard & Heyer, 2004) foi utilizado para identificar possíveis descontinuidades genéticas espaciais, através do software BARRIER 2.2 (Manni *et al.*, 2004). As coordenadas geográficas foram usadas para cada região amostral (LNSP, BSSP, LSSP, SOBR e UYAG) e conectadas pela triangulação de Delauney com a matriz de distância genética obtida pelo  $F_{ST}$  por pares, previamente gerada no programa Arlequin 3.5.2.2.

Adicionalmente, um método para avaliação da estrutura genética espacial através de um modelo bayesiano foi empregado para estimar o número de clusters (K) e seus limites espaciais pelo pacote GENELAND 4.9.2 (Guillot *et al.*, 2005; Guillot & Santos, 2008) no software R v3.6.3 (R Development Core Team, 2020). A abordagem bayesiana foi realizada sob o modelo espacial com um modelo de frequência não correlacionado ao longo de dez

simulações *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) independentes, variando K entre 1 e 10 em 10.000.000 iterações MCMC. O K com maior suporte estatístico foi determinado com base no maior valor médio de probabilidade logarítmica posterior dos modelos.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi utilizado para verificar se a diferenciação genética entre as regiões amostradas é reflexo de isolamento por distância (IBD), implementado pelo Arlequin 3.5.2.2 com 50.000 permutações. Essa análise avalia a correlação entre a distância genética e uma matriz de distância geográfica, que foi calculada pelo software Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3 (Ersts, 2011). A relação entre os haplótipos obtidos e suas distribuições geográficas foi gerada pelo software PopART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizando o algoritmo *Median-Joining Network* (Bandelt *et al.*, 1999). Todas as análises previamente descritas foram realizadas para os marcadores moleculares individuais e concatenados.

### 3.5 Relações filogenéticas e estimativas demográficas

Para inferir estimativas demográficas de *S. guggenheim*, foram primeiramente analisadas as relações filogenéticas entre os haplótipos utilizando-se a Inferência Filogenética Bayesiana. O melhor modelo de substituição de nucleotídica para a matriz concatenada foi avaliado pelo software jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012), respeitando as partições existentes entre os genes de taxas evolutivas diferentes. Devido à falta de uma taxa de mutação relatada para o grupo em estudo, a estimativa de tempo molecular foi obtida pelo tempo de divergência entre espécies congênicas, o grupo externo (*Squatina occulta*) e o grupo em análise (*S. guggenheim*), derivadas do *Timetree: the timetree of life* (TTOL) (Hedges *et al.*, 2006 - <http://www.timetree.org/>). Nesse sentido, exclusivamente para essas análises, somente a matriz concatenada RC-COI foi utilizada, pois são os únicos marcadores moleculares com sequências disponíveis da espécie congênica *S. occulta*.

Dessa forma, para se estimar o tempo de divergência entre as linhagens, foi construída uma árvore utilizando o programa BEAST 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) sob o modelo de substituição nucleotídica HKY para a partição referente ao gene COI e TrN+I para a partição referente a RC. Segundo Drummond & Bouckaert (2015), um modelo “*Strict-Clock*” é geralmente preferido em relação ao modelo “*Relaxed-Clock*” para avaliar a filogeografia intraespecífica. No entanto, devido ao uso da estimativa de tempo molecular advinda de espécies diferentes, o modelo “*Relaxed-Clock*” e uma árvore de especiação “*Yule Proces*” (Gernhard, 2008) também foram testados. Todas as análises foram efetuadas usando a classe de algoritmos MCMC executado por 500 milhões de gerações com 10% de *burn-in*. O software Tracer v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018) foi utilizado para verificar a convergência dos valores (tamanho efetivo da amostra (ESS) > 200). O software TreeAnnotator 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) resume as informações de uma amostra de árvores produzidas pelo BEAST 1.8.4 em uma única árvore de maior credibilidade, que foi visualizada no software FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2008). Após a obtenção do tempo de divergência ( $T$ ) entre as linhagens, foi possível calcular a taxa de mutação ( $\mu$ ), através da fórmula  $T = dxy / 2\mu$  (Nei, 1987), onde  $dxy$  é a divergência genética entre as linhagens, calculado pelo software MEGA7 utilizando 1000 *bootstraps* (Kumar *et al.*, 2016).

A partir da definição das linhagens, foi possível realizar análises de abordagem demográfica que estimam o status populacional da espécie. Inicialmente, a detecção do crescimento populacional foi baseada no teste de neutralidade  $R_2$  (Ramos-Onsis & Rozas, 2002) com significância estatística testada de 50.000 simulações no processo coalescente implementado no DnaSP 6.11.01 (Rozas *et al.*, 2017) e o teste de neutralidade  $F_s$  (Fu, 1997), implementado também com 50.000 permutações no Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Neste contexto, os valores de  $R_2$  e  $F_s$  estatisticamente significativos e diferentes de zero indicam desvios da neutralidade, podendo indicar a ocorrência de eventos demográficos.

De forma a visualizar os efeitos demográficos em nível temporal, foi utilizado a construção da análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (Drummond *et al.*, 2005) para inferir a flutuação dos tamanhos efetivos de população ao longo do tempo usando o software BEAST 1.8.4. Este modelo gera uma probabilidade posterior para o tamanho efetivo da população usando o método MCMC executado por 100 milhões de gerações com 10% de *burn-in*. A seleção estatística dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos foi realizada por jModelTest 2.1.10. O “*Strict-Clock*” e uma árvore de horizonte bayesiano constante foram definidos e calibrados também utilizando os dados do TTOL. A reconstrução da BSP, a convergência do modelo e o ESS foram calculados no Tracer 1.7.

## 4. Resultados

### 4.1 Dados gerais

Os dados genéticos obtidos para a espécie *Squatina guggenheim* são oriundos de 3 marcadores moleculares mitocondriais (RC, CytB e COI) e 1 marcador molecular nuclear (*its-2*). Considerando o alinhamento individual de cada marcador molecular, foram obtidos 892 pares de base (pb) da RC de 158 indivíduos, 630 pb do gene COI de 159 indivíduos, 816 pb do gene CytB de 153 indivíduos e 746 pb do gene *its-2* de 165 indivíduos. A discrepância na quantidade de indivíduos sequenciados de cada marcador ocorreu devido à problemas de amplificação de determinados marcadores em algumas amostras. Assim, o concatenamento dos marcadores moleculares mitocondriais foi realizado com 122 indivíduos com sequencias de alta confiabilidade para todos os marcadores do DNAm. O alinhamento dos marcadores concatenados resultou na matriz RC-COI, com 1522 pb e na matriz RC-CytB-COI com 2338 pb. Em geral, a matriz concatenada de todos os marcadores do DNAm (RC-CytB-COI), apresentou composição nucleotídica de 28,3% de Adenina, 23,4% de Citosina, 13,1% de Guanina e 35,1% de Timina, mantendo o padrão da matriz de alinhamento rica em A-T,

conforme observado para os genes mitocondriais individuais. Já para o marcador nuclear *its-2*, a composição nucleotídica foi de 13,7% de Adenina, 27,4% de Citosina, 33,1% de Guanina e 25,9% de Timina.

#### 4.2 Variabilidade Genética e Estruturação Populacional

As análises de variabilidade genética e estrutura populacional da espécie *S. guggenheim* foram realizadas com base no alinhamento dos marcadores moleculares, e posteriormente, utilizando as matrizes concatenadas. A matriz concatenada RC-CytB-COI apresentou um total de 48 haplótipos, enquanto as matrizes RC-COI, RC, CytB e COI revelaram 42, 24, 13 e 11 haplótipos, respectivamente. Em geral, segundo a interpretação de índices de diversidade para peixes marinhos, proposta por Grant & Bowen, 1998, as matrizes concatenadas (RC-CytB-COI e RC-COI) enquadram-se na segunda categoria, que consiste em populações com alta diversidade haplotípica ( $h > 0.5$ ) ( $h_{RC-CytB-COI} = 0.838 \pm 0.033$ ;  $h_{RC-COI} = 0.830 \pm 0.034$ ) e baixa diversidade nucleotídica ( $\pi < 0.005$ ) ( $\pi_{RC-CytB-COI} = 0.00170 \pm 0.000948$ ;  $\pi_{RC-COI} = 0.00209 \pm 0.001205$ ) (Tabela 2). De forma individual, a matriz molecular referente à RC apresentou os maiores índices diversidade haplotípica e nucleotídica ( $h_{RC} = 0.748 \pm 0.034$ ;  $\pi_{RC} = 0.0022 \pm 0.0012$ ), enquanto o CytB apresentou os menores índices entre os marcadores moleculares mitocondriais ( $h_{CytB} = 0.589 \pm 0.024$ ;  $\pi_{CytB} = 0.0009 \pm 0.0026$ ). No marcador nuclear *its-2*, apenas 8 haplótipos foram identificados e observou-se baixos índices de diversidade genética (Tabela 2). Considerando todas as matrizes de dados genéticos (individuais e concatenadas), foi possível observar que as regiões ao sul do Atlântico Sudoeste (Sul do Brasil e Uruguai-Argentina) apresentam os maiores índices de diversidade genética (Tabela 2).

**Tabela 2** - Estatísticas populacionais da espécie *Squatina guggenheim* para cada dataset molecular. Número de indivíduos (*n*); número de haplótipos (*H*); número de sítios polimórficos (*S*); diversidade haplotípica (*h*); diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

<i>Locus</i>	Regiões amostrais					
	LNSP	BSSP	LSSP	SOBR	UYAG	Total
<b>RC</b>						
<i>n</i>	8	41	69	16	24	158
<i>H</i>	5	6	5	11	12	24
<i>S</i>	4	4	4	11	10	13
<i>h</i>	0.786 ± 0.151	0.704 ± 0.050	0.496 ± 0.068	0.933 ± 0.048	0.902 ± 0.036	0.748 ± 0.034
$\pi$	0.0018 ± 0.0013	0.0021 ± 0.0014	0.0014 ± 0.0010	0.0033 ± 0.0020	0.0022 ± 0.0143	0.0022 ± 0.0012
<b>CytB</b>						
<i>n</i>	9	45	55	17	27	153
<i>H</i>	2	2	3	6	9	13
<i>S</i>	1	1	2	6	8	12
<i>h</i>	0.500 ± 0.128	0.505 ± 0.023	0.258 ± 0.071	0.721 ± 0.087	0.607 ± 0.109	0.589 ± 0.024
$\pi$	0.0006 ± 0.0006	0.0006 ± 0.0006	0.0003 ± 0.0004	0.0014 ± 0.0011	0.0750 ± 0.060	0.0009 ± 0.0026
<b>COI</b>						
<i>n</i>	10	50	58	16	25	159
<i>H</i>	3	4	4	6	8	11
<i>S</i>	2	3	3	6	8	11
<i>h</i>	0.378 ± 0.181	0.597 ± 0.039	0.361 ± 0.076	0.767 ± 0.084	0.780 ± 0.058	0.646 ± 0.031
$\pi$	0.0009 ± 0.0011	0.0018 ± 0.0011	0.0009 ± 0.0010	0.0023 ± 0.0029	0.0018 ± 0.0033	0.0018 ± 0.0031
<b>RC-COI</b>						
<i>n</i>	7	37	41	16	21	122
<i>H</i>	5	10	10	13	15	42
<i>S</i>	5	7	7	17	16	23
<i>h</i>	0.857 ± 0.137	0.818 ± 0.048	0.501 ± 0.096	0.967 ± 0.036	0.957 ± 0.028	0.830 ± 0.034
$\pi$	0.0013 ± 0.0013	0.0012 ± 0.0008	0.0011 ± 0.0011	0.0029 ± 0.0034	0.0020 ± 0.0029	0.0021 ± 0.0012
<b>RC-CytB-COI</b>						
<i>n</i>	7	37	41	16	21	122
<i>H</i>	6	10	11	13	17	48
<i>S</i>	6	8	9	23	23	34
<i>h</i>	0.952 ± 0.096	0.818 ± 0.048	0.502 ± 0.096	0.967 ± 0.036	0.976 ± 0.023	0.838 ± 0.033
$\pi$	0.0011 ± 0.0010	0.0015 ± 0.0008	0.0008 ± 0.0009	0.0024 ± 0.0030	0.0017 ± 0.0027	0.0017 ± 0.0009
<b>its-2</b>						
<i>n</i>	9	48	65	16	27	165
<i>H</i>	1	4	4	2	6	8
<i>S</i>	0	3	4	1	8	9
<i>h</i>	0	0.123 ± 0.064	0.145 ± 0.058	0.125 ± 0.106	0.342 ± 0.117	0.162 ± 0.039
$\pi$	0	0.0002 ± 0.0003	0.0003 ± 0.0004	0.0002 ± 0.0003	0.0658 ± 0.0606	0.0018 ± 0.0031

A variação genética entre as populações, avaliadas em cenários previamente definidos, foi mensurada por meio do índice  $\Phi_{ST}$ , que demonstrou a presença de alta estruturação genética nos genes mitocondriais individuais (RC; CytB e COI) e com os genes concatenados (RC-COI) e RC-CytB-COI (Tabela 3), sendo a maior estruturação encontrada no marcador molecular CytB ( $\Phi_{ST}= 0.4091$ ) e a menor na RC do DNAm ( $\Phi_{ST}= 0.2338$ ). A região gênica nuclear *its-2* apresentou ausência de estruturação populacional em todos os cenários (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise AMOVA para cenários populacionais hipotéticos de *Squatina guggenheim*.  $\phi_{ST}$ , Índice F de Wright; P  $\phi_{ST}$ , p-valor do Índice F de Wright. Os valores em negrito são significativos (P<0.05) após correção Benjamini-Hochberg. LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina.

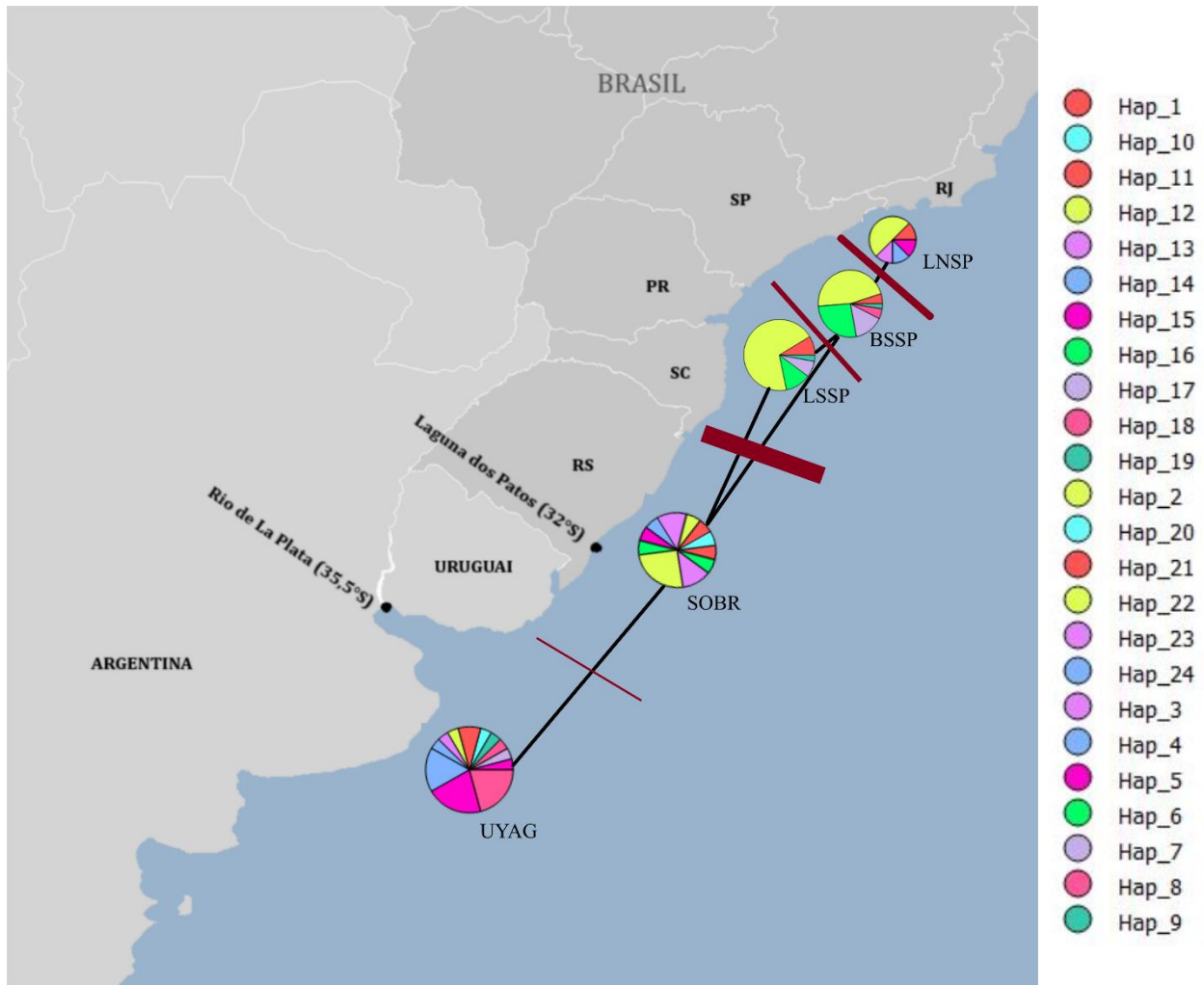
Cenários de Estruturação Populacional	RC		CytB		COI	
	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$
(LNSP+BSSP+LSSP+SOBR+UYAG)	0.1657	<b>0.001</b>	0.3197	<b>0.001</b>	0.2378	<b>0.001</b>
<b>(LNSP+BSSP+LSSP) X (SOBR+UYAG)</b>	0.2338	<b>0.001</b>	<b>0.4091</b>	<b>0.001</b>	0.3293	<b>0.001</b>
(LNSP+BSSP+LSSP) X (SOBR) X (UYAG)	0.2227	<b>0.001</b>	0.3898	<b>0.001</b>	0.3117	<b>0.001</b>
(LNSP+BSSP) X (LSSP) X (SOBR) X (UYAG)	0.1679	<b>0.001</b>	0.3298	<b>0.001</b>	0.2446	<b>0.001</b>
(LNSP) x (BSSP+LSSP) x (SOBR) x (UYAG)	0.2011	<b>0.001</b>	0.3535	<b>0.001</b>	0.2748	<b>0.001</b>
Cenários de Estruturação Populacional	<i>its-2</i>		(RC+COI)		(RC+CytB+COI)	
	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$	$\phi_{ST}$	P $\phi_{ST}$
(LNSP+BSSP+LSSP+SOBR+UYAG)	-0.0129	0.852	0.2071	<b>0.001</b>	0.2279	<b>0.001</b>
<b>(LNSP+BSSP+LSSP) X (SOBR+UYAG)</b>	-0.0080	0.854	0.2743	<b>0.001</b>	<b>0.2992</b>	<b>0.001</b>
(LNSP+BSSP+LSSP) X (SOBR) X (UYAG)	-0.0068	0.854	0.2573	<b>0.001</b>	0.2816	<b>0.001</b>
(LNSP+BSSP) X (LSSP) X (SOBR) X (UYAG)	-0.0109	0.858	0.2114	<b>0.001</b>	0.2334	<b>0.001</b>
(LNSP) x (BSSP+LSSP) x (SOBR) x (UYAG)	-0.0134	0.852	0.2355	<b>0.001</b>	0.2568	<b>0.001</b>

A partir dos resultados obtidos com a análise AMOVA para os marcadores do DNAm<sub>t</sub> e considerando as características biogeográficas previamente descritas do Atlântico Sudoeste, é possível observar a presença de, ao menos, duas populações distintas, sendo a população referente ao Sudeste do Brasil (SEBR), que engloba as regiões amostrais: LNSP, BSSP e LSSP, e a população referente ao Sul do Atlântico Sudoeste (SASO), que engloba as regiões amostrais: SOBR e UYAG. A comparação de valores de  $F_{ST}$  por pares foi efetuada apenas nas matrizes mitocondriais (RC; COI; CytB; RC-COI e RC-CytB-COI) devido à ausência de estruturação para o marcador nuclear (*its-2*). A análise confirmou a presença de divergência genética também entre as regiões amostrais (Tabela 4), caracterizando a possível existência de uma estruturação em fina escala.

Concordantemente, o algoritmo de diferença máxima de Monmonier aplicado aos dados genéticos do marcador molecular RC, demonstrou a existência de possíveis barreiras ao fluxo gênico entre todas as regiões, caracterizando a presença de estruturação em fina escala (Figura 5). No entanto, a barreira mais forte, indicada pela linha vermelha mais espessa, ocorre entre as duas grandes populações previamente identificadas SEBR e SASO, que separa as regiões do sudeste do Brasil e o sul do Atlântico Sudoeste. É importante também destacar a segunda barreira mais forte, que ocorre entre as regiões LNSP e BSSP, caracterizando a existência de estruturação dentro da população SEBR.

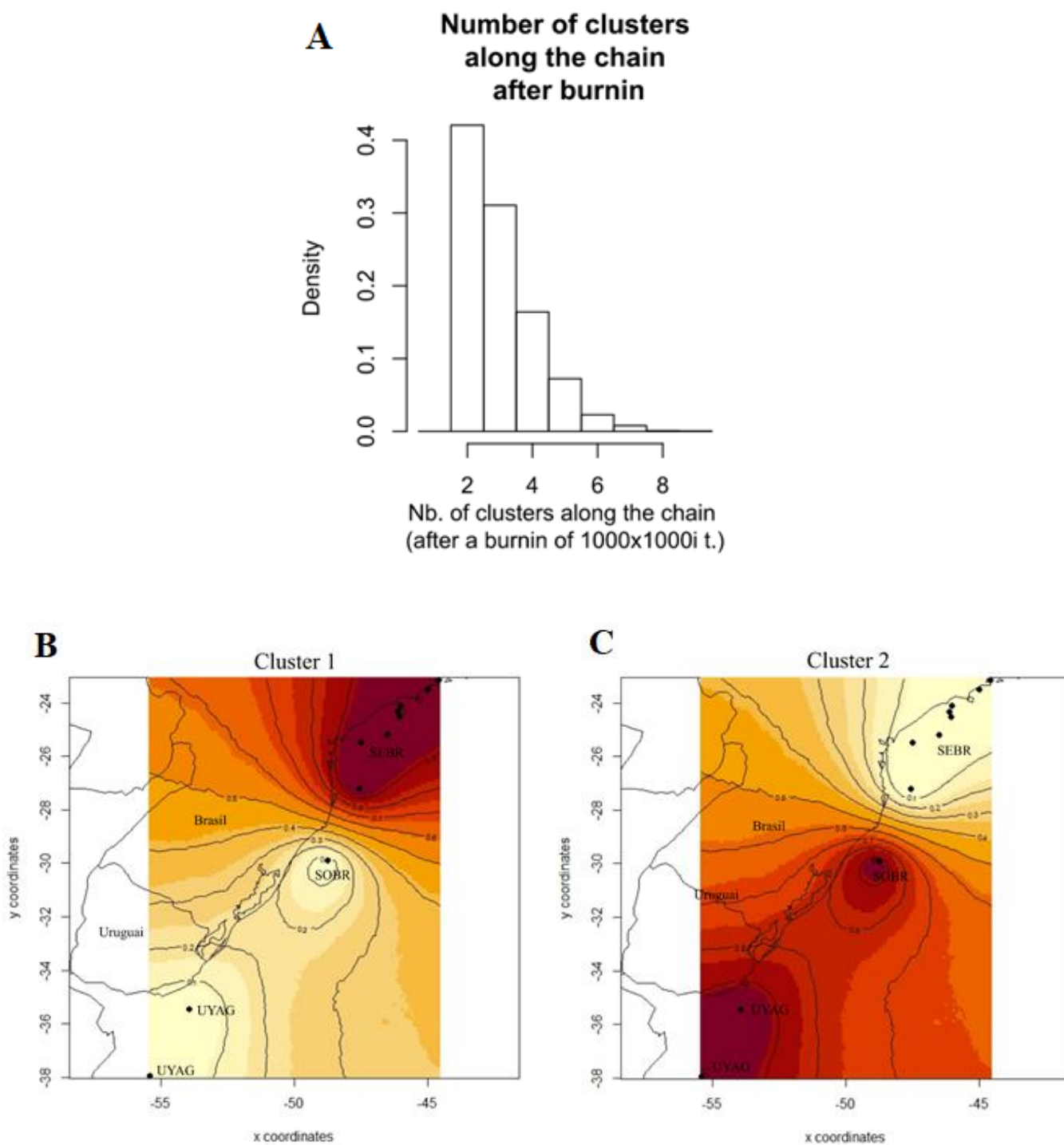
**Tabela 4** - Análise de comparação por pares  $\Phi_{ST}$  para cada matriz gênica (abaixo da diagonal) de *Squatina guggenheim* entre as regiões amostradas no Atlântico Sudoeste e os p-valores (acima). Os valores em negrito são significativos após correção Benjamini-Hochberg; os valores em itálico são significativos antes da correção e n.s. são os valores não significativos ( $P>0.05$ ); LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina

<b>RC</b>	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>	<b>COI</b>	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>
<b>LNSP</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.0152</b>	<b>LNSP</b>	-	n.s.	n.s.	<b>0.0229</b>	<b>0.002</b>
<b>BSSP</b>	0.0911	-	<b>0.0152</b>	<i>0.0455</i>	<b>0.005</b>	<b>BSSP</b>	0.0808	-	<b>0.002</b>	n.s.	<b>0.002</b>
<b>LSSP</b>	0.0353	0.0916	-	<b>0.0056</b>	<b>0.005</b>	<b>LSSP</b>	-0.0528	0.1597	-	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
<b>SOBR</b>	-0.0157	0.0870	0.1644	-	n.s.	<b>SOBR</b>	0.2225	0.0363	0.3498	-	n.s.
<b>UYAG</b>	0.1567	0.2221	0.3643	0.03622	-	<b>UYAG</b>	0.4142	0.2199	0.5091	0.0354	-
<b>CytB</b>	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>	<b>(RC-COI)</b>	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>
<b>LNSP</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.0022</b>	<b>LNSP</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.002</b>
<b>BSSP</b>	0.0303	-	<b>0.0022</b>	n.s.	<b>0.0022</b>	<b>BSSP</b>	0.1007	-	<b>0.004</b>	<b>0.0388</b>	<b>0.002</b>
<b>LSSP</b>	0.0457	0.2938	-	<b>0.0022</b>	<b>0.0022</b>	<b>LSSP</b>	0.0564	0.1419	-	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
<b>SOBR</b>	0.0873	0.0331	0.3999	-	<b>0.0409</b>	<b>SOBR</b>	0.0883	0.0795	0.2283	-	<i>0.0424</i>
<b>UYAG</b>	0.3493	0.2576	0.6097	0.0595	-	<b>UYAG</b>	0.3043	0.2438	0.4516	0.0441	-
<b>(RC-CytB-COI)</b>	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>						
<b>LNSP</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.002</b>						
<b>BSSP</b>	0.0922	-	<b>0.002</b>	<b>0.0477</b>	<b>0.002</b>						
<b>LSSP</b>	0.0497	0.1695	-	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>						
<b>SOBR</b>	0.0875	0.0710	0.2617	-	<b>0.0463</b>						
<b>UYAG</b>	0.3180	0.2475	0.4927	0.0476	-						



**Figura 5** - Possíveis barreiras ao fluxo gênico identificadas na população de *Squatina guggenheim*, por meio do software BARRIER 2.2. A espessura das linhas vermelhas indica barreiras mais e menos significativas. Os haplótipos distribuídos entre as regiões amostrais são referentes a Região Controle do DNAm<sub>t</sub> e foram obtidos pelo software PopART 1.7. LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina.

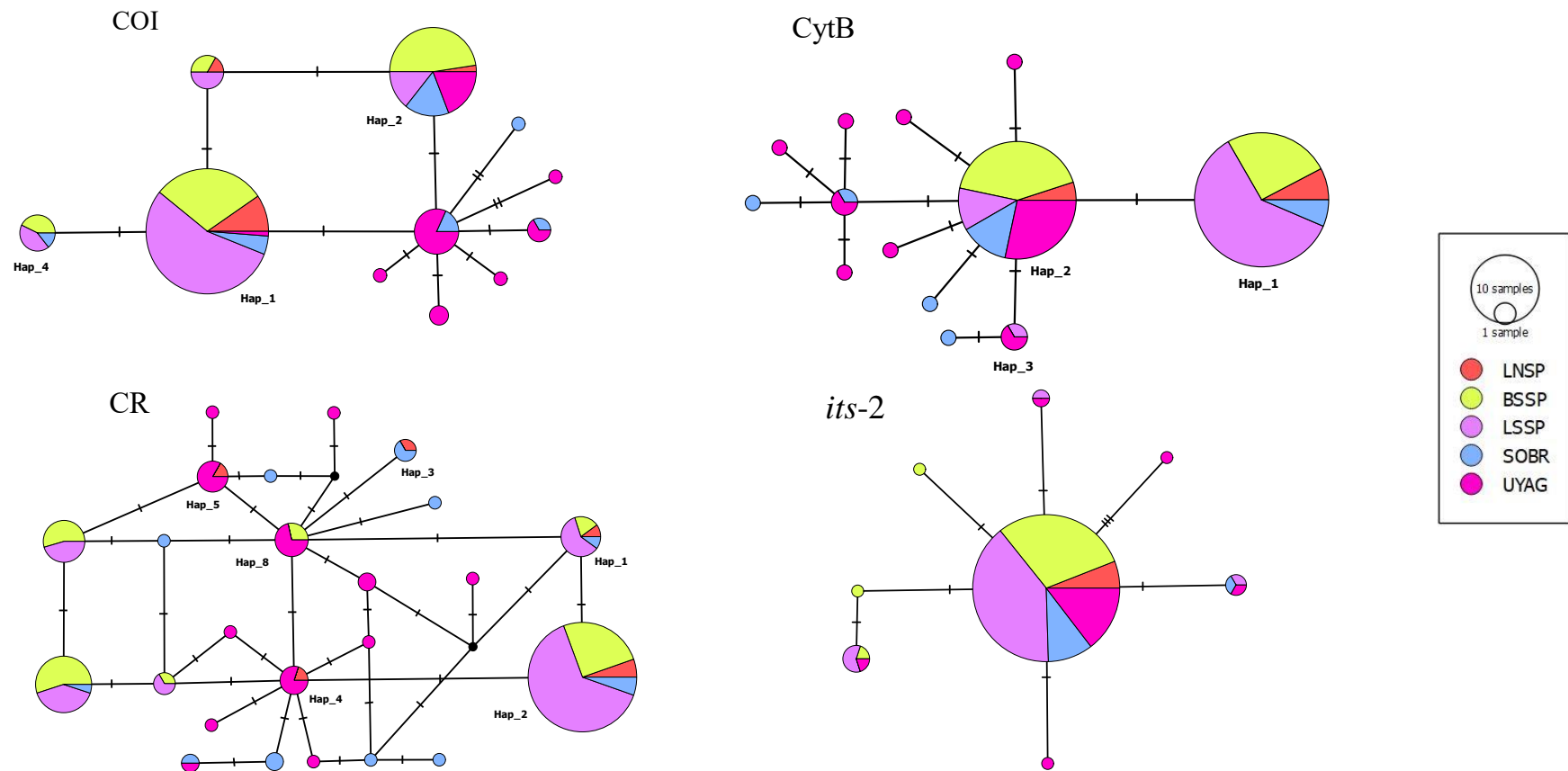
De forma complementar, a análise de estruturação genética espacial utilizando a matriz concatenada RC-CytB-COI sugeriu dois grupos geneticamente diferentes ( $K = 2$ ), que apresentou a maior probabilidade a posterior em todas as 10 corridas (41,69 - 43,03%) (Figura 6a), condizente com o observado previamente pela AMOVA, é possível constatar a presença de duas populações: SEBR (cluster 1) e SASO (cluster 2) (Figura 6b,c).



**Figura 6** - Análise de estruturação genética espacial bayesiana em *Squatina guggenheim* - output GENELAND; **A**. O histograma mostra a frequência do valor K inferido entre as corridas, evidenciando K = 2 como o número de clusters mais provável; **B**. Cluster 1 – SASO (regiões: SOBR e UYAG); **C**. Cluster 2 – SEBR (regiões: LNSP; BSSP e LSSP).

A presença de estruturação genética foi avaliada de forma a averiguar se essa divergência advém de Isolamento por Distância, por meio da relação entre distância genética e distância geográfica, mensurada utilizando o Teste de Mantel. No entanto, o teste não revelou significância estatística para a matriz dos marcadores do DNAm concatenados ( $R^2_{RC-CytB-COI} = 0.494$ ,  $p = 0.067$ ), constatando que a distância geográfica não é o fator dirigente da estruturação observada entre as regiões.

De forma geral, as redes de haplótipos *Median-Joining* referentes aos marcadores moleculares individuais, demonstram a existência de compartilhamento haplotípico entre todas as regiões (Figura 7). Apesar dos altos índices de estruturação genética encontrada nos marcadores do DNAm pela AMOVA, é possível observar o compartilhamento de haplótipos entre as regiões.

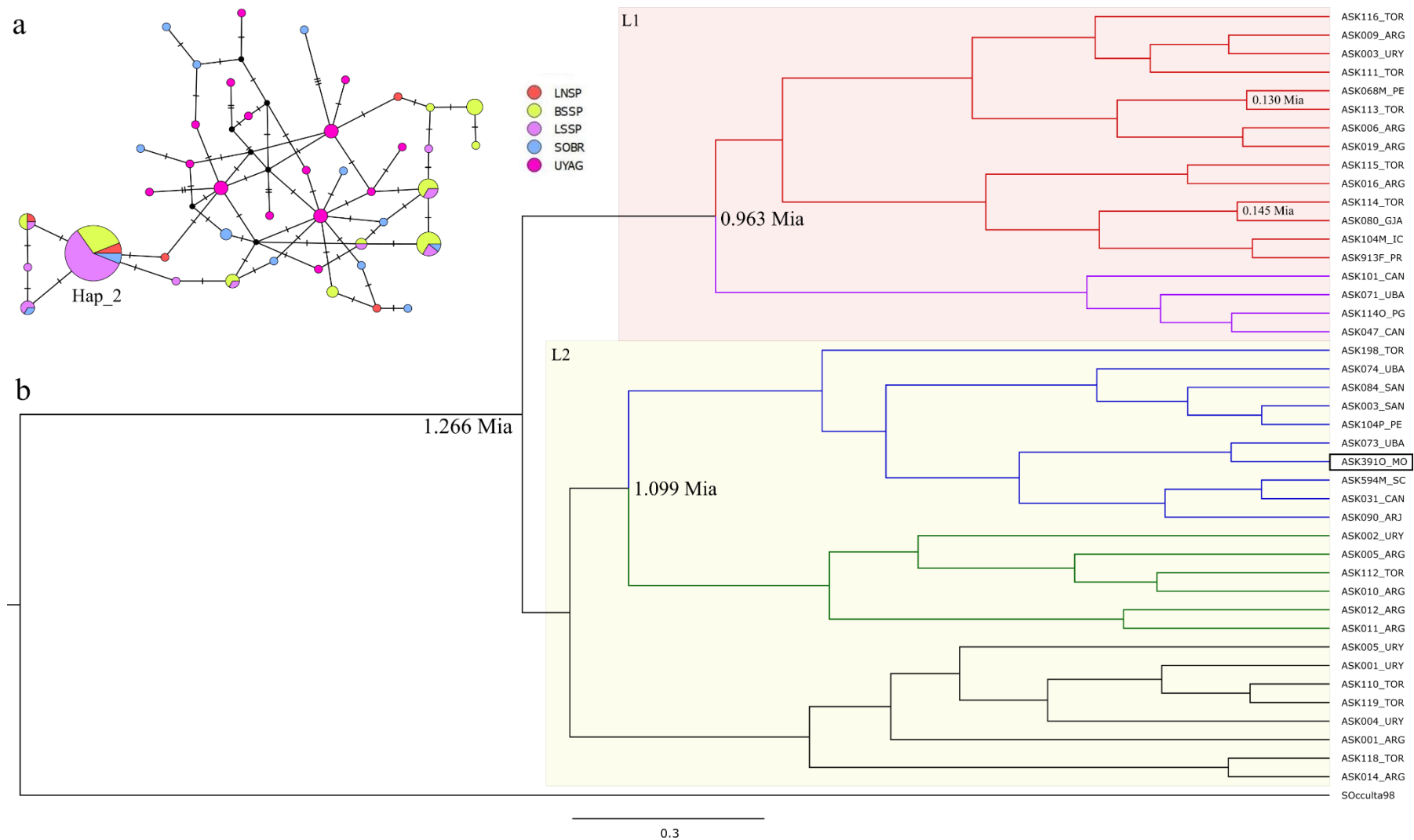


**Figura 7** - Rede de Haplótipos *Median-Joining* dos genes individuais de *Squatina guggenheim*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo; os segmentos representam um evento mutacional e os pontos negros, haplótipos hipotéticos não amostrados. LNSP: Litoral Norte (SP); BSSP: Baixada Santista (SP); LSSP: Litoral Sul (SP); SOBR: Sul do Brasil; UYAG: Uruguai-Argentina

### 4.3 Relações filogenéticas e história demográfica

A topologia que representa as relações filogenéticas entre os haplótipos da matriz gênica RC-COI foi encontrada utilizando a inferência filogenética bayesiana, que demonstrou a presença de duas linhagens matrilineares, aqui nomeadas como Linhagem 1 (L1) e Linhagem 2 (L2) (Figura 8b), que apresentam uma divisão similar entre o número de haplótipos, sendo de 19 e 25, respectivamente. No entanto, a L2 possui maior representatividade em número de indivíduos (Tabela 5). Ambas as linhagens são compostas de haplótipos referentes a indivíduos de todas as regiões amostras, caracterizando-as como linhagens simpátricas. O tempo de divergência entre as linhagens L1 e L2 foi estimado em aproximadamente 1,26 milhões de anos atrás (Mia) durante o Pleistoceno Inferior (~ 2,58 – 0,773 Mia).

Dessa forma, foi possível encontrar a taxa de mutação da RC ( $\mu$ ), que foi de 0,33 % Mia, enquanto a taxa de divergência genética ( $d_{xy}$ ) entre as linhagens foi de 1 %, demonstrando baixa distinção entre as linhagens. Considerando ambas as linhagens, os clados marcados com cor (Figura 8b) apresentam o tempo de divergência em, aproximadamente 1 Mia (1,099 – 0,963 Mia) e dão indícios de isolamento geográfico condizente com a estruturação populacional identificada nas análises anteriores. O haplótipo mais frequente foi o Hap\_2 ( $n = 49$ ), que encontra-se na linhagem L2 (representado pelo indivíduo demarcado na árvore – Figura 8b) e é composto, em sua maioria, por indivíduos das regiões amostradas do sudeste do Brasil (Figura 8a), contando apenas com 3 indivíduos advindos do sul do Brasil, mais especificamente da região amostral de Santa Catarina.

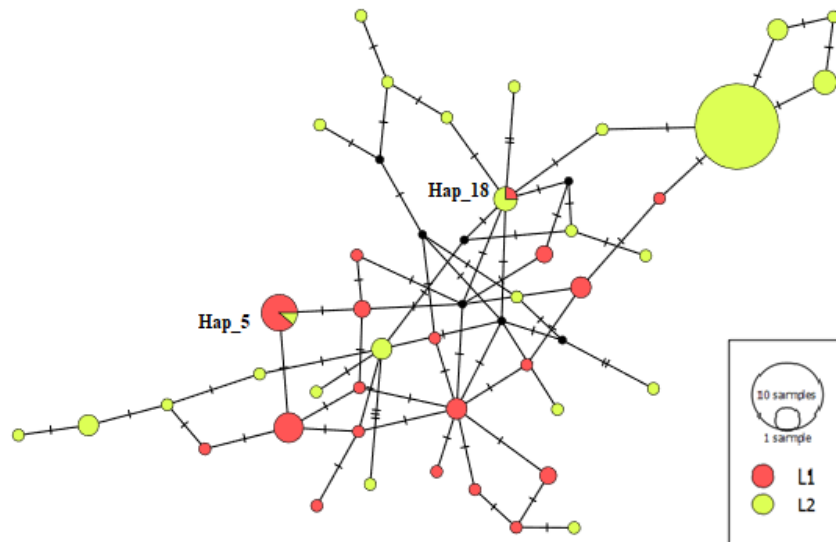


**Figura 8** - Inferência Filogenética obtida a partir de 1522 pb (RC-COI) de *Squatina guggenheim*. **(a)** Rede haplotípica *Median-joining* baseada na matriz RC-COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. Os segmentos representam um evento mutacional. **(b)** Inferência Filogenética Bayesiana com idade dos nós em anos obtidos a partir da matriz RC-COI. As cores indicam clados que apresentam isolamento geográfico. O táxon terminal circulado é o indivíduo representante do haplótipo mais frequente (Hap\_2). L1: linhagem 1, L2: linhagem 2. ARJ: Rio de Janeiro; ARG: Argentina; CAN: Cananéia; GJA: Guarujá; IC: Ilha Comprida; MO: Mongaguá; PE: Peruíbe; PR: Paraná; SAN: Santos; SC: Santa Catarina; TOR: Torres; UBA: Ubatuba; URY: Uruguai.

Com relação aos valores de diversidade genética nas linhagens, foi possível constatar que ambas as linhagens exibem alta diversidade haplotípica ( $h_{L1} = 0.926 \pm 0.026$ ;  $h_{L2} = 0.657 \pm 0.060$ ) e baixa diversidade nucleotídica ( $\pi_{L1} = 0.00161 \pm 0.00188$ ;  $\pi_{L2} = 0.00148 \pm 0.00289$ ), segundo a interpretação de índices de diversidade para peixes marinhos previamente apresentada (Grant & Bowen, 1998). No entanto, é possível observar que a L2, apesar de conter mais do que o dobro de indivíduos, apresenta menor diversidade genética em comparação a L1 (Tabela 5). A rede de haplótipos (Figura 9) demonstra a presença de compartilhamento de haplótipos entre as linhagens (Hap\_5 e Hap\_18), caracterizando a conectividade existente entre elas.

**Tabela 5** - Estatísticas populacionais de *Squatina guggenheim* utilizando somente a matriz molecular RC-COI. *n*, número de indivíduos; *S*, número de sítios polimórficos; *H*, número de haplótipos; *h*, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica. L1 = Linhagem 1 e L2 = Linhagem 2.

<i>Locus</i>	<i>Location</i>		
	<i>Overall</i>	<b>L1</b>	<b>L2</b>
<b>CR-COI</b>			
<i>n</i>	122	38	84
<i>H</i>	42	19	25
<i>S</i>	23	11	22
<i>h</i>	$0.830 \pm 0.034$	$0.926 \pm 0.026$	$0.657 \pm 0.060$
$\pi$	$0.0021 \pm 0.0012$	$0.0016 \pm 0.0019$	$0.00148 \pm 0.0029$

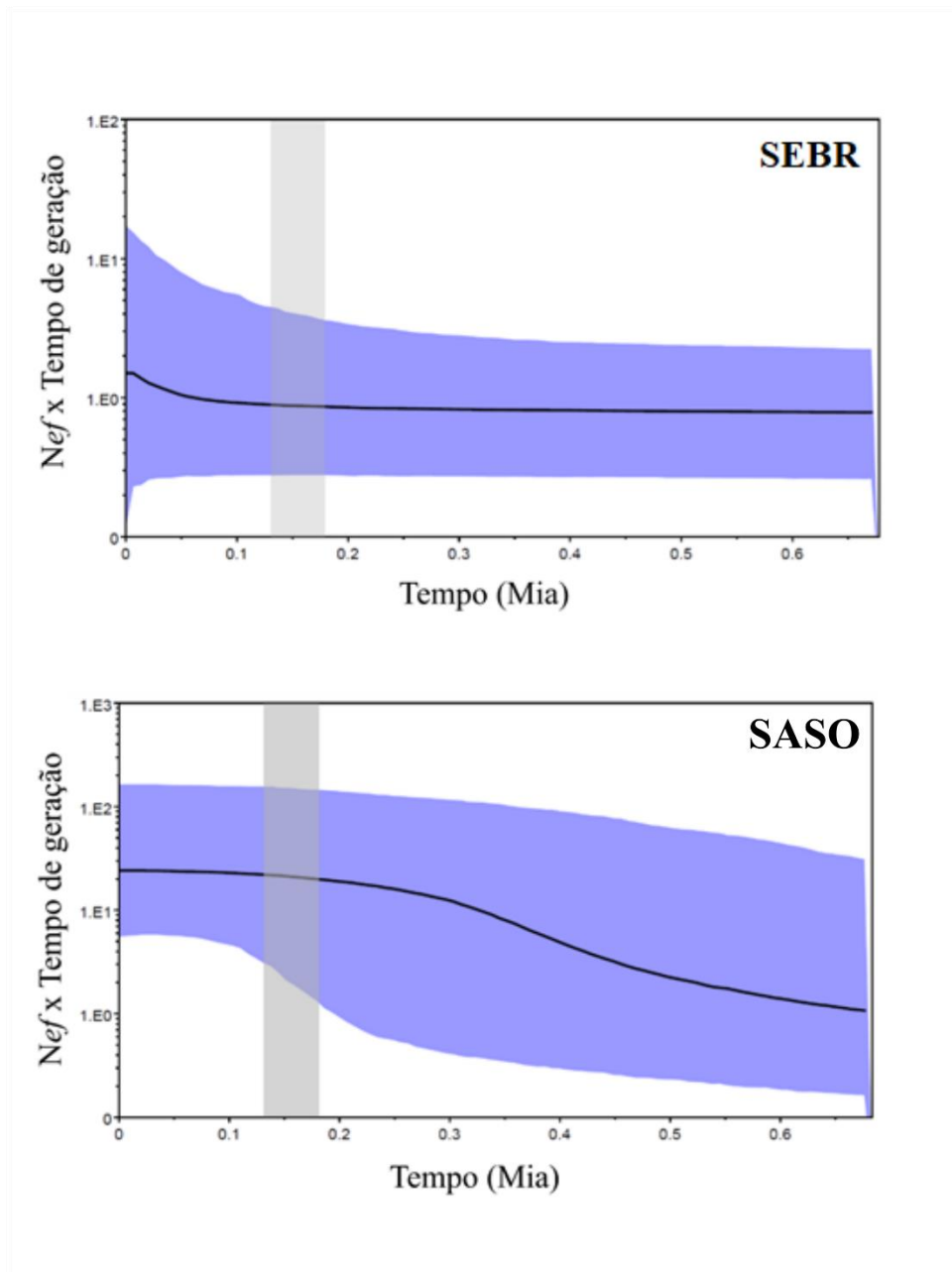


**Figura 9** - Rede de Haplótipos *Median-joining* entre as linhagens mitocondriais de *Squatina guggenheim* utilizando matriz molecular RC-COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo; os segmentos representam um evento mutacional e os pontos negros, haplótipos hipotéticos não amostrados.

Os testes de neutralidade ( $F_s$  e  $R_2$ ) demonstraram sinais de expansão populacional para todas as regiões amostrais. No entanto, apenas  $R_2$  foi estatisticamente significativo em todas as regiões (Tabela 6). A análise coalescente BSP foi realizada considerando as duas populações (SEBR e SASO) previamente identificadas pelas análises de estruturação populacional descritas anteriormente. Concordantemente com os testes de neutralidade, o BSP evidenciou a existência de expansão populacional para ambas as populações (Figura 10). De forma geral, as populações apresentaram comportamentos diferentes em relação a história demográfica. A população SEBR, que engloba as regiões amostrais LN-SP, BSSP e LSSP, apresentou um período de 600 mil anos de estabilidade demográfica (aproximadamente de 700 – 100 Ma), com início de expansão populacional iniciado aproximadamente há 50 mil anos atrás (Ma) no Pleistoceno Superior (Figura 10). No entanto, a população SASO, referente as regiões amostrais SOBR e UYAG, apresentou um processo de expansão demográfica leve, iniciado desde o período de coalescência haplotípica (700 Ma), durante o Pleistoceno Médio, e atingiu um comportamento estável há cerca de 150 Ma (Figura 10).

**Tabela 6** - Estimativas dos Testes de Neutralidade para *Squatina guggenheim* entre as regiões amostradas e as linhagens identificadas. *F<sub>s</sub>*, Fu's *F<sub>s</sub>* teste; *P F<sub>s</sub>*, P valor de Fu's *F<sub>s</sub>* teste (significância  $P < 0.02$ ); *R<sub>2</sub>*, Ramos-Onsins & Rozas teste; *P R<sub>2</sub>*, P valor de *R<sub>2</sub>* teste (significância  $P < 0.05$ ) Em negrito valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

<i>Locus</i>	<b>Regiões amostrais</b>					
	<b>LNSP</b>	<b>BSSP</b>	<b>LSSP</b>	<b>SOBR</b>	<b>UYAG</b>	<b>Total</b>
<i>F<sub>s</sub></i>	-1.5478	-1.0449	-3.1877	-6.5255	-9.7565	-4.4125
<i>P F<sub>s</sub></i>	0.1067	0.3397	0.0830	<b>0.0026</b>	<b>0.0026</b>	0.1079
<i>R<sub>2</sub></i>	0.2267	0.1158	0.1165	0.1438	0.1353	0.0896
<i>P R<sub>2</sub></i>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>



**Figura 10** - Bayesian Skyline Plot (BSP) de *Squatina guggenheim*. O eixo x está em unidades de milhões de anos atrás (Mia) e o eixo y é o produto do tamanho efetivo da população ( $N_{ef}$ ) multiplicado pelo tempo de geração. A linha sólida é a estimativa mediana; a sombra azul mostra os limites de 95% de Maior Densidade à Posteriori (HPD); e a sombra cinza refere-se ao Período da Penúltima Glaciação (PPG) – 180 Ma – 140 Ma (*Oxygen Isotopic Stages* – *OIS* 6). SEBR: população Sudeste do Brasil; SAO: população sul do Atlântico Sudoeste.

## 5. Discussão

Estudos genético-populacionais são indispensáveis para o desenvolvimento de efetivos planos de manejo e conservação, sobretudo para espécies ameaçadas de extinção, como é o caso do cação-anjo *Squatina guggenheim* (Marini, 1936) que possui status “*Endangered*” pela IUCN (Oddone *et al.*, 2019). Neste trabalho, a utilização de uma combinação de marcadores mitocondriais evidenciou a presença de diferentes níveis de diversidade genética, com baixos índices para as regiões amostrais do Sudeste do Brasil. Foi possível identificar a presença de alta estruturação populacional e ausência de haplótipos compartilhados entre as regiões do Sudeste do Brasil (LNSP, BSSP e LSSP) e Uruguai-Argentina (UYAG) para as matrizes moleculares concatenadas: Região Controle do DNAm - Citocromo *c* oxidase subunidade I (RC-COI) e Região Controle do DNAm - Citocromo B - Citocromo *c* oxidase subunidade I (RC-CytB-COI), caracterizando duas populações bem definidas e sugerindo restrita migração matrilinear entre as duas regiões. Além disso, inferências filogenéticas e demográficas revelaram a presença de duas linhagens mitocondriais geograficamente sobrepostas e a presença de expansão demográfica populacional durante o Pleistoceno.

### 5.1 Diversidade genética e estruturação populacional

As estatísticas obtidas referente aos índices de diversidade genética em todos os marcadores mitocondriais analisados demonstram padrões condizentes as suas respectivas taxas de evolução, dos quais a RC do DNAm apresentou os índices mais altos de diversidade genética e as matrizes concatenadas apresentaram resultados semelhantes ao obtido somente pela RC. O padrão de diversidade genética do DNAm (RC-CytB-COI) observado em *S. guggenheim* consiste em alta diversidade haplotípica ( $h > 0.5$ ) e baixa diversidade nucleotídica ( $\pi < 0.005$ ), de acordo com as categorias de diversidade genética em peixes marinhos propostas por Grant & Bowen (1998), sendo essa categoria a mais frequente. Nos elasmobrânquios, esse padrão de diversidade genética também vem sendo observado na maioria dos estudos genéticos

(Domingues *et al.*, 2018). Já o marcador nuclear *its-2*, apresentou índices extremamente baixos de diversidade genética, caracterizando-o como um marcador molecular homogêneo a nível intraespecífico (Presa *et al.*, 2002; Calderon, Garrabou & Aurelle, 2005).

Em geral, a RC utilizada em grande parte dos estudos de genética populacional, apresentou níveis similares de diversidade genética em estudos com elasmobrânquios de hábitos semelhantes a *S. guggenheim*, como *Rhinobatos productus* ( $h = 0.77$ ;  $\pi = 0.0119$  - Sandoval-Castillo *et al.*, 2004), *Mustelus henlei* ( $h = 0.77$ ;  $\pi = 0.004$  - Chabot *et al.*, 2015) e *Mustelus mustelus* ( $h = 0.867$ ;  $\pi = 0.0044$  - Hull *et al.*, 2019). No entanto, a espécie congênica *Squatina californica*, apresentou maiores índices de diversidade genética ( $h = 0.977$ ;  $\pi = 0.013$  - Ramírez-Amaro *et al.*, 2017), sendo este o único estudo existente para espécies do gênero *Squatina* utilizando a RC. De forma mais específica, o menor índice de diversidade haplotípica foi encontrado no marcador mitocondrial CytB, porém, ainda foi consideravelmente maior do que o encontrado para a espécie *Mustelus schmitti* ( $h = 0.226$ , Pereyra *et al.*, 2010), que dispõe de características comportamentais semelhante a *S. guggenheim* e também é uma espécie endêmica do Atlântico Sudoeste.

Em comparação ao estudo prévio efetuado por Garcia *et al.* (2014) para *S. guggenheim*, os índices de diversidade genética dos marcadores moleculares CytB e *its-2* apresentaram níveis de diversidade haplotípica similares ao deste estudo ( $h_{\text{CytB}} = 0.382$ ;  $h_{\text{its-2}} = 0.263$ , Garcia *et al.*, 2014), porém, apresentaram considerável divergência nos dados de diversidade nucleotídica ( $\pi_{\text{CytB}} = 0.011$ ;  $\pi_{\text{its-2}} = 0.007$  - Garcia *et al.*, 2014), que pode ser justificada pela representatividade amostral restrita a região do Rio de La Plata, impossibilitando a comparação direta com o presente estudo. No entanto, observando apenas a região amostral UYAG (região que sobrepõe a abordada pelo estudo de García *et al.*, 2014), é possível identificar um padrão de diversidade genética semelhante para ambos os marcadores moleculares.

Em geral, espécies de tubarões costeiros e com restrita distribuição geográfica tendem possuir menores valores de diversidade genética (Karl *et al.* 2011; Domingues *et al.*, 2018). Nesse sentido, é importante destacar a ausência de informações sobre diversidade genética de espécies de elasmobrânquios endêmicas do Atlântico Sudoeste, o que dificulta a discussão comparativa do presente estudo. Além disso, algumas dessas espécies estão atualmente presentes na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, como *Pseudobatos horkelii*, *Mustelus fasciatus*, *Rioraja agassizi*, e as espécies congênicas *S. occulta* e *S. argentina*, caracterizando a vulnerabilidade dos elasmobrânquios endêmicos do Atlântico Sudoeste (IUCN, 2019).

A nível intraespecífico, foi possível observar diferentes padrões de diversidade genética entre as regiões amostrais, evidenciando a estruturação populacional existente em *S. guggenheim*. Com relação a essa divergência observada, todos os marcadores moleculares analisados (individuais e concatenados) demonstraram índices baixos de diversidade genética para as localidades amostrais do sudeste do Brasil (Baixada Santista – BSSP e Litoral Sul de São Paulo - LSSP), as quais enquadram-se na primeira categoria de diversidade genética ( $h < 0.5$  e  $\pi < 0.005$ ), proposta por Grant & Bowen (1998), que sugere ser uma assinatura genética de populações afetadas pela deriva genética seguido por processo recente de expansão populacional. Este padrão proposto pode ter sido reflexo das mudanças ambientais ocorridas durante o Pleistoceno, que afetaram principalmente as espécies costeiras do Atlântico Sudoeste (Ludt & Rocha, 2015). Em contrapartida, as regiões SOBR e UYAG apresentaram altos índices de diversidade genética que refletem alguns fatores ecológicos, tais como alta produtividade advinda da Convergência Subtropical e também por ser considerada região de berçário para a espécie *S. guggenheim* (Vögler *et al.*, 2008; Vooren & Klippel, 2005). De forma semelhante, o mesmo padrão de diversidade genética foi observado para o tubarão costeiro *Rhizoprionodon lalandii* no Atlântico Sudoeste (Mendonça *et al.*, 2013).

Segundo Chiaramonte & Vooren (2007), a faixa de distribuição geográfica da espécie costeira *S. guggenheim* é extensa e, provavelmente, é composta por populações locais menores. O presente estudo evidencia essa informação, na qual a presença de estruturação genética populacional inferida pela AMOVA é alta e significativa para todos os marcadores mitocondriais utilizados (Tabela 3). No entanto, para o marcador nuclear *its-2* não foi possível observar a presença de estruturação populacional, confirmando a baixa resolução desse marcador para estudos intraespecíficos (Presa *et al.*, 2002; Calderon *et al.*, 2006) ou sugere uma possível conectividade entre as populações baseada em indivíduos machos, como já reportado em espécies de tubarões (Daly-Engel *et al.*, 2012; Portnoy *et al.*, 2015) para tanto, deve ser investigada por meio de marcadores nucleares mais específicos.

Dessa forma, os resultados obtidos por meio dos marcadores mitoccomondriais caracterizam ausência de panmixia na população de *S. guggenheim* e a ocorrência de, ao menos, duas populações no Atlântico Sudoeste: Sudeste do Brasil (SEBR) e Sul do Atlântico Sudoeste (SASO). Adicionalmente, a análise de estruturação genética espacial sugeriu a existência de dois grandes clusters, considerados grupos geneticamente diferentes, condizentes com as duas populações caracterizadas pela AMOVA. Entretanto, a partir da comparação do índice  $\Phi_{ST}$  por pares, é possível observar a existência de estruturação, inclusive, em fina escala, havendo para cada região amostral potencial para enquadrar-se como pequenas populações locais. Esse padrão de heterogeneidade genética também foi observado na espécie congênica *Squatina californica* na costa do Pacífico (Ramírez-Amaro *et al.*, 2017) e pode estar atribuído a características biológicas do cação-anjo, como limitado potencial de natação, preferência por habitats costeiros e ausência de desenvolvimento larval (Colonello, Lucifora & Massa, 2007).

Além disso, para *S. guggenheim*, a estruturação populacional também pode estar relacionada a complexidade oceanográfica do Atlântico Sudoeste. Conforme observado por meio do algoritmo de Monmonier, a barreira (interrupção ao fluxo gênico) mais forte ocorre

entre as duas grandes populações SEBR e SASO (Figura 5), sugerindo a temperatura da água como a principal variável que modula a estruturação populacional de *S. guggenheim*, assim como já descrito por Vögler *et al.* (2008). A circulação oceanográfica presente na plataforma continental do Atlântico Sudoeste fornece gradientes térmicos particulares devido à presença da Convergência Subtropical e apresenta acentuadas diferenciações de temperatura ao longo da costa (Olson *et al.*, 1988; Acha *et al.*, 2004).

Sendo assim, é possível sugerir que a combinação de fatores físico-químicos e ecológicos na paisagem oceanográfica do Atlântico Sudoeste modula o processo de alimentação, comportamentos reprodutivos e, conseqüentemente, afetam a dispersão de indivíduos, caracterizando uma população heterogênea em *S. guggenheim*. Da mesma forma, outros estudos com peixes marinhos também constataram divergência genética entre os estoques sudeste e sul da costa brasileira (Haimovici & Miranda, 2005; Vaz-dos-Santos *et al.*, 2009; Vasconcellos *et al.*, 2015). Apesar de García *et al.*, (2014) terem identificado a presença de um grupo isolado referente a região amostral mais distante da costa (*outer shelf*), o estudo não identificou a presença de estruturação populacional latitudinal em *S. guggenheim* devido a restrição geográfica amostral, concentrada apenas na região do Rio de La Plata.

Apesar da alta estruturação populacional encontrada em *S. guggenheim* no presente trabalho, a rede de haplótipos obtida para cada marcador molecular demonstra a existência de compartilhamento restrito de haplótipos entre as duas populações caracterizadas (SEBR e SASO). O marcador CytB, apresentando o maior índice de estruturação populacional, exemplifica claramente o comportamento conectivo das populações, no qual a rede de haplótipos apresenta um agrupamento estrutural, porém, dispõe de haplótipos (Hap\_1 e Hap\_2) centrais, provavelmente mais ancestrais e que estão presente em todas as regiões amostradas (Figura 7). A evidência de conectividade pode ser oriunda de conexões que ainda permanecem

presentes ou indicam que, apesar de estruturadas, as populações apresentam certo grau de fluxo gênico.

## 5.2 *Filogeografia e demografia histórica*

A história evolutiva dos haplótipos obtida pelos marcadores concatenados RC-COI revelaram a existência de duas linhagens matrilineares simpátricas de *S. guggenheim* no Atlântico Sudoeste, que divergiram há 1,266 Mia, durante o Pleistoceno Inferior (1,4 – 0,4 Mia), compostas por indivíduos representantes de todas as regiões geográficas atuais amostradas. O Pleistoceno (2,58 – 0,01 Mia) consiste na época geológica na qual a genealogia da maioria das espécies coalesce e, conseqüentemente, possui um histórico climático conhecido com certa precisão pelas análises de gelo glacial antigo e sedimentos oceânicos (Lisiecki & Raymo, 2007). Esse período geológico apresentou frequentes oscilações climáticas, alternando intervalos glaciais e interglaciais que geraram grandes transformações na estrutura e dinâmica de circulação oceânica (Suguio, 2003).

Nesse período, o oceano Atlântico Sudoeste foi marcado por intensos eventos de regressão e transgressão marinha, ligados a formação de calotas glaciais que ocasionaram o rebaixamento do nível do mar em cerca de 125 m abaixo do atual durante das fases glaciais, expondo até 92% da plataforma continental habitável atualmente (Suguio, 2001; Ludt & Rocha, 2015). Além disso, condições meteorológicas particulares da América do Sul no Pleistoceno proporcionaram alterações climáticas e oceanográficas consideráveis entre os períodos glaciais e interglaciais. Durante as fases glaciais, a corrente marinha subtropical do Brasil era deslocada para o norte e substituída pela corrente fria das Malvinas, resultando na queda de temperatura da água para cerca de 10°C nas latitudes entre 29°S e 26°S durante os períodos glaciais (Damuth & Fairbridge, 1970; Suguio, 2003). Em consequência, o Pleistoceno apresenta fortes indícios de fragmentação em populações de espécies costeiras, fundamentando

processos de dispersão populacional em busca de condições mais favoráveis (Ludt & Rocha, 2015). Diante disso, o surgimento de duas linhagens simpátricas do tubarão costeiro *S. guggenheim* durante esse período pode estar associado a divergência em busca de habitat da população panmítica histórica, ocasionando o isolamento de duas populações, e posteriormente, a volta da conectividade entre elas, interrompendo o processo de especiação. No entanto, a rede de haplótipos das linhagens (Figura 8) demonstra que as mudanças ambientais ocorridas durante as fases glaciais não isolaram por completo as duas populações (L1 e L2), existindo um compartilhamento de haplótipos entre duas linhagens (Hap\_5 e Hap\_18).

Por outro lado, ao longo da topologia histórica de *S. guggenheim*, é possível observar eventos de divergência entre clados que ainda estão associados aos efeitos dos ciclos glaciais do Pleistoceno. Clados um pouco mais recentes em ambas as linhagens (clados roxo, azul e verde – Figura 8b), que datam de 1,099 – 0,963 Mia, podem indicar processos de diferenciação vicariante após o contato secundário das linhagens L1 e L2, pois os grupos formados entre os haplótipos (clados) condizem com as populações SEBR e SASO, que refletem da influência das barreiras biogeográficas presentes no Atlântico Sudoeste, como a temperatura e salinidade.

As análises demográficas efetuadas indicam a ocorrência de eventos passados de expansão populacional para ambas as populações (SEBR e SASO) de *S. guggenheim*. O teste de neutralidade  $F_s$  apresentou resultados negativos, evidenciando a hipótese de expansão populacional, porém, não apresentou significância estatística para todas as regiões amostrais (Tabela 6). O segundo teste de neutralidade efetuado,  $R_2$ , demonstrou valores positivos, reforçando a presença de expansão populacional, além de ter apresentado resultados mais aprimorados devido à sua maior aplicabilidade para amostragens menores (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Para análise demográfica BSP, ambas as populações (SEBR e SASO) apresentam eventos de expansão populacional durante o Pleistoceno, condizente com as evidências apresentadas pelos testes de neutralidade. Os testes BSPs para a população SEBR demonstram a ocorrência de um processo de expansão demográfica iniciado há, aproximadamente, 50 Ma, durante o Último Máximo Glacial (UMG) no Pleistoceno Superior (126 – 11,7 Ma), depois de um grande período de estabilidade demográfica (Figura 9). A população SASO também apresentou expansão populacional, iniciado há 700 Ma, persistindo em processo de expansão durante quase todo o período do Pleistoceno Médio (781 – 126 Ma) (Figura 9).

Embora as populações tenham exibido histórias demográficas diferentes, ambas refletem processos de expansão demográfica durante o Pleistoceno. Essa época geológica foi marcada por períodos glaciais e interglaciais com grandes impactos ao ecossistema, principalmente no ambiente costeiro (Ludt & Rocha, 2015). Como previamente discutido, oscilações no nível do mar, temperatura e mudanças de correntes oceânicas foram intensamente presentes nesse período na América do Sul (Damuth & Fairbridge, 1970; Rabassa *et al.*, 2005; Ludt & Rocha, 2015), e afetaram a história demográfica de muitos peixes marinhos nessa região (Machado *et al.*, 2017 ; Iriarte *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2006).

A divergência entre as histórias demográficas das populações de *S. guggenheim* pode estar relacionada aos diferentes impactos climáticos ocorridos em cada região durante os períodos glaciais. De forma mais específica, considerando os períodos de glaciação dos últimos 500 Ma, a América do Sul foi marcada por uma extensa glaciação ocorrida entre, aproximadamente, 180 – 140 Ma (*Oxygen Isotopic Stages* – OIS 6), denominado Período da Penúltima Glaciação (PPG), tal qual foi marcado por grandes mudanças na dinâmica das correntes marinhas (Singer *et al.*, 2004; Rabassa *et al.*, 2005). O deslocamento mais ao norte da corrente marinha fria das Malvinas, ocorrido mais intensamente durante esse período, transferiu a região de ocorrência da Convergência Subtropical de 38°S para 20°C, refletindo

em alterações de temperatura e salinidade no ambiente marinho nas regiões sul do Brasil, Uruguai e Argentina (Iriarte *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2006). Essa mudança na circulação das correntes marinhas do Atlântico Sul pode ter influenciado diretamente um evento de dispersão da população SASO de *S. guggenheim* para o norte, devido à temperatura ser a principal variável ambiental que influencia a distribuição dessa espécie (Vögler *et al.* 2008). Conseqüentemente, essas alterações ambientais podem estar diretamente relacionadas com a estabilidade demográfica da população SASO e expansão demográfica da população SEBR, observadas após o PPG (Figura 10).

Apesar do grande embasamento histórico e levantamento hipóteses para a história demográfica de *S. guggenheim*, é importante ressaltar a existência de fragilidades nos métodos de análises demográficas. Ho & Shapiro (2011) apresentam diversos cofatores que podem influenciar os resultados das simulações da análise BSP, de forma que o cenário demográfico mais próximo da realidade somente se aplica aos dados estritamente ajustados, como por exemplo o tamanho da amostragem dos indivíduos e a calibração do relógio molecular podem afetar muito as reconstruções demográficas históricas (Grant, 2015). Desta forma, em virtude de a história demográfica ser a principal informação para planos de conservação, uma vez que oscilações históricas nos tamanhos populacionais e nos seus tamanhos efetivos (*N<sub>e</sub>*) delineiam a trajetória de persistência ou não das espécies ao longo do tempo, é imprescindível que esses dados sejam interpretados com cautela para efetiva utilização em programas de gestão e conservação pesqueira (Frankham *et al.*, 2008)

### 5.3 Dados genéticos e a contribuição para a conservação

Compreender as mudanças genéticas e as respostas evolutivas das populações exploradas é crucial para a implantação de efetivos planos de manejo e conservação (Allendorf *et al.*, 2013). Tendo em vista os diversos aspectos genético-populacionais históricos de *S.*

*guggenheim* apresentados nesse estudo, é válido destacar algumas particularidades observadas ao nível de conservação.

Segundo os índices de diversidade genética previamente apresentados (Tabela 2), a população SEBR apresenta menor diversidade genética em comparação com a população SASO, demonstrando a fragilidade da população da população presente no Sudeste do Brasil frente a grandes declínios populacionais. A costa do estado de São Paulo é a única região de ocorrência de *S. guggenheim* com ausência de relatórios anuais sobre desembarques de cações-anjo e, inclusive, corresponde a grande parte do número amostral do presente estudo, dificultando a obtenção de dados exclusivos sobre o status populacional (ICMBio, 2018; Oddone et al., 2019). Nesse sentido, é imperativo destacar a vulnerabilidade da população SEBR e a necessidade da realização de planos de conservação que considerem essas particularidades.

Por outro lado, a alta diversidade genética presente na população SASO e a presença de muitos haplótipos exclusivos (Figuras 5 e 7) sugere uma baixa conectividade e potencial evolutivo independente dessa população. Considerando os dados pesqueiros, a região do sul do Brasil apresentou altos índices de sobrepesca, principalmente na década de 1990, após a implantação de uma pesca direcionada aos cações-anjo, por meio de redes de emalhe de fundo (Klippel et al., 2005). Com isso, apesar da alta diversidade genética observada nessa população, há extrema necessidade de aplicação de medidas de conservação exclusivas, de modo a conservar seu potencial adaptativo (Mendonça et al., 2013).

No entanto, apesar de algumas ações de conservação estarem sendo efetuadas atualmente, como reportado por Oddone et al. (2019), ainda há indícios recentes de desembarque de *S. guggenheim*, principalmente advindos da pesca incidental (Almeron-Souza et al., 2018; Bunholi et al., 2018).

## 6. Conclusão

O presente estudo apresentou informações relevantes sobre a dinâmica genética populacional da espécie ameaçada *S. guggenheim* no Atlântico Sudoeste, contribuindo para a geração de dados relevantes e na elaboração de medidas de conservação que considerem as particularidades de cada região.

A presença de ao menos duas populações estruturadas entre as regiões do Sudeste do Brasil (SEBR) e Sul do Atlântico Sudoeste (SASO) condizem com os aspectos biológicos e ecológicos de *S. guggenheim*, sendo o limitado fluxo gênico caracterizado pela baixa capacidade de dispersão e diferenças físico-químicas da região, tornando-as geneticamente distintas e demograficamente independentes, que devem ser consideradas em planos de conservação ao longo de sua distribuição geográfica. Além disso, a identificação de uma possível divergência genética em fina escala indica a necessidade de planos de conservação ainda mais específicos em algumas regiões, de forma a considerar a situação de populações, como é o caso da região denominada LSSP, que apresenta baixos índices de diversidade genética e é região alvo de grandes práticas pesqueiras. Adicionalmente, as análises filogeográficas e demográficas indicam resiliência da espécie frente a oscilações ambientais ocorridas durante o Pleistoceno. No entanto, apesar da espécie não ter apresentado eventos históricos de declínio populacional tão acentuados, é importante destacar sua vulnerabilidade frente aos impactos ambientais antrópicos, devido a suas características biológicas.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar na elaboração de planos de manejo e conservação efetivos para essa espécie ameaçada, contribuindo aos dados biológicos e ecológicos. Nesse sentido, análises genético-populacionais permitiram o acesso a informações refinadas sobre a dinâmica populacional da espécie, fornecendo dados essenciais para a criação de medidas de conservação mais efetivas, que considerem sua heterogeneidade populacional.

Apesar do presente estudo identificar duas grandes populações (SEBR e SASO), é notório a presença de divergência genética entre as regiões geográficas amostradas. Com isso, considerando a heterogeneidade genética observada e os diferentes padrões demográficos, sugere-se que os planos de conservação sejam aplicados em fina-escala. Além disso, as regiões de ocorrência da espécie *S. guggenheim* apresentam diferentes padrões de exploração pesqueira, principalmente entre diferentes países, por isso a necessidade de considerar as diferentes regiões nos planos de conservação. De forma mais específica, projetos de conservação para essa espécie devem considerar a implementação de políticas públicas que integrem a União e a sociedade, priorizando combater regionalmente a presença da pesca ilegal, não declarada e não regulamentada, principal causa do declínio populacional da espécie.

## 7. Referências Bibliográficas

- Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerrero, R. A., Favero, M., & Bava, J. (2004). Marine fronts at the continental shelves of austral South America: physical and ecological processes. *Journal of Marine systems*, 44(1-2), 83-105.
- Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2009). *Conservation and the genetics of populations*. John Wiley & Sons.
- Allendorf, F. W., Luikart, G., Aitken, S. N. (2013). *Conservation and the genetics of population*. Blackwell, Oxford.
- Almerón-Souza, F., Sperb, C., Castilho, C.L., Figueiredo, P.I., Goncalves, L.T., Machado, R., Oliveira, L.R., Valiati, V.H. and Fagundes, N.J. (2018). Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA barcoding: Evidence for mislabeling and trade of Endangered species. *Frontiers in Genetics*, 9.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Avise, J. C. (1998). Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity*, 89(5), 377-382.

- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, Harvard University Press.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.
- Awruch, C.W., Lo Nostro, F.L., Somoza, G.M. & DiGiacomo, E. (2008). Reproductive biology of the angular angel shark *Squatina guggenheim* (Chondrichthyes, Squatinidae) off Patagonia (Argentina, southwestern Atlantic). *Ciencias Marinas*, 34(1), 17-28.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1), 37-48.
- Beheregaray, L. B., Sunnucks, P., & Briscoe, D. A. (2002). A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1486), 65-73.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Birky, C. W., Fuerst, P., & Maruyama, T. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121(3), 613-627.
- Bonaparte, C.L.J.L. (1838) Familia Squatinidae, Selachorum tabula analytica. *Nuovi annali delle scienze naturali e rendiconto dei lavori dell' Accademia della Scienze dell' Instituto di Bologna con appendice agraria*. Bologna, ser.1, v. 2, 214 pp.
- Bornatowski, H., Braga, R. R., & Vitule, J. R. S. (2013). Shark mislabeling threatens biodiversity. *Science*, 340(6135), 923-923.
- Brander, L.M., Van Beukering, P.J.H., Cesar, H.S.J. (2007). The recreational value of coral reefs: a meta-analysis. *Ecological Economics*, 63, 209–218
- de Buen, F. (1926) Catálogo ictiológico del Mediterráneo español y de Marruecos: recopilando lo publicado sobre peces de las costas mediterránea y próximas del Atlántico (Mar de España). Resultado de las campañas realizadas por acuerdos internacionales. "Mateu" Artes e Industrias Gráficas, Madrid. No. 2, 221 pp.

- Bunholi, I. V., Ferrette, B. L. S., De Biasi, J. B., Magalhães, C. O., Rotundo, M. M., Oliveira, C., Foresti, F., Mendonça, F. F. (2018). The fishing and illegal trade of the angelshark: DNA barcoding against misleading identifications. *Fisheries Research*, 206, 193–197.
- Burrows, M. T., Schoeman, D. S., Buckley, L. B., Moore, P., Poloczanska, E. S., Brander, K. M., Holding, J. (2011). The pace of shifting climate in marine and terrestrial ecosystems. *Science*, 334, 652-655.
- Calderón, I., Garrabou, J., & Aurelle, D. (2006). Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336(2), 184-197.
- Camargo, S. M. D. (2015). Conectividade e variabilidade genética do tubarão galha-branca oceânico, *Carcharhinus longimanus*, usando DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Camhi, M. (1998). *Sharks and their relatives: ecology and conservation* (No. 20). IUCN.
- Cappetta, H. (1987). Extinctions et renouvellements fauniques chez les Sélaciens post-jurassiques. *Mémoires de la Société géologique de France*, 150, 113-131.
- CTMFM (Comision Tecnica Mixta del Frente Maritimo). (2018). Estadística Pesquera Desembarques en el Area del Tratado. Disponível em: <http://www.ctmfm.org/archivos-de-captura/>.
- Chabot, C.L., Espinoza, M., Mascareñas-Osorio, I., Rocha-Olivares, A. (2015). The effect of biogeographic and phylogeographic barriers on gene flow in the brown smoothhound shark, *Mustelus henlei*, in the northeastern Pacific. *Ecology Evolution* 5, 1585–1600
- Chaves, P. D. T. C., & da Silva, A. V. F. (2019). Recursos-alvo que são também *bycatch*, e recomendação para a gestão da pesca de emalhe no litoral do Paraná, Brasil. *Revista CEPSUL-Biodiversidade e Conservação Marinha*, 8, e2019001.
- Chiaramonte, G. E. (1998). Shark fisheries in Argentina. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 49(7), 601–609.
- Chiaramonte, G.E. (2004). IUCN Red List of Threatened Species, cap. *Squatina guggenheim* (Brazilian subpopulation). [<http://www.redlist.org>].

- Chiaramonte, G., Vooren, C. M., & IUCN. (2007). *Squatina guggenheim*. IUCN Red List of Threatened Species: Version 2013.1.
- Clarke, S. C., Harley, S. J., Hoyle, S. D., & Rice, J. S. (2013). Population trends in Pacific Oceanic sharks and the utility of regulations on shark finning. *Conservation Biology*, 27(1), 197-209.
- Colonello, J. H., Lucifora, L. O., & Massa, A. M. (2007). Reproduction of the angular angel shark (*Squatina guggenheim*): geographic differences, reproductive cycle, and sexual dimorphism. *ICES Journal of Marine Science* 64, 131–140.
- Compagno, L. J. V. (1984). FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes: FAO Fisheries Synopsis, (125), 251-655.
- Compagno, L. J. V. (1990). Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, 28, 33-75.
- Compagno, L. J. V., Dando, M., and Fowler, S. (2005). 'A Field Guide to the Sharks of the World.' (Harper Collins Publishers: London, UK).
- Cortés, E. (2000). Life history patterns and correlations in sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299-344.
- Crain, C. M., Halpern, B. S., Beck, M. W., & Kappel, C. V. (2009). Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162(1), 39-62.
- Daly-Engel, T. S., Seraphin, K. D., Holland, K. N., Coffey, J. P., Nance, H. A., Toonen, R. J., Bowen, B. W. (2012). Global phylogeography with mixed-marker analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *PLoS ONE*, 7(1), e29986.
- Damuth, J. E., & Fairbridge, R. W. (1970). Equatorial Atlantic deep-sea arkosic sands and ice-age aridity in tropical South America. *Geological Society of America Bulletin*, 81(1), 189-206.
- Davidson, L. N., Krawchuk, M. A., & Dulvy, N. K. (2016). Why have global shark and ray landings declined: improved management or overfishing? *Fish and Fisheries*, 17(2), 438-458.

- Davies, R. W. D., Cripps, S. J., Nickson, A., & Porter, G. (2009). Defining and estimating global marine fisheries bycatch. *Marine Policy*, 33(4), 661-672.
- De-Franco, B.A., Mendonça, F.F., Oliveira, C., Foresti, F. (2012). Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: Genetic identification to aid conservation. *Aquatic Conservation*, 22, 272–276.
- Domingues, R. R., Hilsdorf, A. W. S., Gadig O. B. F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 19(3), 501-525.
- Domingues, R. R., Bruels, C. C., Gadig, O. B., Chapman, D. D., Hilsdorf, A. W., & Shivji, M. S. (2019). Genetic connectivity and phylogeography of the night shark (*Carcharhinus signatus*) in the western Atlantic Ocean: Implications for conservation management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(1), 102-114.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1185-1192.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Drummond, A.J., & Bouckaert, R. R. (2015). *Bayesian evolutionary analysis with BEAST*. Cambridge University Press.
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., Krück, N. C., Morgan, J. A. T., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1789-1843.
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musickm J, A., Cavanagh, R.D., et al. (2014) Extinction risk and conservation of the world’s sharks and rays. *eLife*, 3, e00590
- Dumeril, A.M.C. (1806) *Zoologie Analytique: ou méthode naturelle de classificatio des animaux*. Allais, Paris, 377 pp.
- Ebert, D. A., Fowler, S. L., Compagno, L, J. (2013). *Sharks of the world: a fully illustrated guide*. Wild Nature Press, Plymouth.

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Elderfield, H., Ferretti, P., Greaves, M., Crowhurst, S., McCave, I. N., Hodell, D., & Piotrowski, A. M. (2012). Evolution of ocean temperature and ice volume through the mid-Pleistocene climate transition. *Science*, 337(6095), 704-709.
- Ersts, P. J. (2011). Geographic distance matrix generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation, 1-4.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2), 479-491.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- FAO. (2019). Fishery and Aquaculture Statistics. Global capture production 1950–2017 (FishstatJ). in FAO Fisheries and Aquaculture Department [[www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj)]
- Ferrette, B. L. D. S., Domingues, R. R., Rotundo, M. M., Miranda, M. P., Bunholi, I. V., De Biasi, J. B., ..., Mendonça, F. F. (2019a). DNA barcode reveals the bycatch of endangered batoids species in the southwest Atlantic: Implications for sustainable fisheries management and conservation efforts. *Genes*, 10(4), 304.
- Ferrette, B. L. D. S., Domingues, R. R., Ussami, L. H., Moraes, L., de Oliveira Magalhães, C., de Amorim, A. F., ... Mendonça, F. F. (2019b). DNA-based species identification of shark finning seizures in Southwest Atlantic: Implications for wildlife trade surveillance and law enforcement. *Biodiversity and Conservation*, 28, 1– 19.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular ecology*, 17(1), 325-333.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.

- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Kumar, S. (2005). Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology* 304, 64–74.
- García, G., Vergara, J., & Gutiérrez, V. (2008). Phylogeography of the Southern Atlantic menhaden *Brevoortia aurea* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *Marine Biology*, 155(3), 325-336.
- García, G. (2012). Phylogeography from South-Western Atlantic Ocean: Challenges for the Southern Hemisphere. *Current Topics in Phylogenetics and Phylogeography of Terrestrial and Aquatic Systems*, 13-32.
- García, G., Pereyra, S., Gutierrez, V., Oviedo, S., Miller, P., Domingo, A. (2014). Population structure of *Squatina guggenheim* (Squatiniformes, Squatinidae) from the south-wester Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 86(1), 186–202.
- Gernhard, T. (2008). The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical biology*, 253(4), 769-778.
- Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of heredity*, 89(5), 415-426.
- Grant, W. S. (2015). Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *Journal of Heredity*, 106, 333–346.
- Gray, C.A., Kennelly, S.J. (2018). Bycatches of endangered, threatened and protected species in marine fisheries. *Fish Biology Fisheries*, 28, 521–541
- Grogan, E. D., Lund, R., & Greenfest-Allen, E. (2012). The origin and relationships of early chondrichthyans. *Biology of sharks and their relatives*, 2, 3-29.
- Guillot, G., Mortier, F., & Estoup, A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes*, 5(3), 712-715.
- Guillot, G., Santos, F., & Estoup, A. (2008). Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, 24(11), 1406-1407.

- Hedges, S. B., Dudley, J., & Kumar, S. (2006). TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics*, 22(23), 2971-2972.
- Heist E.J. (2005). Genetics: stock identification. Management techniques for elasmobranch fisheries. Singapore APEC Fisheries Working Group: (474) 62.
- Hellberg, M. E. (2009). Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 40.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P.F., & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 291-301.
- Hull, K. L., Asbury, T. A., da Silva, C., Dicken, M., Veríssimo, A., Farrell, E. D., Maduna, S. N. (2019). Strong genetic isolation despite wide distribution in a commercially exploited coastal shark. *Hydrobiologia*, 838(1), 121-137.
- ICMBio. (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Brasilia, Brazil, Volume VI Peixes.
- Iriarte, P. J. F., Alonso, M. P., Sabadin, D. E., Arauz, P. A., & Iudica, C. M. (2011). Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. *Scientia Marina*, 75(4), 701-706.
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. Version 2019.1.
- Jombart, T. (2008). ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.
- Karl, S. A., Castro, A. L. F., Lopez, J. A., Charvet, P., & Burgess, G. H. (2011). Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*, 12(2), 371-382.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

- Keeney, D. B., Heupel, M., Hueter, R. E., & Heist, E. J. (2003). Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the US Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 143(6), 1039-1046.
- Kenchington, E. L. (2003). 14 The Effects of Fishing on Species and Genetic Diversity. *Responsible fisheries in the marine ecosystem*, 235.
- Klippel, S., Vooren, C.M., Lamonaca, A.F. & Peres, M.B. (2005). A pesca industrial no sul do Brasil. In: C.M. Vooren and S. Klippel (eds). *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*, pp. 135-178. Porto Alegre: Igaré.
- Kriwet, J., Kiessling, W., & Klug, S. (2009). Diversification trajectories and evolutionary life-history traits in early sharks and batoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 945-951.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Laikre, L. (2010). Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics*, 11(2), 349-354.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Lesack, K., & Naugler, C. (2011). An open-source software program for performing Bonferroni and related corrections for multiple comparisons. *Journal of pathology informatics*, 2.
- Lewison, R. L., Crowder, L. B., Wallace, B. P., Moore, J. E., Cox, T., Zydalis, R., ... & Bjorkland, R. (2014). Global patterns of marine mammal, seabird, and sea turtle bycatch reveal taxa-specific and cumulative megafauna hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5271-5276.
- Lisiecki, L. E., & Raymo, M. E. (2007). Plio-Pleistocene climate evolution: trends and transitions in glacial cycle dynamics. *Quaternary Science Reviews*, 26(1-2), 56-69.
- Lucifora, L. O., García, V. B., Menni, R. C., & Worm, B. (2012). Spatial patterns in the diversity of sharks, rays, and chimaeras (Chondrichthyes) in the Southwest Atlantic. *Biodiversity and Conservation*, 21(2), 407-419.

- Ludt, W. B., & Rocha, L. A. (2015). Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42(1), 25-38.
- Machado, L. F., de Souza Damasceno, J., Bertoincini, Á. A., Farro, A. P. C., Hostim-Silva, M., & Oliveira, C. (2017). Population genetic structure and demographic history of the spadefish, *Chaetodipterus faber* (Ephippidae) from Southwestern Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 45-52.
- Manni, F., Guérard, E., & Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human biology*, 173-190.
- Mantel, N. (1967). Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209–220.
- Marini, T. L. (1930). Nueva especie de pez angel *Rhina argentina* n. sp. *Physis*, Buenos Aires, 10, 5-7.
- Marini, T. L. (1936). Revisión de las especies de la familia Squatinidae en las aguas argentinas (*S. guggenheim* n. sp.). *Physis*, 12, 19-30.
- Martin, A. P., & Palumbi, S. R. (1993). Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 10(4), 873-891.
- Melis, R., Vacca, L., Bellodi, A., Cau, A., Porcu, C., Follesa, M. C., & Cannas, R. (2019). Insights into population genetics, connectivity and demographic history of the longnosed skate *Dipturus oxyrinchus* (Linnaeus, 1758) in the western Mediterranean Sea. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 1-18.
- Mendonça, F.F., Oliveira, C., Gadig, O.B.F., Foresti, F. (2009). Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast Southern Brazil: inferences from mtDNA sequences. *Neotropical Ichthyology*, 7(2), 213–216.
- Mendonça, F. F., Oliveira, C., Gadig, O. B., & Foresti, F. (2011). Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(4), 799-814.

- Mendonça, F. F., Oliveira, C., Gadig, O. B. F., & Foresti, F. (2013). Diversity and genetic population structure of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23(6), 850-857.
- Miranda, L. V., & Haimovici, M. (2007). Changes in the population structure, growth and mortality of striped weakfish *Cynoscion guatucupa* (Sciaenidae, Teleostei) of southern Brazil between 1976 and 2002. *Hydrobiologia*, 589(1), 69-78.
- Molinos, J. G., Halpern, B. S., Schoeman, D. S., Brown, C. J., Kiessling, W., Moore, P. J., ... & Burrows, M. T. (2016). Climate velocity and the future global redistribution of marine biodiversity. *Nature Climate Change*, 6(1), 83-88.
- Moritz, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3, 401-411.
- Musick, J. A. (2005). Introduction: Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii) In: Musick, J.A.; Bonfil, R. (eds) Management techniques for elasmobranch fisheries. FAO Fisheries Technical Paper, 474, 1.
- Myers, R. A., & Worm, B. (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1453), 13-20.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- Oddone, M., Awruch, C.A., Barreto, R., Charvet, P., Chiaramonte, G.E., Cuevas, J.M., Dolphine, P., Faria, V., Paesch, L., Rincon, G. & Vooren, C.M. 2019. *Squatina guggenheim*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T130393378A130393975.
- Odebrecht, C., & Castello, J. P. (2001). The convergence ecosystem in the Southwest Atlantic. In *Coastal marine ecosystems of Latin America* (pp. 147-165). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Okes, N. & Sant, G. (2019). An overview of major shark traders, catchers and species. TRAFFIC, Cambridge, UK.

- Olsen, J. L., Stam, W. T., Coyer, J. A., Reusch, T. B., Billingham, M., Boström, C., ... & Milchakova, N. (2004). North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular ecology*, 13(7), 1923-1941.
- Olson, D. B., Podest´a, G. P., Evans, R. H., Brown, O. B. (1988). Temporal variations in the separation of Brazil and Malvinas Currents. *Deep-Sea Res.* 35, 1971–1990.
- Ovenden, J. R. (2013). Crinkles in connectivity: combining genetics and other types of biological data to estimate movement and interbreeding between populations. *Marine and Freshwater Research*, 64(3), 201-207.
- 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(3), 231-240.
- Piola, A. R., Campos, E. J., Möller, O. O., Charo, M., & Martinez, C. (2000). Subtropical shelf front off eastern South America. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 105(C3), 6565-6578.
- Portnoy, D. S., Puritz, J. B., Hollenbeck, C. M., Gelsleichter, J., Chapman, D., & Gold, J. R. (2015). Selection and sex-biased dispersal in a coastal shark: the influence of philopatry on adaptive variation. *Molecular ecology*, 24(23), 5877-5885
- R Development Core Team (2020). *R: A language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation For Statistical Computing.
- Paesch, L. & Domingo, A. (2003). La pesca de condrictios en el Uruguay. *Comision Tecnica Mixta del Frente Maritimo* 19, 207-216.
- Presa, P., Pardo, B. G., Martínez, P., & Bernatchez, L. (2002). Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2161-2175
- Pereyra, S., García, G., Miller, P., Oviedo, S., & Domingo, A. (2010). Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). *Fisheries Research*, 106(3), 468-473.

- Rabassa, J., Coronato, A. M., & Salemme, M. (2005). Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences*, 20(1-2), 81-103.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M.A. (2018). Tracer v1.7. <http://beast.community/tracer>.
- Ramírez-Amaro, S., Ramírez-Macías, D., Vázquez-Juárez, R., Flores-Ramírez, S., Galván-Magaña, F., & Gutiérrez-Rivera, J. N. (2017). Population structure of the Pacific angel shark (*Squatina californica*) along the northwestern coast of Mexico based on the mitochondrial DNA control region. *Ciencias Marinas*, 43(1), 69-80.
- Ramírez, F., Afán, I., Davis, L. S., & Chiaradia, A. (2017). Climate impacts on global hot spots of marine biodiversity. *Science Advances*, 3(2), e1601198.
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2092-2100.
- Rand, D. M. (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 415-448.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1, 4455.
- Sandoval-Castillo J., Rocha-Olivarez A. y Balford E. F. (2004) Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 145, 983-988.
- Santos, S., Hrbek, T., Farias, I. P., 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(14), 4361-4373.
- Silva, K. D. (1996). Estudo comparativo dos parâmetros populacionais da reprodução dos cação-anjo *Squatina argentina* Marini, 1930, *Squatina guggenheim* (Marini, 1936) e

- Squatina occulta* (Vooren & Silva, 1991) no sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, Brasil.106p.
- Silva, W. C., Marceniuk, A. P., Sales, J. B. L., & Araripe, J. (2016). Early Pleistocene lineages of *Bagre bagre* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of South America, with insights into the demography and biogeography of the species. *Neotropical Ichthyology*, 14(2), e150184.
- Simpfendorfer, C. A., Heupel, M. R., White, W. T., & Dulvy, N. K. (2011). The importance of research and public opinion to conservation management of sharks and rays: a synthesis. *Marine and Freshwater Research*, 62(6), 518-527.
- Singer, B. S., Ackert Jr, R. P., & Guillou, H. (2004). 40Ar/39Ar and K-Ar chronology of Pleistocene glaciations in Patagonia. *Geological Society of America Bulletin*, 116(3-4), 434-450.
- Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K., & Walker, P. A. (2000). The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 476-494.
- Suguio, K. (2003). *Geologia sedimentar*. Editora Blucher.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- UNIVALI. (2013). *Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina – ano 2012*. Universidade do Vale do Itajai, Brasil.
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180.
- Vasconcellos, A. V., Lima, D., Bonhomme, F., Vianna, M., & Solé-Cava, A. M. (2015). Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Fisheries Research*, 167, 333-337.
- Vaz-dos-Santos, A. M., Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B., & Figueiredo, J. L. D. (2009). *Merluccius hubbsi* (Teleostei: Merlucciidae): stock identification based on reproductive

- biology in the South-Southeast Brazilian region. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57(1), 17-31.
- Vieira, C. E. B. (1996). Dinâmica populacional e avaliação de estoques de caçõs-anjo *Squatina guggenheim* (Marini, 1936) e *S. occulta* (Vooren e Silva, 1991) na plataforma continental do sul do Brasil. Tese de Doutorado. Fundação Universidade de Rio Grande, Brasil, 142p.
- Villwock de Miranda, L., & Vooren, C. M. (2003). Catch and effort of demersal elasmobranchs in south Brazil from 1975 to 1997. *Frente Marítimo* 19, 217–231.
- Vögler, R., Milessi, A. C., & Quiñones, R. A. (2008). Influence of environmental variables on the distribution of *Squatina guggenheim* (Chondrichthyes, Squatinidae) in the Argentine–Uruguayan Common Fishing Zone. *Fisheries Research*, 91(2-3), 212-221.
- Vooren, C. M. & Silva, K. G. (1991). On the taxonomy of the angel sharks from southern Brazil, with the description of *Squatina occulta* sp. n. *Revista Brasileira de Biologia*. 51(3), 589-602.
- Vooren, C.M. & S. Klippel. (2005). Biologia e status de conservação dos caçõs-anjo *Squatina guggenheim*, *S. occulta* e *S. argentina*. In: C.M. Vooren & S. Klippel (eds.). *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre: Igaré, 2005. pp. 262.
- Waples, R. S., Punt, A. E., & Cope, J. M. (2008). Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries*, 9(4), 423-449.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Weigmann, S. (2016). Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, 88, 837-1037.
- Worm, B., Davis, B., Kettener, L., Ward-Paige, C. A., Chapman, D., Heithaus, M.R., Kessel, S., Gruber, S. (2013) Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy*, 40,194–204
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 395-420.

Zeller, D., Harper, S., Zylich, K., & Pauly, D. (2015). Synthesis of underreported small-scale fisheries catch in Pacific island waters. *Coral Reefs*, 34(1), 25-39.