

**Marcadores de Microssatélites para estudos de conservação da
Raia-viola *Rhinobatos percellens* (Chondrichthyes,
Rhinobatidae)**

Bruno Lopes da Silva Ferrette

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência, Universidade Estadual
Paulista, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. Fax: 55 14 3815-3744. Telefone: 55
14 3811-6264. E-mail brunoferrette@gmail.com. Endereço para
correspondência BLS Ferrette.

Orientadores: Prof. Dr Fausto Foresti

Co-orientadora Dra. Daniela Cristina Ferreira

Palavras-chave: polimorfismo, conservação, microssatélites, *Rhinobatos*

Botucatu – SP

2010

Resumo

A exploração pesqueira, tanto artesanal quanto industrial, se constitui na maior ameaça à biodiversidade dos elasmobrânquios. Em escala mundial, o manejo adequado destes recursos é dificultado pela escassez de informações básicas sobre a dinâmica populacional destes organismos. A captura comercial de elasmobrânquios tem alcançado números alarmantes, com a inclusão de diversas espécies nas listas de risco de extinção nacional e também internacional. A identificação e a conservação de estoques geneticamente diferenciados e adaptados ao seu habitat, representam um ponto fundamental para o setor pesqueiro, pela sua relação direta com a produtividade total e o uso sustentável dos recursos. Entre as raia marinhas, a família Rhinobatidae é representada pelos gêneros *Rhinobatos*, *Zapteryx*, *Trygonorhina* e *Aptychotrema*, sendo registrada a ocorrência da espécie *Rhinobatos percellens* no Oceano Atlântico desde as Antilhas e Panamá, Venezuela, Jamaica, Brasil, Uruguai, até a Argentina. No presente trabalho foram desenvolvidos marcadores moleculares do tipo microsatélites para raia-viola, *Rhinobatos percellens*, para serem utilizados em estudo populacionais. Cinco locus polimórficos foram isolados utilizando um protocolo de enriquecimento. Nos experimentos, foram testados 13 pares de *primers*, sendo 10 isolados no presente trabalho e 3 isolados para a espécie de tubarão azul (*Prionace glauca*). Dos *primers* isolados em *Rhinobatos percellens*, 5 são polimórficos, 2 monomórficos e 3 apresentaram bandas muito fracas, enquanto os *primers* testados de tubarão azul mostraram-se monomórficos. Todos os locus estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto o RVA9 (de *R. percellens*). Os locus polimórficos apresentam de 3 a 6 alelos por locus e heterozigosidade média esperada de 0.62. Considera-se que estes marcadores polimórficos podem ser utilizados como marcadores moleculares para os estudos da estrutura genética de populações da espécie de raia *R. percellens*.

Introdução

Tubarões e raias formam o grupo dos Elasmobrânquios e estão entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo, com uma história de vida que se iniciou há cerca de 400 milhões de anos, ainda no período Devoniano (Castro, 1987). A biodiversidade de elasmobrânquios, de uma forma geral, ainda é pouco conhecida. De acordo com o último levantamento realizado por Ebert & Compagno (2007) o grupo dos tubarões é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies e entre as raias são reconhecidas 5 ordens, 20 famílias e cerca 574 espécies (Compagno, 1999; Compagno, 2005). Em águas brasileiras são reconhecidas 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias marinhas (Menezes *et al.* 2003), as quais se distribuem em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas, associados a ambientes pelágicos, demersais, recifais, estuários e, eventualmente, serem encontrados também em ambientes de água doce (Compagno, 1990; Gruber, 1990).

A exploração pesqueira constitui-se na maior ameaça à biodiversidade desse grupo, com o agravante de que a nível mundial, o manejo é dificultado pela falta de informações básicas sobre a biologia e abrangência de ocorrência das espécies. A captura destes organismos, dirigida ou acidental, envolve o paradoxo de que tubarões e raias têm baixo valor econômico, o que lhes confere baixa prioridade quando se consideram abordagens sobre pesquisa e conservação, ao passo que a demanda por subprodutos como barbatanas e outras partes específicas do corpo é muito alta, estimulando o aumento da exploração (Bonfil, 1994).

Em ambiente natural, a maior ameaça aos elasmobrânquios é a atividade antrópica. Muitas populações de elasmobrânquios em todo o mundo estão em depleção devido às atividades intensivas da pesca, com algumas espécies encontrando-se já ameaçadas de extinção. Isto acontece devido principalmente a diferentes fatores

relacionados à degradação dos ambientes costeiros em que se desenvolvem; à captura acidental (*by-catch*) e, nos últimos anos, dirigida; ao aumento do esforço de pesca e, como um elemento básico, à estratégia de vida das espécies (Camhi *et al.*, 1998).

O gênero *Rhinobatos*, pertence à ordem *Rhinobatiformes*, família *Rhinobatidae* e as espécies pertencentes a esse gênero são caracterizadas pelo corpo alongado e achatado, com pedúnculo caudal desenvolvido, duas nadadeiras dorsais e nadadeira caudal destacadas e a ponta do focinho terminando em seta, mais ou menos alongada. A fauna brasileira de *Rhinobatidae* é representada por dois gêneros, *Rhinobatos* e *Zapteryx* e pelas seguintes espécies: *Rhinobatos lentiginosus* (Garman, 1880), *Rhinobatos horkelii* (Müller & Henle, 1841), *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) e *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841). Na costa do Brasil, *R. percellens* ocorre desde o Amapá (lat. 4°N) até o Paraná (lat. 25°S). A distribuição de *R. horkelii* estende-se desde São Paulo (lat. 23°S) até a província de Buenos Aires (lat. 39°S) (Menni e Stehmann, 2000). Sua alimentação é basicamente constituída de pequenos invertebrados bentônicos e a atividade alimentar é feita sempre junto ao fundo. Todos os *Rhinobatidae* são vivíparos lecitotróficos, com desenvolvimento embrionário dentro do corpo da mãe, com nutrição vitelar, sem estrutura placentária (Bigelow & Schroeder, 1953; Figueiredo, 1977; Las & Stevens, 1994; Compagno, 1999). No Brasil, as espécies de *Rhinobatos* são conhecidas como “viola” ou “raia-viola”, enquanto *Z. brevirostris* é denominada “banjo” (Figueiredo, 1977).

Raias e tubarões (elasmobrânquios) apresentam crescimento lento, maturidade sexual tardia e baixa produção de filhotes, características que geram pequenas taxas de crescimento populacional (Musick, 1998). Por esta razão, populações de raias e tubarões só podem suportar moderados níveis de pesca sem sofrer depleção e colapso de seus estoques (Musick *et al.*, 2000). De acordo com os registros de pesca reportados por artigos científicos e relatórios de órgãos relacionados à pesca, as populações de raias do

gênero *Rhinobatos* tiveram uma diminuição de cerca de 85% entre os anos de 1985 e 1997 (Miranda e Vooren, 2003). Uma das maiores complicações de se quantificar a captura de cada espécie de raia-viola se dá pela complexidade de se identificar morfológicamente os indivíduos. Contudo, este tipo de identificação não consegue distinguir as espécies a um nível espécie-específico e entre os grupos de *R. horkelii*, *R. percellens* e *Z. brevirostris* (Müller e Henle, 1841). As dificuldades na identificação morfológica das espécies, somadas ao fato de os pescadores cortarem as cabeças das raias pescadas ainda a bordo das embarcações, colaboram com a dificuldade de se identificar de forma fiel os indivíduos de cada espécie.

A identificação da espécie é importante para o seu manejo e para a implantação de planos de conservação. Por isso, o desenvolvimento de ferramentas práticas para a diferenciação no mais baixo nível taxonômico se tornou essencial. Tendo em vista esta dificuldade de identificação morfológica entre as espécies de raias no litoral brasileiro, recentemente foram desenvolvidas técnicas de biologia molecular simples e de baixo custo, como a PCR Multiplex e PCR-RFLP, já utilizadas para identificar as espécies *R. horkelii*, *R. percellens* e *Z. brevirostris* (Mariguela et al. 2009, De Franco et al, 2010), tornando, assim, possível o controle da exploração pesqueira sobre essas espécies, uma vez que *R. horkelii* encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção (IUCN) (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41064/0> – 26 de Janeiro de 2010).

Os marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite tem sido amplamente empregados no estudo de populações de peixes, com inferências sobre conservação e manejo de espécies, estudo de padrões de migração, diferenciação de estoques cultivados e evidências de introgressão genética, entre outros (Waters et al., 2000; Neraas & Spruell, 2001; Hoarau et al., 2002; Kokinen et al., 2002; Filatre et al., 2003, Mães et al., 2006). O termo microssatélite refere-se a uma classe de marcadores de DNA co-dominantes que possui padrão de herança mendeliana. Microssatélites são

sequências de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* de dezenas a milhares de vezes no DNA das espécies e estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, em menor ou maior abundância, podendo ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma (Chambers & Macavoy, 2000; Dewoody & Avise, 2000).

Os marcadores do tipo microssatélite têm se mostrado uma ferramenta extremamente vantajosa para o mapeamento do genoma de muitos organismos (Schuler *et al*, 1996; Knapik *et al*, 1998). Por conta disso, suas aplicações se estendem por diferentes áreas de investigação, como de estudos filogenéticos, forenses, de paternidade, genética de populações e conservação e manejo de recursos biológicos (Jarne & Lagoda, 1996).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver marcadores genéticos do tipo microssatélites para serem utilizados em estudos populacionais da espécie *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792), criando uma ferramenta útil para estudos que visem a preservação a longo prazo da variabilidade genética desta espécie.

Material Métodos

As 35 amostras utilizadas no presente trabalho da espécie *R. percellens* (Figura 1) foram coletadas no estado do Paraná, no município de Pontal do Paraná (lat. 25°40'S, 48°30'W), locais de desembarques de pesca. Estas amostras estão disponíveis na coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu (LBP), para a realização de estudos futuros de genética de populações, sendo que os exemplares correspondentes encontram-se depositados no Museu de Peixes deste laboratório.

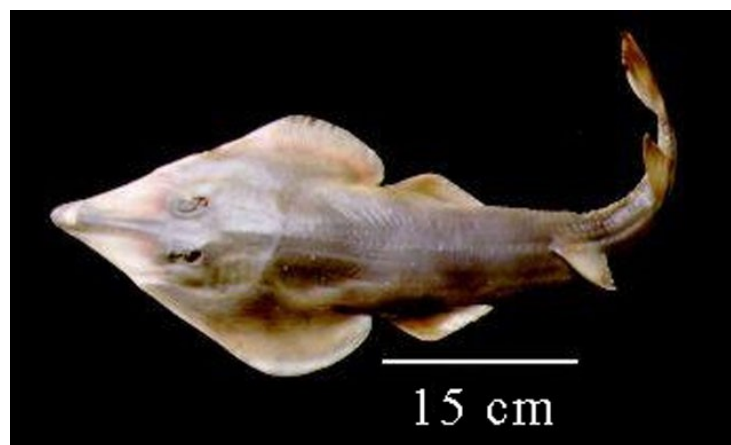


Figura 1. Exemplar da espécie *Rhinobatos percellens*.

Extração de DNA e isolamento dos Microsatélites

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular ou epitélio branquial, utilizando o protocolo de fenol/clorofórmio segundo Sambrook e Russel (2001). Após a extração foi construída uma biblioteca enriquecida em microsatélites segundo Billote *et al* (1999). Para isso foi feita uma reação de digestão enzimática do DNA genômico com a enzima *RsaI*, sendo posteriormente ligados adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição e realizada uma pré-amplificação dos fragmentos de DNA via PCR, utilizando Rsa21 como *primer*. A PCR foi realizada utilizando-se um programa de 95°C por 4 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 8 minutos.

Após a pré-amplificação, os produtos obtidos foram purificados com o Kit *Quiaquick PCR purification* (QIAGEN). Posteriormente foi realizada uma seleção de fragmentos contendo microsatélites através das *beads* e purificação do DNA. O produto resultante da seleção de fragmentos foi amplificado para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade e essa amplificação foi realizada utilizando-se o *primer* Rsa21 em um programa a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos foram clonados com vetor pGEM-T (Promega) e transformadas em *E. coli* XL1-Blue e, após a transformação, os clones obtidos foram estocados e mantidos em freezer -70°C. Os clones positivos foram isolados do DNA plasmidial e posteriormente foi realizada uma PCR de sequenciamento utilizando Big Dye com ciclos de 96°C por 2 minutos, seguido de 26 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas, a fim de se buscar regiões de microsatélite. Depois da identificação dos microsatélites de interesse, foi utilizado o programa *Primer3* para desenhar os *primers*.

Validação dos primers de microsatélites

Testes para otimização do PCR dos *primers* microsatélites obtidos foram realizados através de alterações nas concentrações de DNA, *primers*, dNTP e também modificando a temperatura de anelamento e o tempo de execução de cada passo da reação de PCR, além das quantidades de produto de PCR a serem aplicadas no gel. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% e a coloração foi feita utilizando-se Nitrato de Prata. Os géis foram fotografados e analisados utilizando o programa Kodak Digital Science.

O tamanho dos fragmentos correspondentes aos alelos foi determinado pela comparação de tamanho com o *ladder* 10pb, utilizando-se o programa *Kodak Digital Science*. Os dados de Heterozigozidade e Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram estimadas através dos softwares *PopGene v3.12* e para se verificar o desequilíbrio de ligação foi usado o programa Genepop (Raymond & Rousset 1995).

Resultados e Discussão

A técnica de obtenção de microssatélites através de bibliotecas enriquecidas foi realizada com o intuito de se obter *primers* de microssatélites para análises populacionais futuras em *Rhinobatos percellens*. Com a aplicação desta técnica foram obtidos 48 clones, que foram seqüenciados para a prospecção de regiões ricas em microssatélites. Dos 48 clones seqüenciados, 13 apresentaram regiões de microssatélites e, a partir destas, 10 *primers* foram desenhados para serem testados nas populações de *Rhinobatos*.

As amostras de raia-viola provenientes do pontal do Paraná, foram identificadas com o uso da técnica de PCR multiplex, conforme De Franco et al. (2010) e as 35 amostras coletas correspondiam à espécie *R. percellens*.

As amostras foram então submetidas a testes com os *primers* desenhados para esta espécie, tendo sido também testados 3 *primers* desenhados para a espécie de tubarão azul, *Prionace glauca*. Dos 10 *primers* de *R. percellens*, 5 apresentaram-se polimórficos (RVA9, RVB12, RVC3, RVC5, RVC7), 2 mostraram-se monomórficos (RVA8 e RVE4) e 3 apresentaram bandas fracas. Todos os *primers* testados de tubarão azul apresentaram-se monomórficos (TB10, TB12 e TB13) (Tabela 1).

Para os *primers* polimórficos foram realizadas análises de equilíbrio de Hardy–Weinberg, sendo que todos os loci estão em equilíbrio, com exceção de RVA9, que apresentou desvio significativo. Este desvio poderia ser determinado pela presença de alelos nulos, pelo próprio sistema de acasalamento da espécie ou devido à existência de endogamia, conforme postulado por Hoarau et al. (2002). O número de alelos de cada locus polimórfico, o seu tamanho, a heterozigosidade observada e esperada e o coeficiente de endogamia (F_{is}) estão apresentados na Tabela 1. Para o teste do coeficiente de endogamia (F_{is}), apenas o locus RVB12 apresentou déficit de heterozigosidade, sendo que os demais loci testados apresentaram um excesso de

heteroziguidade. Foram feitos teste de desequilíbrio de ligação usando o programa Genepop (Raymond & Rousset 1995) e observou-se que ocorreram associações significativas para os locus RVA9-RVB12 e para o locus RVC3-RVC5. Os cinco locus polimórficos apresentaram de 3-6 alelos por locus e uma heteroziguidade esperada média de 0.62.

Muitos estudos mostram que espécies de elasmobrânquios exibem baixa variação genética em estudos com aloenzimas (Smith, 1986; MacDonald, 1988; Lavery & Shaklee, 1989) e com genes mitocondriais (Heist et al., 1995, 1996), possivelmente porque a linhagem dos elasmobrânquios apresenta uma baixa taxa de evolução molecular, quando comparada a outros vertebrados (Martin, 1995, 1999). Os marcadores do tipo microssatélites também vem sendo desenvolvidos em elasmobrânquios a fim de auxiliar nos estudos populacionais e de conservação (Kevin et al. 2007). Os dados existentes na literatura para tubarão-areia (*Carcharhinus plumbeus*) mostram que os microssatélites também ocorrem em uma frequência relativamente baixa nesta espécie, quando comparada aquelas encontradas em peixes teleósteos e mamíferos (Heist & Gold 1999).

Os estudos voltados para a conservação de populações ou espécies de importância econômica ou em risco de extinção fornecem dados que constituem uma base essencial na tomada de medidas de manejo de populações selvagens ou cultivadas (Marques, 2002). O conhecimento de como a variabilidade genética é partilhada entre as populações tem grande importância, não apenas nas áreas de biologia evolutiva e ecologia, como também na biologia da conservação (Balloux & Lugon-Moulin, 2002) e as informações sobre a estrutura de populações podem fornecer valiosas diretrizes para estratégias de conservação e manejo (Eizirik et al., 2001). Entender o processo de fluxo gênico e seus efeitos constitui-se numa informação importante e de interesse para vários campos de pesquisa, incluindo a genética e a ecologia de populações, epidemiologia e conservação biológica. Estimativas confiáveis da diferenciação populacional são

primordiais na biologia da conservação, onde se considera continuamente necessário entender se as populações são geneticamente isoladas de outras ou se constituem uma única população panmítica (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). O conhecimento da estrutura das populações pode fornecer valiosa contribuição, no sentido de permitir o delineamento de diretrizes para o estabelecimento de estratégias de conservação e manejo para as espécies.

Desta forma, os marcadores moleculares do tipo microsatélites desenvolvidos no presente trabalho poderão ser utilizados em análises populacionais para a espécie *Rhinobatos percellens*, a fim de se conhecer sua estruturação genética e se constituir numa importante ferramenta para o estabelecimento de programas de conservação e manejo biológico desta espécie.

Referências Bibliográficas

Balloux, F & Lugon-Moulin, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. v.11, p.155-165. 2002.

Bigelow, H.B. e Schroeder, W.C. Fishes of the western north atlantic. Part 2. Sawfishes, guitarfishes, skates and rays. Yale University. New Haven. Connecticut. 1953.

Billote N, Lagoda PJJ, Risterucci AM, Baurens FC. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*. v.54, p.277–288. 1999.

Bonfil, R. 1994. Overview of world elasmobranch fisheries. FAO Fisheries Technical Paper, 341. 119 pp.

Camhi, M. S. Fowler, J. Musick, A. Bräutigam, and S. Fordham. 1998. Sharks and their relatives. Ecology and Conservation. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission 20.

Castro, R.M.C., Arcifa, M.S.. Comunidades de peixes de reservatório no sul do Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, v.47, p.493-500, 1987.

Chambers, G.K. & E.S. MacAvoy. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, v.126, p.455–476. 2000.

Compagno, L.G.V. Shark exploitation and conservation. In: Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries H.L. Pratt Jr., S. H. Gruber and T. Taniuchi, eds.. NOAA Tech. Rep. NMFS v.90, p.391-414. 1990.

Compagno, L.J.V. Checklist of living elasmobranchs. In: Hamlett, W.C., editor. Sharks, skates and rays: the biology of elasmobranch fishes. Baltimore, Johns Hopkins Univ. Press. p.471-498. 1999b.

Compagno, L.J.V. et al. A field guide to sharks of the world. Collins, London. p. 368. 2005.

De-Franco et al. Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelli*, *R. percellens* and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p.197-199, 2010.

DeWoody, J. A. & Avise, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* v.56, p.461-473. 2000.

Ebert, D. A., Compagno, L. J. V., and Cowley, P. D. 2008. Aspects of the reproductive biology of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei) from southern Africa. – *ICES Journal of Marine Science*, v.65, p.81–102.

Ebert, D.A.; Compagno, L.J.V. Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environ. Biol. Fish.*, v.80, p.111-124, 2007.

Eizirik, E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*. v.10, p.65-79. 2001.

Figueiredo, J. L. Manual dos peixes marinhos do Sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações e raias e quimeras. Museu de Zoologia, Univ. de São Paulo, São Paulo, 104 p. 1977.

Fillatre, E, K.; Etherton, P.; Heath, D.D Bimodal run distribution in a northern population of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*): life history and genetic analysis on temporal scale. *Molecular Ecology* 12, p. 1793-1805, 2003.

Heist, E.J. & Gold, J.R. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, v.1, p.182–186. 1999.

Hoarau, G. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the Flatfish *Platichthys flesus*. *Molecular Biology and Evolution*. v.19, p. 2261-2264. 2002.

Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* v.11, p.424-429. 1996.

Knapik, E.W. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish. *Nat. Genet.* v.18, p.338-343. 1998.

Koskinen, M.T. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Thymallus spp.* (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the world's oldest body of fresh water, Lake Baikal. *Molecular Ecology.* v.11, p.2599-2611. 2002.

Last, P.R. & Stevens, J.D. 1994. *Sharks and Rays of Australia*. CSIRO, 513 p. 84 pl

Lavery S, Shaklee JB. Population genetics of two tropical sharks, *Carcharhinus tilstoni* and *C. sorrah*, in Northern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, v.40, p.541–547. 1989.

MacDonald, C.M. Genetic variation, breeding structure and taxonomic status of the gummy shark, *Mustelus antarcticus* in southern Australia waters. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, v.39, p.641–648. 1988.

Maes, C et al. Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest.* v.116, p.1230-1242. 2006.

Mariguela TC, De-Franco B, Almeida TVV, Mendonça FF, Gadig OBF, Foresti F, Oliveira O (2009) Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. *Conservation Genet Resour* 1:393-396.

Martin, A.P. Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: rates, patterns, and phylogenetic inferences. *Mol. Biol. Evol.* v.12, p.1114-1123. 1995. Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: Implicating metabolic rate (again). *Ibid.* v.16, p.996-1002. 1999

Menezes, N.A., Buckup, P.A., Figueiredo, J.L. & Moura, R.L. (eds) (2003) *Catálogo das Espécies de Peixes Marinhos do Brasil*. Museu de Zoologia da

Universidade de São Paulo, São Paulo.

Miranda, L. V., and Vooren, C. M. Captura e esforço da pesca de elasmobrânquios demersais no sul do Brasil nos anos de 1975 a 1997. *Frente Marítimo*, v.19, p.217–231. 2003.

Musick, J.A. et al. Marine, estuarine and diadromous fish stocks at risk of extinction in North America. *Fisheries*. v.25, p.6-30. 2000.

Neraas LP, Spruell P. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, v.10, p.1153–1164. 2001.

Raymond & Rousset, J.H. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. v.86, p.248-249. 1995.

Sambrook, J.; Russel, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Schuler, G.D. et al. Entrez: molecular biology database and retrieval system. *Methods Enzymol*. v.266. p.141-162. 1996.

Smith, M. Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv Hum Genet*. v.15, p.249-290. 1986.

Waters, J.M. Molecular phylogenetics and biogeography of Galaxiid fishes (Osteichthyes: Galaxiidae): Dispersal, vicariance and the position of *Lepidogalaxias salamandroides*. *Systematic Biology*. v.49, p. 777-795. 2000.

Tabela 1. Síntese estatística para os locus de microsatélites amplificados a partir de amostras de raia-viola *Rhinobatos percellens*, coletadas no Pontal do Paraná, PR. T - temperatura de anelamento; n - tamanho da amostra; A - número de alelos; H_O - heterozigosidade observada; H_E - heterozigosidade esperada; EHW - Hardy-Weinberg.