

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2023.



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Dissertação de mestrado

**Identificação molecular de tubarões e raias da costa brasileira: uso do DNA
Barcode na conservação de recursos genéticos**

Giovana da Silva Ribeiro

Botucatu, SP
2022



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

**Laboratório de Biologia e Genética de
Peixes**

Dissertação de mestrado

**Identificação molecular de tubarões e raias da costa brasileira: uso do DNA
Barcode na conservação de recursos genéticos**

Aluna: Giovana da Silva Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientadora: Dra. Vanessa Paes da Cruz

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

Botucatu, SP
2022

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

Ribeiro, Giovana da Silva.

Identificação molecular de tubarões e raias da costa brasileira : uso do DNA Barcode na conservação de recursos genéticos / Giovana da Silva Ribeiro. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Vanessa Paes da Cruz

Capes: 20400004

1. Tubarão (Peixe). 2. Rajidae. 3. Elasmobrânquios.
4. Biodiversidade - Conservação.

Palavras-chave: Biodiversidade; COI; Elasmobrânquios;
Raias.

Dedico a todos que são resistência e mantêm-se desenvolvendo educação e ciência no Brasil.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, especialmente a minha mãe e a minha vó, que sempre me apoiaram, me deram forças e me mantiverem firme no caminho, sem vocês ao meu lado eu não teria concluído nem o primeiro semestre da Biologia, então dedico a vocês essa conquista.

Ao meu orientador, Professor Fausto, pela confiança e suporte desde o princípio, por todos os ricos ensinamentos e pelos conselhos que serão levados para a vida. Muito obrigada por tê-lo presente na minha jornada científica e por todo o carinho depositado. Seus ensinamentos sempre serão eternos.

Ao professor Claudio, que se mostra paciente a todos e se faz sempre presente a todo momento, sempre agregando seu conhecimento, independentemente do tamanho da nossa dúvida (ou desespero). A você, o meu também muito obrigada por fazer parte da minha jornada científica.

À minha coorientadora e também amiga, Vanessa, pela infinita disponibilidade (inclusive desculpa pelas mensagens fora de horas), por todo tempo desprendido, por todos os momentos até aqui, de aprendizados e muitos ensinamentos, agradeço por me estimular e ser um exemplo de como ser uma cientista.

Aos companheiros do LBGP, especialmente aos amigos que me fortaleceram, me empurraram, me levantaram todas as vezes que precisei, Ailton, Bia B., Bia D., Fabi, Gabi, Mari, Najila, aos meus amigos do “eterno equipe dos IC’s” Bruno e Plablito, as minhas amigas do “Mi Jay e amigas”, AnaJu, Naná e a parceirinha Sil, que estiveram comigo a todo tempo, a minha amiga que através dos anos se tornou a minha irmã May e ao meu amigo da vida inteira Ri.

Por fim, agradeço aos funcionários da Unesp Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica (Zoologia) da UNESP de Botucatu, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES -processo 8887.372078/2019-00) pela bolsa de estudo concedida, assim tornando possível a realização do meu mestrado.

Resumo

Os tubarões e raias, organismos que compõem a infraclasse Elasmobranchii, são peixes cartilagosos que são representados no Brasil por 163 espécies descritas. Geralmente são caracterizados por apresentarem particularidades biológicas como crescimento lento, maturidade tardia e baixa fecundidade, tornando essas espécies sensíveis a efeitos antrópicos. Aproximadamente 32,5% dessas espécies estão sob ameaça e isto ocorre principalmente devido a fatores como perda de habitat e sobrepesca. Algumas espécies de tubarões e raias se enquadram em um grupo biológico de difícil identificação taxonômica, principalmente envolvendo espécies congêneres que podem apresentar características morfológicas similares e com isso, apresentam inconsistências na identificação. O uso da ferramenta molecular de análise pelo DNA *Barcode* possibilitou a construção de um banco de dados, gerando um sistema global para a bioidentificação das espécies. Considerando o déficit de dados genéticos e de informações sobre a biodiversidade dos Elasmobranchii encontrados na costa do Brasil, o presente estudo teve como objetivo principal a identificação molecular dos integrantes deste grupo. Foram utilizadas 240 amostras de tubarões e raias coletados em diferentes localidades da costa brasileira que se encontram depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Os resultados das análises utilizando o gene mitocondrial COI, permitiram a identificação molecular de representantes de 20 espécies de tubarões pertencentes às famílias Carcharhinidae (n = 51), Sphyrnidae (n = 11), Squalidae (n = 44), e Squatinidae (n = 1); e mais 10 espécies de raias pertencentes às famílias Aetobatidae (n = 3), Dasyatidae (n = 45), Gymnuridae (n = 3), Mobulidae (n = 1), Rhinopteridae (n = 32), Arhynchobatidae (n = 1), Rhinobatidae (n = 18). As análises realizadas permitiram determinar as distâncias interespecíficas entre tubarões, com valores de 3,7% entre as espécies *Carcharhinus brevipinna* e *Carcharhinus obscurus* e também entre *Centrophorus granulosus* e *Centrophorus squamosus*, com a maior distância de 29,8% observada entre *C. squamosus* e *Isurus oxyrinchus*. Os valores de distâncias genéticas intraespecíficas variaram entre 0 a 0,90%, sendo que o maior valor encontrado para a espécie *I. oxyrinchus*. Entre as raias, as distâncias genéticas interespecíficas variaram de 5,4% entre as espécies *Fontitrygon geijskesi* e *Hypanus guttatus* a 28,3% entre *Pseudobatos horkelii* e *Aetobatus narinari*, enquanto as distâncias genéticas intraespecíficas revelaram valores entre 0,10% para *Atlantoraja castelnaui* e *Hypanus guttatus* e o maior valor encontrado foi de 0,80% para a espécie *Dasyatis* sp. Entre todas as 30 espécies de tubarões e raias analisadas verificou-se que 22 estão inseridas em alguma classificação de ameaça segundo a Lista Vermelha de animais ameaçados da IUCN, sendo cinco classificadas no item “vulnerável”, 11 classificadas “em perigo” e seis como “criticamente ameaçadas”. Dado que as sequências de DNA *Barcode* obtidas serão disponibilizadas no banco de dados genômicos após a finalização do presente trabalho, considera-se que as informações aqui apresentadas poderão oferecer suporte confiável para futuras pesquisas populacionais e elaboração de estratégias de conservação nesse importante grupo de organismos.

Abstract

Sharks and rays, organisms whom compose the Elasmobranchii infraclass, are cartilaginous fish that are represented in Brazil by 163 described species. They are usually characterized by presenting biological peculiarities such as slow growth, late maturity and low fecundity, making these species sensitive to anthropic effects. Approximately 32.5% of these species are under threatened and this is mainly due to factors such as habitat loss and overfishing. Some species of sharks and rays fall within a biological group of difficult taxonomic identification, mainly involving congeners species that may present similar morphological characteristics and, therefore, present inconsistencies in the identification. The use of the molecular analysis tool by DNA Barcode enabled the construction of a database, generating a global system for the bioidentification of species. Considering the deficit of genetic data and information about the biodiversity of Elasmobranchii found off the coast of Brazil, the present study has as its main objective the molecular identification of the members of this group. We used 240 samples of sharks and rays collected in different locations along the Brazilian coast, which are deposited in the collection of the Laboratory of Biology and Genetics of Fish. The analysis results, using the mitochondrial gene COI, allowed the molecular identification of representatives of 20 species of sharks belonging to the families Carcharhinidae (n = 51), Sphyrnidae (n = 11), Squalidae (n = 44), and Squatinidae (n = 1); and 10 more species of rays belonging to the families Aetobatidae (n = 3), Dasyatidae (n = 45), Gymnuridae (n = 3), Mobulidae (n = 1), Rhinopteridae (n = 32), Arhynchobatidae (n = 1), Rhinobatidae (n = 18). The analyzes performed allowed us to determine the interspecific distances between sharks, with values of 3.7% between the species *Carcharhinus brevipinna* and *Carcharhinus obscurus* and also between *Centrophorus granulosus* and *Centrophorus squamosus*, with the greatest distance of 29.8% observed between *C. squamosus* and *Isurus oxyrinchus*. The values of intraspecific genetic distances ranged from 0 to 0.90%, with the highest value found for the species *I. oxyrinchus*. Among rays, interspecific genetic distances ranged from 5.4% between *Fontitrygon geijskesi* and *Hypanus guttatus* to 28.3% between *Pseudobatos horkelii* and *Aetobatus narinari*, while intraspecific genetic distances revealed values between 0.10% for *Atlantoraja castelnaui* and *Hypanus guttatus* and the highest value found was 0.80% for the species *Dasyatis* sp. Among all 30 species of sharks and rays analyzed, it was found that 22 are included in some threat classification according to the IUCN Red List of Threatened Animals, with five classified as “vulnerable”, 11 classified as “endangered” and six as endangered. “critically endangered”. Given that the DNA Barcode sequences obtained will be made available in the genomic database after the completion of the present work, it is considered that the information presented here can provide reliable support for future population research and the elaboration of conservation strategies in this important group of organisms.

Sumário

1 Introdução.....	9
Elasmobrânquios	9
Biodiversidade	10
DNA Barcode.....	11
2 Objetivos.....	13
3 Material e métodos	14
Obtenção das amostras	14
Extração do DNA, amplificação do gene COI e sequenciamento	14
Análise de dados.....	15
4 Resultados.....	16
Tubarões	17
Raias.....	21
5 Discussão.....	24
6 Referências.....	27

6 Referências

- Barley, A. J., White, J., Diesmos, A. C., & Brown, R. M. (2013). The challenge of species delimitation at the extremes: diversification without morphological change in Philippine sun skinks. *Evolution*, 67(12), 3556-3572.
- Bonnaterre, P. J. (1788). *Tableau encyclopédique et méthodique des trois règnes de la nature...: Ichthyologie*. chez Panckoucke libraire.
- Brasil, M. (2000). A Convenção sobre diversidade biológica–CDB. Cópia do Decreto Legislativo, (2), 30.
- Buerki, S., & Baker, W. J. (2016). Collections-based research in the genomic era. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(1), 5-10.
- Cerqueira, N. N. C. D. (2018). Análise comparativa da composição genética de exemplares da fauna de peixes marinho-estuarinos encontrados na costa do Brasil.
- Costa, F. O., & Antunes, P. M. (2012). The contribution of the Barcode of Life initiative to the discovery and monitoring of Biodiversity. In *Natural resources, sustainability and humanity* (pp. 37-68). Springer, Dordrecht.
- do Meio Ambiente, M. M. (2016). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: MMA.
- 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.
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., ... & 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., Musick, J. A., Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., ... & White, W. T. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *elife*, 3, e00590.
- Dulvy, N. K., Simpfendorfer, C. A., Davidson, L. N., Fordham, S. V., Bräutigam, A., Sant, G., & Welch, D. J. (2017). Challenges and priorities in shark and ray conservation. *Current Biology*, 27(11), R565-R572.
- Dulvy, N. K., Pacoureau, N., Rigby, C. L., Pollom, R. A., Jabado, R. W., Ebert, D. A., ... & Simpfendorfer, C. A. (2021). Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. *Current Biology*, 31(21), 4773-4787.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.
- Ferrari, A., Di Crescenzo, S., Cariani, A., Crobe, V., Benvenuto, A., Piattoni, F., ... & Tinti, F. (2021). Puzzling over spurdogs: molecular taxonomy assessment of the *Squalus* species in the Strait of Sicily. *The European Zoological Journal*, 88(1), 181-190.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
- Hebert, P. D., DeWaard, J. R., Zakharov, E. V., Prosser, S. W., Sones, J. E., McKeown, J. T., ... & La Salle, J. (2013). A DNA 'Barcode Blitz': Rapid digitization and sequencing of a natural history collection. *PloS one*, 8(7), e68535.
- Henderson, A. C. (2020). A review of potential taxonomic barriers to the effective management of Gulf elasmobranch fisheries. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 23(2), 210-219.
- Hoban, S., Bruford, M., Jackson, J. D. U., Lopes-Fernandes, M., Heuertz, M., Hohenlohe, P. A., ... & Laikre, L. (2020). Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biological Conservation*, 248, 108654.
- Hobern, D. (2021). BIOSCAN: DNA barcoding to accelerate taxonomy and biogeography for conservation and sustainability. *Genome*, 64(3), 161-164.
- Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular ecology notes*, 6(4), 998-1002.
- Hozbor, N., Massa, A., Vooren, C. M., & IUCN 2006. (2004). *Atlantoraja castelnaui*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.

- Magris, R. A., Costa, M. D., Ferreira, C. E., Vilar, C. C., Joyeux, J. C., Creed, J. C., ... & Floeter, S. R. (2021). A blueprint for securing Brazil's marine biodiversity and supporting the achievement of global conservation goals. *Diversity and Distributions*, 27(2), 198-215.
- Marceniuk, A. P., Barthem, R. B., Wosiacki, W. B., de Macedo Klautau, A. G. C., Junior, T. V., Rotundo, M. M., ... & Viana, S. T. (2019). Sharks and batoids (Subclass Elasmobranchii) caught in the industrial fisheries off the Brazilian North coast. *Revista Nordestina de Biologia*, 27(1).
- McClenachan, L., Cooper, A. B., & Dulvy, N. K. (2016). Rethinking trade-driven extinction risk in marine and terrestrial megafauna. *Current Biology*, 26(12), 1640-1646.
- de Miranda, L. V., & Vooren, C. M. (2003). CAPTURA E ESFORÇO DA PESCA DE ELASMOBRANQUIOS DEMERSAIS NO SUL. *Frente marítimo*, 19, 217.
- Nash, W. G., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., Menninger, J. C., & O'Brien, S. J. (1998). Comparative genomics: tracking chromosome evolution in the family Ursidae using reciprocal chromosome painting. *Cytogenetic and Genome Research*, 83(3-4), 182-192.
- Pacoureau, N., Rigby, C. L., Kyne, P. M., Sherley, R. B., Winker, H., Carlson, J. K., ... & Dulvy, N. K. (2021). Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. *Nature*, 589(7843), 567-571.
- Pyke, G. H., & Ehrlich, P. R. (2010). Biological collections and ecological/environmental research: a review, some observations and a look to the future. *Biological reviews*, 85(2), 247-266.
- Rainbow, P. S. (2009). Marine biological collections in the 21st century. *Zoologica Scripta*, 38, 33-40.
- Ramirez, J. L., Rosas-Puchuri, U., Cañedo, R. M., Alfaro-Shigueto, J., Ayon, P., Zelada-Mázmela, E., ... & Velez-Zuazo, X. (2020). DNA barcoding in the Southeast Pacific marine realm: Low coverage and geographic representation despite high diversity. *PloS one*, 15(12), e0244323.
- Rezende, C. L., Scarano, F. R., Assad, E. D., Joly, C. A., Metzger, J. P., Strassburg, B. B. N., ... & Mittermeier, R. A. (2018). From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in ecology and conservation*, 16(4), 208-214.
- Rosa, R. S., & Gadig, O. B. F. (2014). Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. *Arquivos de Zoologia*, 45, 89-104.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- de Oliveira Soares, M., da Cruz Lotufo, T. M., Vieira, L. M., Salani, S., Hajdu, E., Matthews-Cascon, H., ... & Kikuchi, P. (2016). Brazilian marine animal forests: a new world to discover in the southwestern Atlantic. *Marine Animal Forests*. Springer International Publishing, Cham.

- Stein, R. W., Mull, C. G., Kuhn, T. S., Aschliman, N. C., Davidson, L. N., Joy, J. B., ... & Mooers, A. O. (2018). Global priorities for conserving the evolutionary history of sharks, rays and chimaeras. *Nature ecology & evolution*, 2(2), 288-298.
- 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.
- Stoeckle, M. Y., & Hebert, P. D. (2008). Barcode of life. *Scientific American*, 299(4), 82-89.
- van Velzen, R., Weitschek, E., Felici, G., & Bakker, F. T. (2012). DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PloS one*, 7(1), e30490.
- Tebet, G., Trimble, M., & Medeiros, R. P. (2018). Using Ostrom's principles to assess institutional dynamics of conservation: Lessons from a marine protected area in Brazil. *Marine Policy*, 88, 174-181.
- Vella, A., Vella, N., & Schembri, S. (2017). A molecular approach towards taxonomic identification of elasmobranch species from Maltese fisheries landings. *Marine Genomics*, 36, 17-23.
- Viana, S. D. F., De Carvalho, M. R., & Ebert, D. A. (2017). *Squalus bassi* sp. nov., a new long-snouted spurdog (Chondrichthyes: Squaliformes: Squalidae) from the Agulhas Bank. *Journal of Fish Biology*, 91(4), 1178-1207.
- Viana, S. T., Carvalho, M. D., & Gomes, U. L. (2016). Taxonomy and morphology of species of the genus *Squalus* Linnaeus, 1758 from the Southwestern Atlantic Ocean (Chondrichthyes: Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa*, 4133(1), 1-89.
- Walpole, M. J., Morgan-Davies, M., Milledge, S., Bett, P., & Leader-Williams, N. (2001). Population dynamics and future conservation of a free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) population in Kenya. *Biological Conservation*, 99(2), 237-243.
- 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.
- Wilcox, C., Mann, V., Cannard, T., Ford, J., Hoshino, E., & Pascoe, S. (2021). A review of illegal, unreported and unregulated fishing issues and progress in the Asia-Pacific Fishery Commission region.
- Winter, M., Devictor, V., & Schweiger, O. (2013). Phylogenetic diversity and nature conservation: where are we?. *Trends in ecology & evolution*, 28(4), 199-204.
- Worm, B., Davis, B., Kettner, L., Ward-Paige, C. A., Chapman, D., Heithaus, M. R., ... & Gruber, S. H. (2012). A global blueprint for restoring fisheries and ecosystems. *Nature*, 485(7396), 171-176.

S. H. (2013). Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy*, 40, 194-204.

Zaher, H., & Young, P. S. (2003). As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. *Ciência e Cultura*, 55(3), 24-26.