



**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 hora rs), 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

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



## 1 Introdução

### *Elasmobrânquios*

A classe Chondrichthyes, caracterizada por peixes com esqueleto cartilaginoso, se subdivide em duas subclasses: Holocephali, que compreende as quimeras; e Euselachii, a qual contém a infraclasse Elasmobranchii, que é um importante e diversificado grupo biológico que compreende os tubarões e raias, representando um dos grupos mais ameaçados de extinção entre os vertebrados (Stevens, 2000). Estas ameaças são causadas pela associação de vários fatores, em decorrência principalmente de ações antrópicas, como degradação de habitat e efeitos da sobrepesca, além disso, estes organismos apresentam características biológicas únicas, como K estrategistas, apresentando crescimento lento, maturidade sexual tardia e baixa fecundidade, o que os tornam mais suscetíveis a impactos ambientais que levam à possíveis eventos de extinção (Dulvy et al. 2021).

Segundo Dulvy et al. (2021), 1199 espécies de tubarões e raias estão atualmente relacionadas na Lista Vermelha da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), dentre elas, 391 estão em categorias que representam diferentes graus de ameaça. A sobrepesca tem levado um terço dessas espécies a uma crise de extinção global, com 32,6% das espécies ameaçadas, seguida por outras causas como a perda e degradação de habitat (31,2%), mudanças climáticas (10,2%) e poluição (6,9%) (Dulvy et al. 2021). Tais fatores, de forma independente ou associados, têm levado a fortes declínios e a extinção crescente ao nível de populações, constituindo ameaças significativas para as espécies de tubarões e raias em todos os oceanos (Worm et al. 2013; Dulvy et al. 2017). Muitas espécies poderão desaparecer em algumas décadas, visto que a abundância de tubarões e raias diminuiu cerca de 71% nos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico, a exemplo de *Carcharhinus longimanus*, conhecido como “galha-branca-oceânico”, espécie que apresentou um declínio de 98% em suas populações nos últimos 60 anos (Pacoureau et al. 2021).

Dentre as 163 espécies de Elasmobranchii registradas no Brasil, com 84 de tubarões e 79 de raias, uma parcela significativa está classificada como ameaçada, sendo referidas 28 espécies classificadas como “criticamente ameaçadas”, oito espécies “em perigo”, 19 espécies como “vulneráveis”, além de 13 espécies classificadas como “quase ameaçadas” e duas “regionalmente extintas” (Rosa & Gadig, 2014; ICMBio, 2016). Um dos fatores determinantes para o desaparecimento destas espécies, inclui a alta demanda determinada pelo mercado das barbatanas de tubarões (Wilcox et al. 2021). Por outro lado, as capturas acessórias e o aumento da pesca de tubarões também têm sido determinadas pelo colapso da pesca de outras espécies antes abundantes e lucrativas (Dulvy et al. 2014; McClenachan et al. 2016).

Segundo Henderson et al. (2020), os elasmobrânquios são um grupo

taxonomicamente problemático com relação à sua identidade morfológica, onde a correta identificação a nível de espécie é dificultada ou muitas vezes realizada de modo errôneo por conta da alta sobreposição de características morfológicas, já que a identificação das mesmas se dá muitas vezes através de caracteres limitados ou insuficientes, como ocorre frequentemente entre espécies de tubarões da família Squalidae. Esta família é composta por um total de 60 espécies, cujas descrições originais são pouco informativas em sua maioria, existindo na literatura vários casos de identificação equivocada ou de redescritção das espécies já existente em função de revisões taxonômicas (Viana et al. 2017). Entre os tubarões do gênero *Carcharhinus* existe a problemática de uma prática comum em ser retirada a cabeça e nadadeiras, dificultando a correta identificação das espécies (Dudgeon et al, 2012). Entre as raias do gênero *Rhinoptera*, também a diferenciação e identificação das espécies ainda apresentam incertezas, tendo em vista a alta similaridade entre as espécies (Rosa & Gadig, 2014). Neste contexto, de uma forma geral, a identificação incorreta dessas espécies, tem se tornado um problema crescente, envolvendo aspectos biológicos e de distribuição, mais que isso, têm interferência direta no estabelecimento de programas adequados de conservação e manejo das espécies e das populações.

### *Biodiversidade*

Segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), a biodiversidade se define pela variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo os ecossistemas terrestres, ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte, e ainda, a diversidade dentro de espécies. Assim, apresentando uma referência direta à diversidade genética que é responsável pela variação entre indivíduos, populações e grupos taxonômicos das espécies biológicas. Com relação à biodiversidade terrestre, o Brasil é conhecido como um “*hottest hotspots*”, visto que possui um grande percentual das espécies e também apresenta altos níveis de endemismo (Rezende et al. 2018). Contudo, com relação à diversidade do ambiente marinho, este constitui um aspecto ainda pouco conhecido no país, como conhecer a real biodiversidade e até mesmo as conectividades ecológicas (Tebet et al. 2018; Magris et al. 2021). Neste sentido, intensificar os estudos nesta área pode ser considerado imperativo e urgente, pois mesmo considerando-se a deficiência de conhecimento específico, a porção tropical do Oceano Atlântico na sua porção Sul Ocidental, incluindo a Zona Econômica Exclusiva Brasileira (ZEE), apresenta-se como uma importante e reconhecida região de endemismo, constituindo-se numa das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade marinha no oceano Atlântico (Oliveira et al. 2016).

Os acervos de coleções representam uma herança cultural e aspiram fornecer uma ampla visão da história do descobrimento do território nacional, já que podem ser encontrados representantes de espécies extintas tanto por ações naturais quanto pelas ações antrópicas, fornecendo uma base de dados rica para os estudos de caracterização dos componentes biológicos

e dos possíveis impactos ambientais (Rainbow, 2009; Pyke & Ehrlich, 2010; Hebert et al. 2013). Esses autores também ressaltam que as coleções zoológicas brasileiras proporcionam informações que poderão ser essenciais para importantes descobertas futuras, que no momento ainda estariam fora do atual avanço tecnológico, destacam ainda que, com o advento da revolução das análises moleculares, essas coleções tornaram-se bancos genéticos, suprindo e disponibilizando, assim, a diversidade de material biológico para os estudos moleculares e biotecnologia.

Contudo, são deficientes as condições de disponibilidade de material no que se refere às coleções zoológicas representativas da total biodiversidade do país, uma vez que são relativamente escassos os estudos taxonômicos com componentes dos ambientes marinhos, existindo um déficit importante no conhecimento da diversidade de espécies que existem na costa brasileira (Marceniuk et al. 2019). Assim, visando aumentar o conhecimento sobre a ictiofauna marinha, a criação de um banco de dados de DNA associado às coleções científicas seria de grande valia e interesse, uma vez que tal empreendimento poderia responder questões relacionadas à correta identificação de espécies e de populações isoladas, ou até mesmo desconhecidas (Nash et al. 1998; Walpole et al. 2001). Sendo assim, torna-se grande a necessidade do emprego de técnicas adequadas e resolutivas, que possam proporcionar segurança na identificação correta das espécies (Vella et al. 2017; Cerqueira, 2018; Ferrari et al. 2021).

#### *DNA Barcode*

Na busca por um sistema unificado de identificação molecular das espécies, Hebert et al. (2003a) propuseram o uso de um fragmento de DNA mitocondrial, de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir da extremidade 5' do gene Citocromo c Oxidase subunidade I (COI). Este segmento gênico foi proposto como uma ferramenta molecular denominado *DNA Barcode*, pois as sequências geradas a partir de sua utilização formariam um “código de barras”, considerado um sistema de identificação universal para a grande maioria das espécies animais. A identificação dos organismos efetuada através de um único gene pode proporcionar uma estimativa da composição da diversidade das espécies em um ecossistema (Ramirez et al. 2020). Assim, essa ferramenta se apresenta como uma condição importante para diversas áreas, como na taxonomia, como em biomonitoramento (Hobern, 2021), tanto quando viabiliza a melhoria de pesquisas em conservação, bem como quando proporciona a caracterização e descrição de espécies crípticas (Hebert et al. 2004).

Tal avanço tecnológico determinou a necessidade do estabelecimento de um banco de dados, no qual pudessem ser armazenadas todas as informações geradas sobre as espécies, tanto daquelas com sequências já obtidas, como dos dados das espécies ainda em estudo, num processo cumulativo e estruturado para a realização de comparações. Para isso foi criado o banco de dados *BOLDSystem (Barcode of Life Database)* onde, além das sequências do gene COI das espécies,

também pudessem ser armazenadas informações como fotos dos espécimes, local de coleta (coordenadas), data da coleta e o seu coletor, número de espécimes estudados, instituição na qual a amostra foi depositada, dados taxonômicos, bem como outras informações de ordem molecular, como os *primers* utilizados na amplificação e sequenciamento (Stoeckle & Hebert, 2008).

A eficiência do método utilizando a ferramenta DNA *Barcode* para a identificação de espécies deu origem ao Consórcio para o Código de Barras da Vida, em 2004. O método tem como premissa que todas as espécies apresentam um padrão único de acúmulo de mutações que gera um padrão análogo aos códigos de barras dos produtos. O critério de discriminação das espécies baseia-se no *barcode gap*, em que a variação entre as espécies é bem mais elevada que a variação intraespecífica, devendo ser pelo menos 10 vezes maior (Hebert et al. 2004).

Hoban et al. (2021) discutem que o conhecimento da diversidade genética é o principal componente para futuras ações de conservação, integrando informações sobre as relações genéticas das espécies como um legado para o entendimento da biodiversidade. Além do que as ferramentas genéticas conseguem elucidar processos evolutivos como por exemplo especiação e radiação, em avaliações de conservação (Winter et al. 2013). Tais fatores podem ser considerados principalmente no que se refere às espécies de tubarões e raias (Domingues et al. 2018; Stein et al. 2018). Considera-se, pois, que de forma geral, a identificação das espécies constitui elementos importantes para a compreensão dos processos envolvidos na diversidade biológica (Barley et al. 2013)

## 2 Objetivos

Considerando o déficit de dados genéticos e a falta de informações sobre a biodiversidade dos elasmobrânquios encontrados na costa do Brasil, o presente estudo teve como objetivo principal reduzir a lacuna de informação para esse importante grupo taxonômico realizando a identificação molecular de espécies de tubarões e raias de ocorrência neste ambiente, de modo a gerar e disponibilizar os dados das sequências de DNA *Barcode* em banco de dados genéticos, dando assim, suporte a futuras pesquisas.

De modo específico pretende-se:

- ✓ realizar a identificação molecular em amostras dos vouchers depositados da coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes com o uso da técnica de sequenciamento do gene citocromo c oxidase subunidade 1 (COI).

### 3 Material e métodos

#### *Obtenção das amostras*

Amostras de tecido de tubarões e raias foram previamente coletadas em diferentes localidades ao longo da costa brasileira, totalizando material biológico de 240 exemplares, identificadas previamente como pertencentes às famílias de tubarões Carcharhinidae, Sphyrnidae, Squalidae, Triakidae, Lamnidae, Centrophoridae e Squatinidae e às famílias de raias Aetobatidae, Dasyatidae, Gymnuridae, Mobulidae, Rhinopteridae, Arhynchobatidae, Rhinobatidae. Estas amostras constituem parte do acervo depositado no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), do Instituto de Biociências da UNESP, em Botucatu (SP), credenciado no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositário de Amostras do Patrimônio Genético. No decorrer do trabalho, as amostras de todos os animais catalogados foram identificadas geneticamente, com o uso de marcadores moleculares.

#### *Extração do DNA, amplificação do gene COI e sequenciamento*

O DNA total foi extraído de fragmentos de tecidos dos exemplares preservados em etanol 95%, de acordo com o protocolo de Ivanova et al. (2006). A partir do DNA extraído das amostras, foram obtidas sequências parciais da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) com aproximadamente 650 pares de base (pb), correspondentes à região do DNA *Barcode*. As sequências foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os conjuntos de *primers* FishF1/FishR1 e FishF2/FishR2, descritos por Ward et al. (2005).

As reações de PCR foram realizadas para um mix de volume final de 12,5 µL, utilizando 8,77 µL de água ultra pura (milli-Q); 1,25 µL de tampão para PCR 10X; 0,37µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,5 µL de dNTPs (2 mM); 0,25 µL (10 mM) de cada primer; 0,1 µL de Taq DNA polimerase PHT (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Brasil; 5 U/µl) e 1 µL de DNA (50ng a 100ng). A amplificação do gene COI foi realizada com 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 68°C por 1 minuto e 1 ciclo final de 68°C por 7 minutos.

Todos os produtos de PCR foram primeiramente visualizados em gel de agarose a 1% para verificação da amplificação positiva, e então realizada uma reação de sequenciamento com a aplicação do kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems). O produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação em EDTA/Acetato de sódio/etanol e analisado em sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3130-*Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

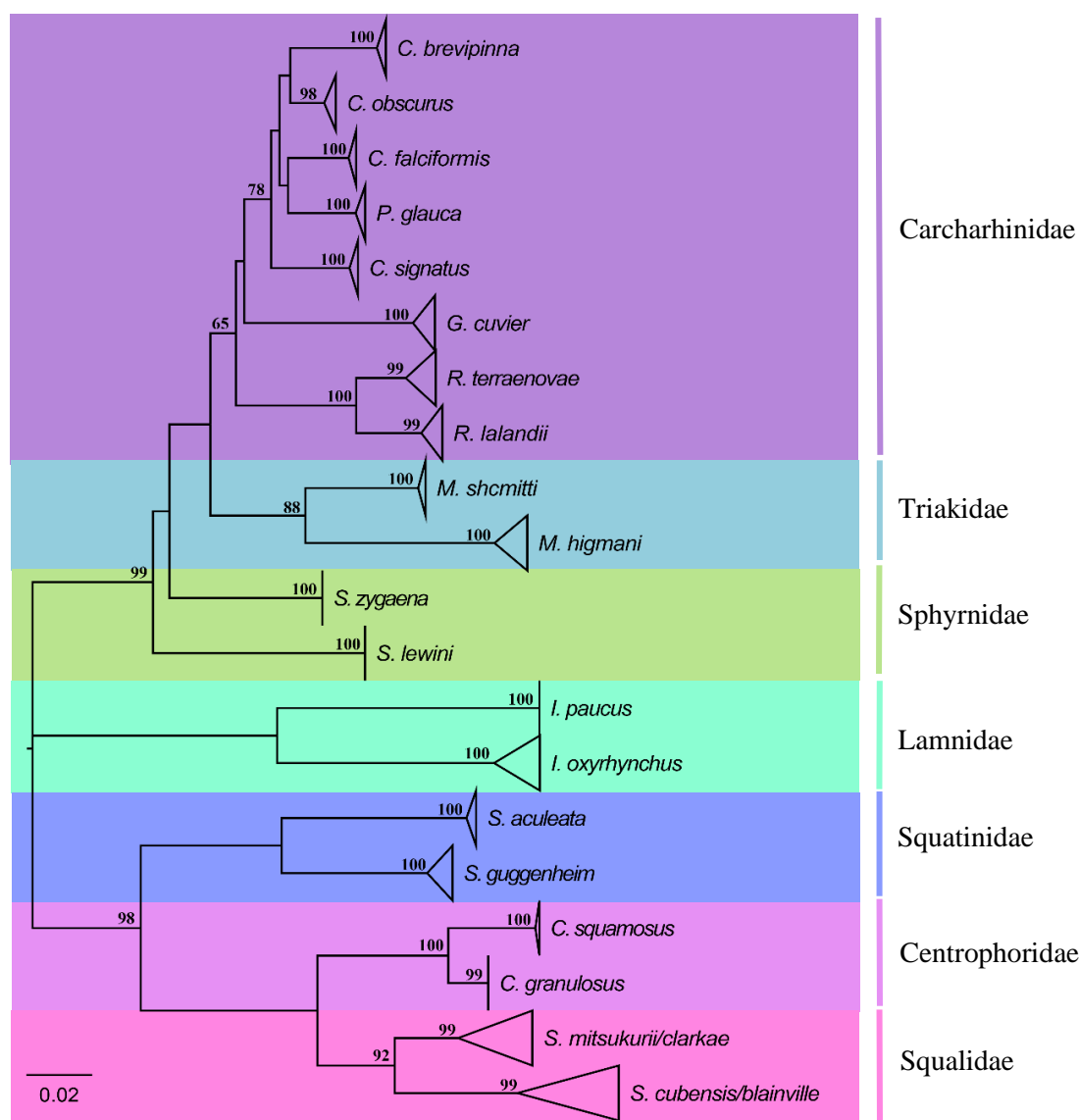
### *Análise de dados*

As sequências foram editadas e conferidas para a checagem da existência de *stop-codons* nos fragmentos codificantes com o auxílio do *software GENEIOUS* v. 4.8.5 (Kearse et al. 2012). O alinhamento foi executado pelo algoritmo *MUSCLE* (Edgar, 2004). Para identificação dos espécimes, foi utilizada a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no site (<https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e só foram aceitas as identificações que apresentaram o valor igual ou maior que 98% de similaridade. Foram verificadas as distâncias inter e intraespecífica nas espécies utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no *software* MEGA X (Kumar et al. 2018). Para uma melhor visualização das relações de distância dos espécimes analisados, com as matrizes das sequências alinhadas foi elaborada uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) utilizando o programa MEGA X (Kumar et al. 2018). Para construção da árvore foi utilizado o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) e a confiabilidade dos ramos foi verificada pelo método *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 pseudoréplicas e para uma maior compreensão e robustez dos dados, foram acrescentadas sequências as análises, de bancos de dados genéticos (*GenBank*) das espécies analisadas.

## 4 Resultados

Um total de 240 sequências foram obtidas a partir dos espécimes de tubarões e raias depositados no acervo da coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP). As sequências foram agrupadas e analisadas por grupos de espécies de tubarões (tabela 1), e em um outro conjunto de dados as espécies de raias (tabela 3), no geral foi obtido uma variação de número amostral entre um a 43 indivíduos por espécie.

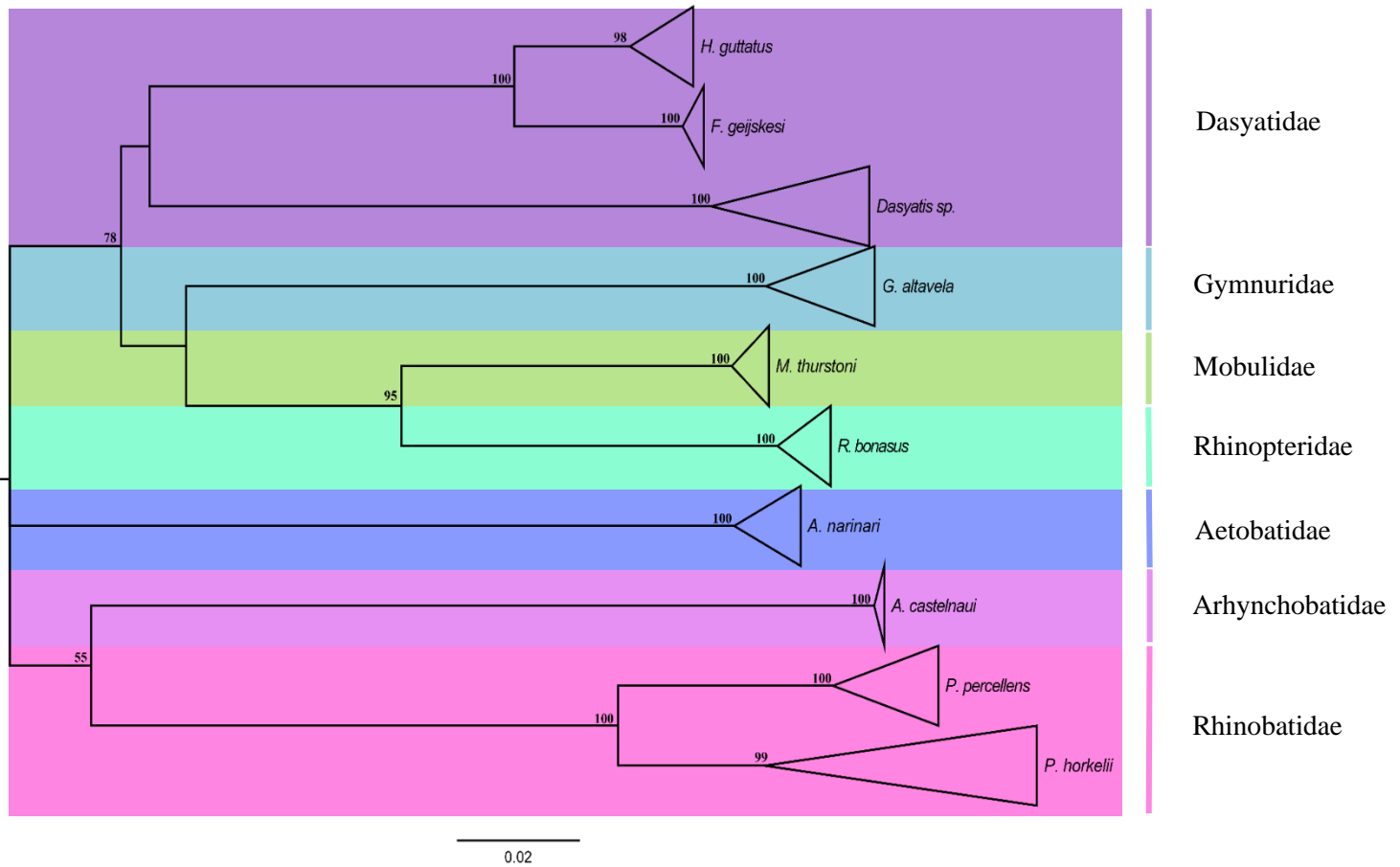
A matriz consenso obtida para os tubarões consistiu em 610 pb, possibilitando a identificação de quatro ordens de tubarões (Carcharhiniformes, Lamniformes, Squaliformes, Squatiniformes), de sete famílias (Carcharhinidae, Centrophoridae, Lamnidae, Triakidae, Sphyrnidae, Squalidae e Squatinidae), e de 10 gêneros, totalizando 20 espécies identificadas (Figura 1).



**Figura 1.** Árvore de *Neighbor-joining*, segundo o modelo K2P, representando 450 espécimes de tubarões com os valores de *bootstrap*, com 1000 pseudoréplicas. As cores estão representando o agrupamento das espécies dentro de cada família



Para as espécies de raias, as análises de identificação foram baseadas em uma matriz consenso de 605 pb, permitindo a identificação de três ordens (Myliobatiformes, Rajiformes e Rhinopristiformes), de sete famílias (Aetobatidae, Dasyatidae, Gymnuridae, Mobulidae, Rhinopteridae, Arhynchobatidae e Rhinobatidae), nove gêneros, totalizando 10 espécies (Figura 2). Os resultados evidenciados representam cerca de 18% das 163 espécies de elasmobrânquios que ocorrem no litoral brasileiro.



**Figura 2.** Árvore de *Neighbor-joining*, segundo o modelo K2P, representando 183 espécimes de raias com os valores de *bootstrap*, com 1000 pseudoréplicas. As cores estão representando o agrupamento das espécies dentro de cada família

### Tubarões

Um total de 233 espécimes foram utilizados nas análises das espécies pertencem à família Carcharhinidae, sendo que 51 amostras corresponderam a materiais existentes na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e 182 foram provenientes do banco de dados *BOLDSsystem*. As comparações realizadas resultaram na identificação de componentes de quatro gêneros, sendo *Carcharhinus*, *Galeocerdo*, *Prionace* e *Rhizoprionodon*, que foram representados por oito espécies, *C. brevipinna*, *C. falciformis*, *C. obscurus*, *C. signatus*, *G. cuvier*, *P. glauca*, *R. lalandii* e *R. terranova*.

A família Sphyrnidae foi identificada em 30 amostras analisadas, sendo 11 provenientes de material biológico depositado na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e 19 do banco de dados *BOLDsystem*. Foram identificadas duas espécies pertencentes ao mesmo gênero, *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zigaena*.

A análise das amostras dos tubarões da família Triakidae envolveu dados de 40 espécimes, sendo todos componentes do gênero *Mustelus* e destes, 27 eram componentes do acervo do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e 13 do banco de dados *BOLDsystem*. Entre as amostras dos exemplares analisados dessa família foram identificadas 2 espécies, *Mustelus higmani* e *Mustelus schmitti*.

Entre as 25 amostras da família Lamnidae foram identificadas duas espécies pertencentes ao gênero *Isurus*. Foram detectadas 16 sequências de *I. oxyrinchus*, uma do acervo genético do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, com 100% de identidade pelo *BLAST* e 15 do banco de dados *BOLDsystem*. A espécie *I. paucus* foi identificada em nove sequências analisadas, todas provenientes do banco de dados *BOLDsystem*.

As análises na família Centrophoridae envolveram o total de 13 sequências provenientes de duas espécies do gênero *Centrophorus*, sendo obtidas oito sequências de *C. squamosus*, uma a partir de amostra do acervo genético do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, com 100% de identidade pelo *BLAST* e sete provenientes do banco de dados *BOLDsystem*. De *C. granulosus* foram analisadas cinco sequências, todas provenientes do banco de dados *BOLDsystem*.

As amostras da família Squalidae aqui analisadas permitiram utilizar o total de 64 sequências, sendo que 40 foram obtidas a partir de material biológico componente do acervo do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e 24 do banco de dados *BOLDsystem*. Foram identificadas quatro espécies, *Squalus cubensis*, *Squalus blainville*, *Squalus clarkae* e *Squalus mitsukurii*. Os valores de similaridade resultantes da aplicação do *software BLAST* (NCBI) divergiram com uma combinação mínima *percent identity* de 99,6% em *Squalus cubensis* e apresentaram 100% de similaridade para *query cover* em todas as sequências analisadas.

A família Squatinidae possui apenas um gênero, o gênero *Squatina* e nesse grupo foram estudadas 25 sequências de duas espécies, sendo uma sequência de *Squatina guggenheim*, identificada a partir do *BLAST* com 99,81% de percentual de identidade, resultante da análise de amostra pertencente à coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e mais 12 sequências dessa mesma espécie obtidas através do *BOLDsystem*. Também foram analisadas outras 12 sequências de *Squatina aculeata* para conferir maior suporte às análises, essas obtidas através do *BOLDsystem*.

As relações entre as espécies desse grupo foram verificadas pela observação dos *clusters* gerados na árvore de *Neighbor-joining*. A similaridade das sequências obtidas com o banco de dados da ferramenta *BLAST* (NCBI) para os exemplares depositados na coleção do LBGP gerou uma

combinação mínima no *percent identity* de 99,54% para *Rhizoprionodon terranovae* e apresentou 100% de similaridade para *query cover* em todas as sequências analisadas.

**Tabela 1.** Lista de espécies e dos espécimes de tubarões analisados, bem como das sequências obtidas no *BOLDSystems*.

Ordem	Família	Gênero	Espécie	Nº de espécimes	Nº de sequências GenBank
Carcharhiniformes	Carcharhinidae	<i>Carcharhinus</i>	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	2	44
			<i>Carcharhinus falcifomis</i>	1	13
			<i>Carcharhinus obscurus</i>	1	37
			<i>Carcharhinus signatus</i>	1	13
		<i>Galeocerdo</i>	<i>Galeocerdo cuvier</i>	1	39
			<i>Prionace</i>	<i>Prionace glauca</i>	32
		<i>Rhizoprionodon</i>		<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	12
			<i>Rhizoprionodon terranovae</i>	1	12
			<i>Sphyrna</i>	<i>Sphyrna lewini</i>	4
		<i>Sphyrna zygaena</i>		7	9
		Triakidae	<i>Mustelus</i>	<i>Mustelus higmani</i>	26
<i>Mustelus schimitti</i>	1			12	
Lamniformes	Lamnidae	<i>Isurus</i>	<i>Isurus oxyrinchus</i>	1	18
			<i>Isurus paucus</i>	-	9
Squaliformes	Centrophoridae	<i>Centrophorus</i>	<i>Centrophorus granulatus</i>	-	5
			<i>Centrophorus squamosus</i>	1	9
	Squalidae	<i>Squalus</i>	<i>Squalus blainville</i>	5	5
			<i>Squalus cubensis</i>	21	6
			<i>Squalus clarkae</i>	3	5
			<i>Squalus mitsukurii</i>	15	21
Squatiniiformes	Squatiniidae	<i>Squatina</i>	<i>Squatina aculeata</i>	-	12
			<i>Squatina guggenheim</i>	2	10
<b>TOTAL</b>				137	313

As distâncias genéticas interespecíficas observadas variaram de 3,7% entre as espécies *Carcharhinus brevipinna* e *C. obscurus* e também entre *Centrophorus granulatus* e *C. squamosus*, com 29,8% para o maior valor observado entre *C. squamosus* e *Isurus oxyrinchus*, com uma média de 18,5% ( $\pm 2.11\%$ ) (Tabela 2). Por outro lado, as distâncias genéticas intraespecíficas revelaram valores entre 0 a 0,90%, sendo que o maior valor foi encontrado dentro da espécie *I. oxyrinchus* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distancia genética (K2P) em espécies de tubarões. Valores interespecíficos abaixo a esquerda e valores de desvio padrão acima a direita.  
Valores intraespecíficos na diagonal e em azul.

	<i>I.pau</i>	<i>I.ox</i>	<i>S.acu</i>	<i>S.gug</i>	<i>S.mit/cla</i>	<i>S.cub/bla</i>	<i>C.gra</i>	<i>C.squ</i>	<i>M.sch</i>	<i>M.hig</i>	<i>S.lew</i>	<i>S.zyg</i>	<i>R.lal</i>	<i>R.ter</i>	<i>G.cuv</i>	<i>C.fal</i>	<i>P.gla</i>	<i>C.sig</i>	<i>C.bre</i>	<i>C.obs</i>
<i>I.pau</i>	0,000	0,017	0,025	0,025	0,027	0,029	0,027	0,026	0,024	0,025	0,026	0,028	0,027	0,023	0,025	0,023	0,025	0,024	0,024	0,025
<i>I.ox</i>	0,147	0,009	0,025	0,025	0,028	0,028	0,027	0,027	0,026	0,026	0,029	0,029	0,027	0,023	0,022	0,023	0,024	0,023	0,024	0,024
<i>S.acu</i>	0,283	0,270	0,000	0,013	0,023	0,026	0,021	0,021	0,022	0,023	0,028	0,025	0,025	0,024	0,024	0,022	0,023	0,022	0,024	0,022
<i>S.gug</i>	0,284	0,264	0,099	0,002	0,022	0,024	0,019	0,019	0,023	0,023	0,027	0,024	0,024	0,023	0,021	0,022	0,023	0,021	0,022	0,022
<i>S.mit/cla</i>	0,276	0,275	0,205	0,194	0,005	0,012	0,015	0,015	0,025	0,025	0,027	0,026	0,024	0,023	0,025	0,026	0,026	0,024	0,024	0,024
<i>S.cub/bla</i>	0,287	0,275	0,239	0,214	0,063	0,006	0,017	0,017	0,029	0,028	0,031	0,028	0,028	0,026	0,027	0,028	0,029	0,028	0,026	0,027
<i>C.gra</i>	0,276	0,290	0,205	0,176	0,113	0,128	0,000	0,008	0,023	0,024	0,027	0,024	0,025	0,024	0,023	0,023	0,023	0,025	0,023	0,024
<i>C.squ</i>	0,279	0,298	0,202	0,180	0,110	0,122	0,037	0,000	0,025	0,025	0,028	0,025	0,026	0,025	0,024	0,024	0,024	0,025	0,023	0,024
<i>M.sch</i>	0,237	0,251	0,198	0,215	0,242	0,278	0,226	0,248	0,001	0,014	0,020	0,020	0,018	0,018	0,018	0,016	0,016	0,017	0,016	0,016
<i>M.hig</i>	0,242	0,262	0,211	0,220	0,236	0,268	0,232	0,246	0,097	0,002	0,022	0,022	0,020	0,018	0,019	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
<i>S.lew</i>	0,229	0,246	0,239	0,227	0,237	0,255	0,227	0,240	0,134	0,164	0,000	0,017	0,020	0,021	0,021	0,020	0,019	0,020	0,018	0,019
<i>S.zyg</i>	0,247	0,243	0,206	0,198	0,216	0,229	0,198	0,213	0,131	0,162	0,110	0,000	0,021	0,020	0,017	0,015	0,016	0,017	0,017	0,016
<i>R.lal</i>	0,260	0,244	0,221	0,210	0,213	0,253	0,236	0,254	0,125	0,149	0,130	0,140	0,001	0,009	0,017	0,015	0,015	0,015	0,014	0,014
<i>R.ter</i>	0,237	0,236	0,235	0,226	0,220	0,252	0,255	0,274	0,133	0,146	0,134	0,138	0,038	0,003	0,015	0,014	0,014	0,013	0,013	0,013
<i>G.cuv</i>	0,256	0,240	0,242	0,204	0,238	0,256	0,230	0,248	0,135	0,148	0,144	0,112	0,118	0,113	0,000	0,013	0,013	0,012	0,013	0,014
<i>C.fal</i>	0,243	0,236	0,224	0,216	0,243	0,268	0,229	0,244	0,106	0,137	0,130	0,087	0,097	0,097	0,085	0,000	0,009	0,009	0,009	0,009
<i>P.gla</i>	0,231	0,220	0,210	0,202	0,229	0,262	0,209	0,224	0,098	0,127	0,123	0,098	0,094	0,092	0,081	0,041	0,000	0,010	0,010	0,009
<i>C.sig</i>	0,252	0,232	0,224	0,213	0,224	0,261	0,253	0,268	0,121	0,138	0,128	0,099	0,092	0,088	0,079	0,049	0,054	0,001	0,010	0,009
<i>C.bre</i>	0,250	0,255	0,237	0,227	0,239	0,248	0,235	0,244	0,108	0,137	0,121	0,113	0,090	0,094	0,095	0,044	0,052	0,053	0,001	0,008
<i>C.obs</i>	0,260	0,252	0,218	0,220	0,237	0,263	0,244	0,259	0,107	0,136	0,118	0,092	0,088	0,094	0,093	0,042	0,039	0,041	0,037	0,001

## *Raias*

Na família Aetobatidae foram analisadas sequências de 13 espécimes, sendo que três amostras corresponderam a material existentes na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e 10 foram provenientes do banco de dados *BoldSystem*, resultando na identificação de uma única espécie, *Aetobatus narinari*.

As análises da família Dasyatidae foram realizadas com 45 amostras do LBGP e 21 sequências advindas do *BoldSystem*. Foi possível identificar componentes de três gêneros, relacionados como *Hypanus*, *Dasyatis* e *Fontitrygon*, e três espécies, *Hypanus guttatus*, *Dasyatis sp.* e *Fontitrygon geijskesi*. Para as amostras do LBGP de *Dasyatis sp.* foi obtida uma identidade de 98,6% no *BLAST*, para as outras duas espécies esse valor foi maior que 99%.

Na família Gymnuridae também foi identificada uma única espécie, *Gymnura altavela* a partir de nove sequências analisadas, sendo três sequências advindas da coleção do LBGP, com 100% de identidade pelo *BLAST* e seis sequências provenientes dos bancos de dados.

Entre as amostras da família Mobulidae foi analisada a espécie *Mobula thurstoni*, sendo que as análises envolveram uma sequência do acervo genético do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, com 100% de identidade pelo *BLAST* e nove do banco de dados *BoldSystem*.

Na família Rhinopteridae foi possível identificar uma espécie, *Rhinoptera bonasus*, detectada em 32 sequências a partir do *BLAST* com 100% de percentual de identidade, resultante da análise de amostra pertencente à coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e mais sete sequências obtidas através do *BoldSystem*.

Na ordem Rajiformes, componentes de uma família, Arhynchobatidae foram analisados, tendo sido utilizadas 10 sequências da espécie *Atlantoraja castelnaui*, com nove sequências advindas do banco de dados e uma sequência do LGBP que apresentou 100% de identidade.

Finalmente, para a família Rhinobatidae, foi obtida a identificação de um gênero e duas espécies, sendo *Pseudobatos horkelii* com 12 sequências do acervo do LBGP e 10 sequências do banco de dados e *P. percellens*, com seis sequências do LBGP e oito sequências obtidas no *BoldSystem*.

**Tabela 3.** Lista de espécies e dos espécimes de raias analisados, bem como das sequências obtidas no GenBank.

Ordem	Família	Gênero	Espécies	Nº de espécimes	Nº de espécimes GenBank
Myliobatiformes	Aetobatidae	<i>Aetobatus</i>	<i>Aetobatus narinari</i>	3	10
		<i>Hypanus</i>	<i>Hypanus guttatus</i>	43	10
	Dasyatidae	<i>Dasyatis</i>	<i>Dasyatis sp.</i>	1	7
		<i>Fontitrygon</i>	<i>Fontitrygon geijskesi</i>	1	4
	Gymnuridae	<i>Gymnura</i>	<i>Gymnura altavela</i>	3	6
	Mobulidae	<i>Mobula</i>	<i>Mobula thurstoni</i>	1	9
	Rhinopteridae	<i>Rhinoptera</i>	<i>Rhinoptera bonasus</i>	32	7
Rajiformes	Arhynchobatidae	<i>Atlantoraja</i>	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	1	9
Rhinopristiformes	Rhinobatidae	<i>Pseudobatos</i>	<i>Pseudobatos horkelii</i>	12	10
			<i>Pseudobatos percellens</i>	6	8
<b>Total</b>				103	80

As distâncias genéticas interespecíficas variaram de 5,4% entre as espécies *Fontitrygon geijskesi* e *Hypanus guttatus* com a maior distância de 28,3% entre *Pseudobatos horkelii* e *Aetobatus narinari* (Tabela 4), com uma média de 22,1% ( $\pm 0,23\%$ ). Enquanto as distâncias genéticas intraespecíficas obtiveram valores entre 0,10 para *Atlantoraja castelnaui* e *H. guttatus* a 0,80% encontrado dentro da espécie *Dasyatis sp.* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distâncias genéticas (K2P) em espécies de raias. Valores interespecíficos abaixo a esquerda e valores de desvio padrão acima a direita. Valores intraespecíficos na diagonal e em azul.

	<i>A. castelnaui</i>	<i>P. percellens</i>	<i>P. horkelii</i>	<i>A. narinari</i>	<i>G. altavela</i>	<i>M. thurstoni</i>	<i>R.bonasmus</i>	<i>Dasyatis sp</i>	<i>F. geijskesi</i>	<i>H. guttatus</i>
<i>A. castelnaui</i>	0,001	0,023	0,025	0,023	0,026	0,025	0,024	0,026	0,022	0,025
<i>P. percellens</i>	0,232	0,002	0,010	0,024	0,025	0,025	0,025	0,026	0,022	0,026
<i>P. horkelii</i>	0,261	0,063	0,007	0,026	0,025	0,024	0,024	0,024	0,022	0,025
<i>A. narinari</i>	0,241	0,255	0,283	0,002	0,025	0,025	0,025	0,025	0,022	0,024
<i>G. altavela</i>	0,269	0,258	0,250	0,247	0,005	0,022	0,021	0,024	0,020	0,022
<i>M. thurstoni</i>	0,247	0,250	0,245	0,255	0,204	0,002	0,016	0,023	0,021	0,022
<i>R.bonasmus</i>	0,245	0,256	0,246	0,247	0,177	0,120	0,002	0,021	0,023	0,023
<i>Dasyatis_sp</i>	0,260	0,261	0,243	0,246	0,215	0,208	0,174	0,008	0,021	0,023
<i>F. geijskesi</i>	0,231	0,223	0,218	0,216	0,188	0,199	0,222	0,197	0,003	0,010
<i>H. guttatus</i>	0,250	0,244	0,241	0,225	0,196	0,189	0,200	0,187	0,054	0,001

## 5 Discussão

Os elasmobrânquios caracterizam-se como um grupo de organismos que apresentam grande complexidade taxonômica (Henderson, 2020) e até mesmo certa dificuldade na coleta e amostragem de exemplares. Desse modo, as coleções biológicas a partir de espécimes conservados, bem como as informações decorrentes de análises genéticas são de grande valia para o entendimento da biodiversidade, podendo oferecer material para pesquisas de taxonomia, evolução e conservação neste grande e importante grupo de organismos (Buerki et al. 2016). Adicionalmente, a aplicação de ferramentas moleculares confere maior confiabilidade na interpretação dos resultados no que se refere à diferenciação e correta identificação das espécies (Costa et al. 2012; Hebert et al. 2013).

Uma mudança foi observada com relação aos métodos usados rotineiramente para a identificação taxonômica de materiais biológicos. Tradicionalmente, a identificação das espécies era obtida após um exame rigoroso das características morfológicas e posterior consulta à literatura taxonômica autorizada apropriada. No entanto, em cenários onde os espécimes se apresentam incompletos, os métodos morfológicos tradicionais só podem gerar classificações confiáveis em níveis taxonômicos mais elevados. Considerando que as técnicas moleculares são rápidas, acessíveis e confiáveis, os pesquisadores de diferentes áreas têm capitalizado as informações discriminatórias contidas em regiões do genoma em rápida evolução para obter a identificações em nível de espécie com a aplicação da técnica do DNA *barcode*, disponibilizando as sequências específicas obtidas em bancos de dados públicos, que podem ser utilizados por diferentes pesquisadores, em diferentes projetos.

O *Barcode of Life DataSystem* (BOLD) e o *GenBank* são os dois principais bancos públicos de dados de código de barras de DNA para animais, plantas e fungos. Atualmente o BOLD conta com sequências de ~35.000 espécimes formalmente descritas, sendo representado em maior número espécies de tubarões da ordem Carcharhiniformes e em raias, a ordem Myliobatiformes (acessado em 14/02/2022).

O Brasil é o maior país da região Neotropical e seu território abrange alguns dos biomas de maior biodiversidade do planeta. Neste contexto, as coleções biológicas se apresentam como valiosas ferramentas de registro e consulta para se confirmar hipóteses de identificação taxonômica e distribuição geográfica dos componentes desta biodiversidade. Constituem ainda, elementos de grande importância em estudos relacionados à genética e evolução (Zaher & Young, 2003; Rainbow, 2009; Pyke & Ehrlich, 2010). Os resultados encontrados neste estudo representam cerca de 18% (12% tubarões e 6% raias) das espécies descritas para a costa brasileira. Tal constatação demonstra a necessidade de ampliação e consistência nos estudos, bem como aspectos da complexidade na obtenção de exemplares deste importante grupo de organismos, os Elasmobrânquios, pois muitos desses organismos possuem hábitos que tornam difícil sua captura, além do baixo número de exemplares de espécies depositadas em coleções ictiológicas. Ilustram essas colocações a espécie



*Centrophorus squamosus* (Bonnaterre 1788), um tubarão batidemersal que vive em profundidades entre 145 a 2400 metros, para o qual foi possível analisar a amostra de apenas um espécime.

Outro fator que atua na inexistência ou no pequeno número de informações sobre as espécies é exercido pela forte pressão pesqueira sobre os peixes desse grupo de organismos, que se reflete na limitação de captura dos exemplares, como ocorre com a espécie *Atlantoraja castelnaui* que teve a perda de 75% de sua população entre os anos de 1994 a 1999 devido aos efeitos da sobrepesca (Hozbor et al. 2004). Adicionalmente, nesse mesmo período, a raia *Pseudobatos horkelii* teve uma sobre-exploração de pesca, que se refletiu na redução de seu estoque original para apenas 16% (Miranda & Vooren, 2003). Tal condição reforça a constatação de que o conhecimento da diversidade presente em coleções biológicas se apresenta como grande aliada nos estudos relacionados à genética e conservação desses peixes (Zaher & Young, 2003; Rainbow, 2009; Pyke & Ehrlich, 2010).

Por mais que o uso do DNA *Barcode* tenha facilitado na identificação das espécies e possa ser considerada uma ótima ferramenta para a maioria dos organismos, a existência de espécies intimamente relacionadas pode gerar conflitos com relação à sua caracterização (van Velzen et al., 2012). Já é conhecido na literatura que os componentes da família Squalidae se caracterizam por apresentarem complexos de espécies (Viana et al. 2016), em coincidência com resultados detectados neste estudo, no qual foram identificadas quatro espécies. Entretanto, o dendrograma inicial resultante das análises pelo método de *Neighbor-joining* demonstrou a separação em somente dois grupos. Desse modo, foram realizadas separadamente as análises de distância inter ( $5,7\% \pm 0,011$ ) e intraespecífica, agrupando as espécies *Squalus cubensis* e *Squalus blainville*, bem como as espécies *Squalus clarkae* e *Squalus mitsukurii*, mantendo o agrupamento dado pelo dendrograma. Assim, os valores obtidos corroboraram a existência do complexo de espécies dentro dessa família.

Um ponto de grande importância e que deve ser considerado nessas análises é a identificação incorreta a partir de informações constantes dos bancos de dados, uma vez que ocasionalmente podem ser depositadas sequências não correspondentes à espécie informada, ou até mesmo a falta da sequência de certas espécies. Pode ser indicado como exemplo dessas afirmações o resultado das análises realizadas com os tubarões do gênero *Mustelus*, para os quais foi possível pela ferramenta BLAST a identificação apenas ao nível de gênero, representando a espécie como *Mustelus* sp. para os indivíduos de *M. higmani*. Tais informações confirmaram dados previamente obtidos a partir de análises morfológicas e isso provavelmente ocorreu pelo fato desta espécie não apresentar até o momento sequências genéticas depositadas nos bancos de dados. Assim, de modo inédito foram geradas sequências do gene COI para a espécie *Mustelus higmani*, que serão depositadas para referência nos bancos de dados.

Entre as 30 espécies de tubarões e raias analisadas, foi verificado que 22 estão inseridas em alguma classificação de ameaça segundo a Lista Vermelha de animais ameaçados da IUCN, sendo

que cinco foram classificadas como “vulneráveis” (os tubarões *Carcharhinus brevipinna*, *C. falciformes*, *Rhizoprionodon lalandii* e *Sphyrna zygaena* e a raia *Rhinoptera bonasus*); 11 foram classificadas “em perigo” (os tubarões *Carcharhinus obscurus*, *C. signatus*, *Centrophorus squamosus*, *Isurus oxyrinchus*, *Mustelus higmani*, *Squalus mitsukurii* e *Squatina guggenheim* e as raias *Aetobatus narinari*, *Gymnura altavela*, *Mobula thurstoni* e *Pseudobatos percellens*) e 6 como “criticamente ameaçadas” (os tubarões *Mustelus schimitti*, *Sphyrna lewini* e *Squatina aculeata* e as raias *Pseudobatos horkelii*, *Atlantoraja castelnaui* e *Fontitrygon geijskesi*). Um problema que também dificulta o entendimento da real situação desses animais é a lacuna de informação sobre seu *status* de conservação, uma vez que a última avaliação do Livro Vermelho do ICMBio que foi disponibilizado em 2018 refere-se a informações obtidas entre 2012 e 2014. Neste contexto, e considerando o grau de susceptibilidade destes organismos a ações antrópicas, é possível supor que essas avaliações possam ser subestimadas e não estarem atualmente revelando a real situação desses animais na natureza.

As análises realizadas no presente trabalho permitiram a identificação molecular de representantes de espécies de tubarões e raias de ocorrência na costa brasileira, com consistente validação das informações obtidas. Também foi possível ter uma visão geral das características genéticas das espécies analisadas, observadas a partir das distâncias genéticas entre os diferentes componentes e das relações existentes nesses grupos de organismos.

Notavelmente, num grupo de organismos tão numeroso, diversificado e importante, que apresenta grandes dificuldades taxonômicas e limitações impostas pela problemática de captura, identificação inicial dos exemplares e baixa representatividade nas coleções de referência, o uso de técnicas de abordagem utilizando dados genéticos moleculares tem apresentado resultados muito satisfatórios, representando um importante avanço na obtenção de informações para a compreensão de aspectos referentes à correta representação das espécies, com reflexos no melhor entendimento de aspectos da biodiversidade. Além de se apresentarem como ferramentas importantes na identificação taxonômica e possibilitar o entendimento dos relacionamentos intra e interespecíficos, servem também para o aparelhamento dos programas de manejo das espécies e conservação dos estoques naturais dos diferentes organismos. Além disso, contribuem para a construção de bancos de dados, relacionando informações que podem ser disponibilizadas e trazendo caracteres universais, facilitando assim comparações e validações para os pesquisadores (Costa et al. 2012).

Dado que as sequências de DNA *Barcode* obtidas referentes às espécies analisadas neste estudo serão disponibilizadas no banco de dados genéticos, considera-se que as informações apresentadas poderão oferecer suporte confiável para futuras pesquisas comparativas e populacionais, bem como fornecer elementos para a elaboração de estratégias de conservação com esse importante grupo de organismos.

## 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 conserving marine life. *Nature*, 485(7396), 69-75.

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.