



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL E DOS RECURSOS HÍDRICOS PÓS-GRADUAÇÃO
EM AQUICULTURA E RECURSOS AQUÁTICOS TROPICAIS

PAULA NOGUEIRA DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR SOBRE O STATUS TAXONÔMICO E
POPULACIONAL DE UM RECURSO PESQUEIRO CRITICAMENTE
AMEAÇADO DE EXTINÇÃO: *Isogomphodon oxyrhynchus* (Valenciennes, 1839)**

BELÉM
2024

PAULA NOGUEIRA DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR SOBRE O STATUS TAXONÔMICO E
POPULACIONAL DE UM RECURSO PESQUEIRO CRITICAMENTE
AMEAÇADO DE EXTINÇÃO: *Isogomphodon oxyrhynchus* (Valenciennes, 1839)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais.

Área de concentração: Avaliação de Recursos Pesqueiros.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho.

Coorientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales

BELÉM
2024

F475a Figueiredo, Paula Nogueira de
AVALIAÇÃO MOLECULAR SOBRE O STATUS TAXONÔMICO E POPULACIONAL DE UM
RECURSO PESQUEIRO CRITICAMENTE AMEAÇADO DE EXTINÇÃO: *Isogomphodon oxyrhynchus*
(Valenciennes, 1839) / Paula Nogueira de Figueiredo. - 2024.
92 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Aquicultura e Recursos Aquáticos
Tropicais (PPGARAT), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia,
Belém, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho

Coorientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales.

1. Genética . 2. Taxonomia . 3. Diversidade genética . 4. Elasmobranquios . 5. Tubarões . I.
Rodrigues Filho, Luis Fernando da Silva , *orient.* II. Título

CDD 576.5

PAULA NOGUEIRA DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR SOBRE O STATUS TAXONÔMICO E
POPULACIONAL DE UM RECURSO PESQUEIRO CRITICAMENTE
AMEAÇADO DE EXTINÇÃO: *Isogomphodon oxyrhynchus* (Valenciennes, 1839)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais.

Data: 20/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho (Orientador)
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy (Banca Examinadora) Universidade
Federal Rural da Amazônia – UFRA

Prof. Dr. Divino Bruno da Cunha (Banca Examinadora) Universidade
Federal do Sul e Sudeste do Estado do Pará – UNIFESSPA

Prof. Dr. Diehgo Tuloza da Silva (Banca Examinadora)
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Prof. Dr. Nuno Filipe Alves Correia de Melo (Suplente) Universidade
Federal Rural da Amazônia – UFRA

BELÉM
2024

AGRADECIMENTOS

Essa obra é primeiramente dedicada com toda gratidão à DEUS que me conduziu por esta caminhada, e a FAPESPA por ter concedido a oportunidade de receber a bolsa, possibilitando assim o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus queridos pais UBIRACY DA COSTA NOGUEIRA JR. e ERIKA DA COSTA NOGUEIRA por todo amor, apoio e dedicação fornecidos nessa jornada, o carinho, a compreensão e a confiança depositada durante todo o percurso até aqui. Amo vocês!

Ao meu esposo GLEYDSON NOGUEIRA DE FIGUEIREDO por me incentivar a continuar o curso mediante a todas as dificuldades que surgiram durante o caminho, me fornecendo a base, incentivo e companheirismo.

A todos os meus familiares que me incentivam a ser uma profissional e uma pessoa melhor, demonstrando orgulho e alegria a cada vitória que eu alcancei.

Aos meus colegas Tiago Farias e Ryan Moitinho, por toda ajuda e pela companhia diária na UFRA.

Por fim, mas com grande grau de responsabilidade, agradeço e dedico esta obra ao meu orientador LUIS FERNANDO DA S. RODRIGUES FILHO que sempre me incentivou e cobrou, por acreditar no meu potencial, além de lutar todos os dias para que nossas conquistas se tornem realidade.

“A ciência se compõe de erros que,
por sua vez, são os passos até a
verdade”

-JÚLIO VERNE

RESUMO

A família Carcharhinidae, composta por espécies de tubarões amplamente conhecidos, enfrenta um debate sobre sua classificação interna, especialmente em relação ao gênero *Carcharhinus*. O gênero *Carcharhinus* Blainville, 1816, mostra-se parafilético em relação a táxons morfologicamente distintos. Dentre eles, o tubarão pato, *Isogomphodon oxyrinchus* (Valenciennes, 1839), é uma espécie endêmica do Atlântico Ocidental, com distribuição entre Trinidad e Tobago e o Golfo do Maranhão no norte do Brasil uma das menores áreas de distribuição de qualquer espécie de elasmobrânquios e tem enfrentado uma drástica redução populacional nas últimas décadas devido a impactos antrópicos, declínio este, que resultou em sua classificação como criticamente ameaçado pela IUCN na última avaliação feita para a espécie em 2019. No entanto, há um debate considerável sobre a validade da espécie (*I. oxyrinchus*) e o status de *Isogomphodon* Gill, 1862 como um táxon distinto do gênero *Carcharhinus*. Advindo da necessidade de entender essa relação, o presente estudo molecular foi conduzido para avaliar a validade genética de *I. oxyrinchus*, utilizando marcadores mitocondriais e nucleares. As análises confirmaram a parafilia do gênero *Carcharhinus*, agrupando *I. oxyrinchus* com *Carcharhinus porosus*, corroborando a reclassificação de *I. oxyrinchus* como *Carcharhinus oxyrinchus*, assim como, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) deve ser *Carcharhinus glaucus*, respectivamente. A divergência de *C. oxyrinchus* de *C. porosus* ocorreu durante o Mioceno, associada a eventos geomorfológicos na costa norte da América do Sul, especialmente relacionados à configuração do rio Amazonas. Suas características distintas são adaptações ecológicas autapomórficas ao habitat da pluma amazônica, não indicando uma distinção sistemática significativa em relação a outros membros de *Carcharhinus*. Aliado a isto, estudos recentes têm explorado a variabilidade genética em tubarões através do DNA mitocondrial, destacando a região controle (RC) como uma ferramenta valiosa para inferências filogenéticas. Apesar da baixa variação genética em alguns grupos de tubarões, a RC apresentava um potencial para auxiliar nas análises e fornecer suporte para dados filogenéticos. Para isso foram analisadas 40 espécies de tubarões de quatro famílias da ordem Carcharhiniformes, buscando identificar padrões na estrutura da RC, definindo blocos funcionais e conservados. A extração de DNA e sequenciamento foram realizados, mapeando segmentos conservados e variáveis, para realizar a descrição da RC para as quatro famílias. Os resultados subdividiram a CR em três domínios, destacando blocos funcionais como TAS-1, TAS-2, CSB-F, CSB-1, CSB-2 e CSB-3, com CSB-F predominante na porção central. Em comparação com mamíferos e teleósteos, os tubarões mostraram

variação nas composições nucleotídicas nos domínios 5', central e 3'. A taxa de variação no mtDNA dos Carcharhiniformes foi notável, revelando padrões comuns em sequências de vertebrados. Essas descobertas ampliam o potencial da CR para pesquisas filogenéticas e populacionais em tubarões.

PALAVRAS-CHAVE: Espécie Endêmica; *Carcharhinus Oxyrhynchus*; Sobre Pesca; Região Controle; Sistemática Filogenética.

ABSTRACT

The Carcharhinidae family, made up of widely known shark species, faces debate over its internal classification, especially in relation to the genus *Carcharhinus*. The genus *Carcharhinus* Blainville, 1816, is paraphyletic in relation to morphologically distinct taxa. Among them, the duck shark, *Isogomphodon oxyrinchus* (Valenciennes, 1839), is a species endemic to the Western Atlantic, distributed between Trinidad and Tobago and the Gulf of Maranhão in northern Brazil, one of the smallest distribution areas of any species of elasmobranchs and has faced a drastic population reduction in recent decades due to anthropogenic impacts, a decline that resulted in its classification as critically endangered by the IUCN in the last assessment made for the species in 2019. However, there is considerable debate about the validity of the species (*I. oxyrinchus*) and the status of *Isogomphodon* Gill, 1862 as a distinct taxon of the genus *Carcharhinus*. Arising from the need to understand this relationship, the present molecular study was conducted to evaluate the genetic validity of *I. oxyrinchus*, using mitochondrial and nuclear markers. The analyzes confirmed the paraphyly of the genus *Carcharhinus*, grouping *I. oxyrinchus* with *Carcharhinus porosus*, corroborating the reclassification of *I. oxyrinchus* as *Carcharhinus oxyrinchus*, as well as *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) should be *Carcharhinus glaucus*, respectively. The divergence of *C. oxyrinchus* from *C. porosus* occurred during the Miocene, associated with geomorphological events on the north coast of South America, especially related to the configuration of the Amazon River. Its distinctive features are autapomorphic ecological adaptations to the Amazon plume habitat, not indicating a significant systematic distinction from other members of *Carcharhinus*. In addition, recent studies have explored genetic variability in sharks through mitochondrial DNA, highlighting the control region (RC) as a valuable tool for phylogenetic inferences. Despite the low genetic variation in some groups of sharks, CR had the potential to aid analyzes and provide support for phylogenetic data. For this, 40 species of sharks from four families of the order Carcharhiniformes were analyzed, seeking to identify patterns in the structure of the RC, defining functional and conserved blocks. DNA extraction and sequencing were performed, mapping conserved and variable segments, to describe the CR for the four families. The results subdivided CR into three domains, highlighting functional blocks such as TAS-1, TAS-2, CSB-F, CSB-1, CSB-2 and CSB-3, with CSB-F predominant in the central portion. Compared to mammals and teleosts, sharks showed variation in nucleotide compositions in the 5', central and 3' domains. The rate of variation in Carcharhiniformes mtDNA was remarkable, revealing common patterns in vertebrate sequences. These findings

expand the potential of CR for phylogenetic and population research in sharks.

KEYWORDS: Endemic Species; *Carcharhinus oxyrinchus*; About Fishing; Control Region; Phylogenetic Systematics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- *Isogomphodon oxyrhynchus* fotografado em campo. 233
- Figura 2- Esquema representativo do genoma mitocondrial da espécie de tubarão *Mustelus manazo*. 244
- Figura 3- Área de estudo no norte do Brasil. Os pontos vermelhos representam os locais de amostragem nos estados brasileiros do Amapá (AP), Pará (PA) e Maranhão (MA). As inserções mostram os estados brasileiros do litoral norte e sua localização dentro do Brasil. 322
- Figura 4- Árvores consenso mostrando as relações filogenéticas das espécies da família Carcharhinidae, geradas pelos métodos ML, NJ, MP e BI, para (a) o conjunto de dados mtDNA (COI, ND2 e 12S+16S), com base em o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G (0,5093) + I (0,4665) e (b) RAG1 (baseado no modelo TN93+G (0,0963)). Os símbolos representam três diferentes níveis de suporte: (*) = *bootstrap* > 90%, probabilidade posterior > 0,9; (▲) = *bootstrap* > 70%, probabilidade posterior > 0,9; (■) = probabilidade posterior > 0,7. Os ramos sem símbolos têm valores de suporte inferiores a 70% (*bootstrap*) ou 0,70 (probabilidade posterior). 499
- Figura 5- Árvore consenso mostrando o tempo de divergência estimado de cada nó ancestral da família Carcharhinidae, com o respectivo limite de confiança (barras roxas horizontais). A inserção mostra os valores registrados para cada nó marcado com um numeral romano. Os pontos de calibração são destacados por círculos pretos. 50
- Figura 6- Padrões de entropia e análise compilada dos dados a). gráfico de entropia composto por barras que representam os outgroups (em preto) e sem outgroups (em cinza), sobrepostos para enfatizar as diferenças de variação a presença deste grupo externo. b) A barra representa cinza representa o “genoma” da Região Controle de todas as espécies, com uma área pertencente somente a *C. glaucus* e em branco para as outras espécies, dividida em três domínios: Hiper variável 5’, Central, Hiper variável 3’; os blocos pretos representam áreas conservadas e as linhas horizontais representam as regiões funcionais e os boxes de repetição. 533
- Figura 7- Rede de haplótipos mostrando as relações dos diferentes haplótipos encontrados neste estudo para a espécie *Carcharhinus oxyrhynchus*. A – Rede de haplótipo produzida a partir do fragmento mitocondrial (COI+Citb); b - Rede de haplótipo produzida a partir do fragmento da região controle. 555
- Figura 8- Gráfico da frequência das diferenças par a par da população de *Carcharhinus oxyrhynchus* de parte do fragmento da região controle. As linhas pontilhadas representam a

distribuição observada (Obs) enquanto a linha integra representa valores esperados (Exp), segundo modelo de expansão-declínio populacional. 566

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Espécies utilizadas para análises filogenéticas com o código <i>de depósito no GenBank</i> para cada marcador empregado, <i>com ênfase nos códigos destacados em negrito que fazem parte do acervo depositado pelos autores</i>	344
Tabela 2- Sequências de DNA utilizadas para formação do banco de dados, divididas por famílias e contendo seus respectivos códigos de acesso para o <i>GenBank</i> e seu tamanho original, onde (p) representa amostras com tamanho parcial. As espécies sequenciadas que ainda não foram depositadas estão representadas por XXXX.	422
Tabela 3- Distâncias médias de p (distP) e corrigidas (distC) calculadas para as comparações entre <i>I. oxyrhynchus</i> e as demais espécies de carcharhinídeos analisadas no presente estudo. As análises foram baseadas no modelo GTR+G (0,5093)+I (0,4665) para o conjunto de dados mtDNA (COI, ND2 e 12S/16S) e no modelo TN93+G (0,0963) para o gene RAG1	455
Tabela 4- Composição nucleotídica para as 40 espécies do banco de dados, representadas por domínio (HV 3', Central e HV 5') e para a região controle (RC) como um todo. Contendo também os valores para sítios invariáveis (V) e a taxa de transcrição versus transverso (R).	511

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. Introdução geral	19
3.2. <i>Isogomphodon oxyrhynchus</i> (Valenciennes, 1839).....	21
3.3. Utilização de marcadores moleculares mitocondriais.....	23
3.3.1. Região controle do DNA mitocondrial.....	24
3.3.2. Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI)	25
3.3.3. Região do mtDNA compreendida entre rRNA 12S e o rRNA 16S.....	26
3.4. Utilização de marcadores nucleares	27
3.5. Status taxonômico de <i>Isogomphodon oxyrhynchus</i>	27
3.6. Iniciativas à conservação.....	28
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo geral.....	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato	32
5.1.1. Área de estudo e amostragem.....	32
5.1.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA	38
5.1.3. Análises filogenéticas e de distância genética.....	39
5.1.4. Estimativas de tempo de divergência	40
5.2. Descrição da região controle do DNA mitocondrial e diversidade genética de <i>C. oxyrhynchus</i>	40
5.2.1. Amostragem, extração e sequenciamento de DNA	41
5.2.2. Alinhamento, estrutura e comparação de sequências	43
5.2.3. Análise das Repetições em Tandem	43
5.2.4. Diversidade genética	44
6. RESULTADOS	44
6.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato	44
6.1.1. Distâncias genéticas	44
6.1.2. Análise filogenética e tempos de divergência	46
6.2. Descrição da região controle do dna mitocondrial e diversidade genética de <i>C. oxyrhynchus</i>	51
6.2.1. Caracterização estrutural da região controle em tubarões	51
6.2.2. Padrões de repetição em tandem	54
6.2.3. Variabilidade genética de <i>Carcharhinus oxyrhynchus</i>	54

7. DISCUSSÃO	56
7.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato	56
7.1.1. Os Carcharhinidae, <i>Carcharhinus</i> e <i>Isogomphodon</i>	56
7.1.2. Adaptações do tubarão pato e <i>insights</i> sobre o processo de especiação.....	60
7.1.3. Conservação de <i>Carcharhinus oxyrhynchus</i>	61
7.2. Descrição da região controle do DNA mitocondrial e diversidade genética de <i>C. oxyrhynchus</i>	63
7.2.1. Descrição da região controle	63
7.2.2. Diversidade genética de <i>C. oxyrhynchus</i>	65
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
9- REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	80
ANEXO	92

1. INTRODUÇÃO

A família Carcharhinidae Jordan & Evermann, 1896 tem seu surgimento descrito no Paleoceno (aproximadamente 65 Milhões de anos (Ma) (Underwood, 2006) (Kriwet; Benton, 2004). No que diz respeito à pesca, esta é sem dúvida a família de tubarões mais importante nos trópicos e várias espécies figuram eminentes na pesca artesanal, comercial e esportiva (Compagno, 2005).

Apesar da sua importância pesqueira, Carcharhinidae é uma família com contradições, no que diz respeito às relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros que a compõem. Estudos moleculares vêm investigando esta família, pontuando evidências de seu parafiletismo (Lavery, 1992; Naylor, 1992; Dosay- Akbulut, 2008). Como exemplo, podemos citar o estudo de Dosay-Akbulut (2008), que analisou as regiões ribossomais ITS1 e ITS2 para representantes de Carcharhinidae, apoiaram um arranjo parafilético, o qual incluía *P. glauca* no gênero *Carcharhinus*, justificando a reclassificação de *P. glauca*. O mesmo arranjo parafilético, também foi observado por López *et al.* (2006), no qual *Galeocerdo cuvier* (Péron & Lesueur, 1822) agrupou-se com Hemigaleidae, numa ramificação fora do clado formado por Carcharhinidae e Sphyrnidae.

Esta família apresenta uma grande similaridade morfológica para algumas espécies, por exemplo, as espécies *Carcharhinus plumbeus* (Nardo, 1827) e *Carcharhinus obscurus* (Lesueur, 1818) que só foram diferenciadas através de métodos moleculares (Pank *et al.*, 2001). Além disso, como citado anteriormente, as relações filogenéticas entre diversos táxons não possuem robustez, pois, a maioria dos grupos taxonômicos não possui diferenças estatísticas que permitam o posicionamento e relações filogenéticas confiáveis. Esta falta de definição filogenética, que implica no status taxonômico de algumas espécies, podem levar a uma tomada de decisões errônea quanto a sua necessidade de conservação, ou pode até mesmo mascarar essa necessidade de proteção, tornando então imprescindível a revisão taxonômica de algumas espécies, ou mesmo gêneros, como é o caso do tubarão Pato. *Isogomphodon oxyrinchus* (Valenciennes, 1839), é uma espécie de tubarão muito restrita geograficamente, sendo endêmica do Atlântico ocidental (Lessa *et al.* 1999; Feitosa *et al.* 2019).

I. oxyrinchus é um exemplo de espécie sobre explorada, ao longo de sua distribuição de águas turvas e de baixa salinidade da costa norte do Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Suriname e Trinidad e Tobago, (Lessa, 1999). Esta espécie, vivípara, de maturidade sexual tardia e gestação de aproximadamente 12 meses a cada dois anos, com fecundidade de até oito embriões por ninhada, características essas, que se tornam um grave problema para

conservação, pois os dados reprodutivos demonstram sua fragilidade inerente aos impactos humanos, como pesca e degradação do habitat. Problema que somado principalmente a captura acidental em redes de pesca (fauna acompanhante) e à sua distribuição restrita, incluiu este tubarão na categoria de espécies criticamente ameaçadas de extinção pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) e ICMBio (Bigelow; Schroeder, 1948; Compagno, 1984; Lessa, 2000; Feitosa *et al.* 2018, 2019).

Isogomphodon oxyrinchus foi descrita inicialmente como *Carcharias oxyrinchus* por Valenciennes, 1839, que posteriormente foi alocado em *Carcharhinus* passando a ser denominado de *Carcharhinus oxyrinchus* (Valenciennes, 1839). Em 1862, Gill definiu o gênero *Isogomphodon* (Gill, 1862), para a espécie alvo deste estudo, a qual até hoje é descrita como *Isogomphodon oxyrinchus*. Esta espécie apresenta algumas características morfológicas distintas, como seu focinho alongado, triangular e estreito dorso-ventralmente e olhos minúsculos (Compagno, 1984). Entretanto, apresenta diversas características do gênero no qual se enquadrava anteriormente (*Carcharhinus*), como: ausência de espiráculos, presença de sulco pré caudal, segunda nadadeira dorsal bem menor que a primeira e o desenvolvimento embrionário do tipo vivíparo, o que leva a questionamentos relevantes sobre sua classificação (Compagno, 1984). Sendo assim, o presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar geneticamente amostras de tecido para através de marcadores moleculares descrever as relações filogenéticas dentro da família Carcharhinidae, de forma a testar o real status taxonômico do gênero *Isogomphodon* e de sua espécie monotípica.

2. JUSTIFICATIVA

O esgotamento dos recursos naturais, como os tubarões, é uma realidade bem perceptível em todo mundo, colocando-os em um estado de exploração e sobre- exploração (Benson *et al.*, 2001). A diminuição desses recursos tem reflexos diretos na economia e ambiente como um todo, visto a forte demanda dos produtos derivados destes peixes cartilagosos (carne, nadadeira, cartilagem, óleo de fígado) aos mercados nacionais e internacionais (Viana, 2013; Sorét, 2006).

Como exemplo deste esgotamento de recurso natural, podemos citar a situação do cação Pato, *I. oxyrhynchus*, que se encontra em estado de sobre pesca desde os anos 80, chegando a um colapso de capturas em meados 1990, com elevadas taxas de captura de juvenis, resultando em uma redução populacional de 90% (Stride *et al.*, 1992; Lessa *et al.*, 2016). Hoje esta espécie enquadra-se na categoria de criticamente ameaçada da Lista Vermelha da IUCN, entrando em um estágio de quase extinção (Lessa *et al.*, 2006; Lessa *et al.*, 2016). Mesmo com a legislação brasileira que proíbe a captura do tubarão Pato desde 2004, estudos demonstram que a captura continua ocorrendo (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Palmeira *et al.*, 2013; Feitosa *et al.*, 2018).

Esta espécie possui características morfológicas interessantes, e compreender como essas características evoluíram e interagem com o meio ambiente pode ser uma informação fundamental para a conservação desta espécie e para desvendar suas relações filogenéticas com outros tubarões. Este estudo visa avaliar as relações filogenéticas, sistemáticas e populacionais de *I. oxyrhynchus*, com o intuito de preencher a lacuna sobre a biodiversidade amazônica de elasmobrânquios, através de marcadores mitocondriais e nucleares. Os resultados deste projeto trarão mais informações sobre o real *status* taxonômico e populacional de *I. oxyrhynchus*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.Introdução geral

Elasmobrânquios já apresentam uma peculiar história de vida, devido seu crescimento lento, maturação sexual tardia, reduzida taxa de fecundidade e fundamental importância ecológica. Suas peculiaridades representam um fator agravante, principalmente quando voltamos as atenções para o âmbito de conservação das espécies marinhas em todo mundo e, além disso, existe a grande probabilidade de novas espécies entrarem para o quadro de espécies ameaçadas de extinção por se tornarem alvos da pesca exploratória, sendo facilmente afetadas em um futuro bem próximo (Bräutigam *et al.*, 2016; Davidson; Dulvy, 2017; Jabado *et al.*, 2017).

Dentre os animais mais ameaçados de extinção, estão situados os tubarões com registros de declínios populacionais estimados em até 90% em diversos pontos do planeta (Dent; Clarke, 2015). Com sua redução oriunda, sobretudo, das pressões antropogênicas exercidas, que rapidamente se expandiram em função da demanda de seus subprodutos (especialmente carne e nadadeiras), de maneira que as taxas de exploração não estão sendo compatíveis com a sustentabilidade do grupo. Foram fornecidos dados globais que indicam que cerca de 17 milhões de toneladas de nadadeiras de tubarões foram importadas entre os anos 2000 e 2016, movimentando uma quantia estimada em 294 milhões de dólares por ano (Okes & Sant, 2019). Tais subprodutos, como as nadadeiras, são destinados principalmente a países asiáticos, devido ao grande comércio voltado a questões medicinais e culturais, dentre outras, demonstrando a força da sobre- exploração e comercialização de espécies muitas vezes enquadradas como ameaçadas, desta forma sendo tratados como artigos de luxo (Eriksson; Clarke, 2015; Shea; To, 2017).

Segundo Barreto *et al.* (2015) essa tendência de exploração pesqueira já vem sendo registrada sobre as populações de tubarões no Sul do Atlântico. Posteriormente Barreto *et al.* (2017) constatou que ao longo da costa Brasileira, foram desembarcadas cerca de 200.000 toneladas de elasmobrânquios (incluindo tubarões, raias e quimeras) entre os anos de 2000 e 2010 constatando que o Brasil representa uma das grandes nações responsáveis pela captura de elasmobrânquios no cenário mundial, no entanto, os dados estatísticos oficiais não são adequadamente coletados desde 2007, onde as últimas coleta mostravam que produção marinha total do Brasil era composta 5% por peixes cartilagosos, o que aumenta a fragilidade desses dados (Barreto *et al.*, 2017).

Significativa parcela das capturas de elasmobrânquios é derivada das pescarias artesanais, que se utilizam de barcos de médio porte com capacidade de armazenamento reduzido, tendo aproximadamente 60% do volume de capturas no país. A pesca artesanal representa um papel de suma importância na sociedade, pois fornece alimentos, além de ser a provisão de rendas e mão-de-obra para diversas famílias das populações costeiras. No entanto, tal atividade tem contribuído para ocorrência de pescarias ilegais, culminando na disseminação de redes de comercialização de espécies ameaçadas que tem sua captura proibida, comercialização essa feita *in natura*, sendo destinadas às feiras e mercados locais e regionais, com objetivo de consumo para população, ou explorando os subprodutos, como as nadadeiras que acabam sendo destinadas à exportação (Bornatowski *et al.*, 2017; Ruffino, 2018; Martins *et al.*, 2018; Silva, 2016; Rosa *et al.*, 2017).

Ademais, a coleta de dados confiáveis por parte dos pescadores é difícil, devido a desconfiança em relatar o que sabem, e o medo de punição por condutas erradas, além de parte da produção ser consumida localmente, e acaba não entrando nos dados estatísticos. Como possuem diversas modalidades de pesca, muitas espécies são alvo da pesca acidental (*Bycatch*) (Pauly; Zeller, 2016; Barbosa-Filho *et al.*, 2015; Monteiro; Sousa, 2016; Rosa *et al.*, 2017). Oliver *et al.* (2015), realizou um estudo global que verificou os padrões de pesca acidental e com esse estudo ajudou a identificar, e priorizar áreas que necessitam de medidas urgentes de gestão pesqueira. Onde foram perceptíveis taxas significativas de capturas para os elasmobrânquios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

A região Norte, apresenta uma extensa floresta tropical costeira, com grandes áreas de manguezais e abriga uma enorme biodiversidade de elasmobrânquios marinhos endêmicos e/ou altamente ameaçados, tornando-se altamente susceptíveis a pesca insustentável desses grupos (Carrillo-Briceno *et al.*, 2018; Feitosa *et al.*, 2018; Davidson; Dulvy, 2017; Dulvy *et al.*, 2017).

De acordo com Dulvy *et al.* (2014), a área representada pelas regiões norte e nordeste do Brasil retrata um ponto importante na captura do grupo, de modo que é considerada um *hotspot* global. Sendo identificadas cerca de vinte espécies de tubarões com ocorrência conhecida na região, onde, todas estão listadas pela IUCN em alguma das categorias de ameaça de extinção, sendo recentemente identificados nos portos pesqueiros ilegalmente (Monteiro; Sousa, 2016; Feitosa *et al.*, 2018). Wosnick *et al.* (2019), compilaram dados de capturas nos últimos 40 anos no estado do Maranhão para verificar a biodiversidade de elasmobrânquios e o status de conservação do grupo. O estudo revelou a captura de um número significativo de espécies de tubarões classificados como em perigo (EP) e criticamente ameaçados (CA), sendo índices superiores aos observados em nível nacional, baseados na lista vermelha da IUCN.

Os charutos, forma como é conhecido o pescado processado quando desembarca nos portos (cabeça, nadadeiras e vísceras removidas), dificulta a identificação correta com base nas características morfológicas (Gemane *et al.*, 2017). Mediante a isso, o emprego de ferramentas moleculares em todo mundo vem se tornando uma alternativa para auxiliar essa identificação (Cardeñosa *et al.*, 2017; Kolmann *et al.*, 2017; Hellberg; Isaacs; Hernandez, 2019), inclusive no Brasil (Silveira, 2017; Bernardo *et al.*, 2020). Estudos já demonstram a eficiência na identificação de espécies a partir de amostras coletadas, utilizando-se de marcadores genéticos, o que permite obter dados de pesca em alguns portos de desembarque e posteriormente estabelecer medidas de conservação (Ferrette *et al.*, 2019).

3.2. *Isogomphodon oxyrhynchus* (Valenciennes, 1839)

Com foco no litoral Norte do Brasil, *I. oxyrhynchus* está distribuído em uma região tropical de clima quente e úmido, com duas estações anuais bem definidas (inverno e verão), distribuição essa, que compreende os estados do Amapá, Pará e Maranhão, região reconhecida como um *hotspot* global de biodiversidade, e pela alta captura de elasmobrânquios através da pesca (Dulvy *et al.*, 2017; Davidson; Dulvy, 2017). Neste cenário, se localiza um dos mais importantes sítios ecológicos, com diversas áreas de berçário úteis para as espécies, sobretudo as endêmicas (Wosnick *et al.*, 2019).

Uma espécie que mediante esse cenário merece especial atenção é o *I. oxyrhynchus*, possuindo uma das áreas de distribuição mais restrita do mundo, compreendida entre as águas da costa da Venezuela e se estendendo até o norte do litoral brasileiro (Feitosa *et al.*, 2019). O que se destaca nos indivíduos desta espécie é o formato longo, triangular achatado de seu focinho, recebendo então o nome popular de “tubarão-pato” (Casselberry; Carlson, 2015).

Como já evidenciado, os tubarões são altamente vulneráveis ao processo de exploração pesqueira em decorrência de sua baixa fecundidade e o tempo que leva para atingir a maturidade sexual, diferente de outros grupos aquáticos, que possuem essa reprodução de forma abundante. *I. oxyrhynchus* é uma espécie endêmica, vivendo em águas costeiras da América do Sul, associada a áreas de clima quente e úmidos, com águas de turbidez elevada, derivadas dos sedimentos que se dispersão dos rios para a costa, onde são dominantes os sistemas de manguezais (ex.: litoral amazônico), sendo considerada uma espécie símbolo do endemismo no Brasil (Casselberry; Carlson, 2015; Feitosa *et al.*, 2019).

A espécie apresenta parâmetros biológicos que dificultam o crescimento populacional, como: a baixa fecundidade, gerando de 2 a 8 filhotes por ninhada, maturação sexual tardia, com

machos chegando a fase adulta entre 5 e 6 anos, enquanto as fêmeas levam em torno de 6 a 7 anos, um ciclo reprodutivo bianual com um longo período gestacional de 12 meses e com provável período de parto compreendido entre os meses de janeiro a junho (Lessa *et al.*, 2000; Lessa *et al.*, 2006; Feitosa *et al.*, 2019).

É uma espécie de porte médio, variando de 171,4 cm a 173,8 cm de comprimento total, para indivíduos adultos com idade máxima de 20 anos. As taxas de crescimento desta espécie vão diminuindo com a idade, chegando a 14 cm por ano nos juvenis, e a 10 cm por ano após a maturidade sexual (Lessa *et al.* 2000). Existe a presença de diferenças de tamanho entre machos e fêmeas maduros sexualmente, principalmente para as medidas morfométricas de barbatana e cabeça, que, provavelmente, estão associadas ao comportamento de cópula (Lessa *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2015). Esta espécie em relação a outros tubarões apresenta as maiores proporções de barbatanas peitorais em relação ao corpo (Lessa *et al.*, 2000).

O Cação Pato tem sua alimentação baseada no consumo de peixes pequenos e delgados, sendo comumente identificadas: *Anchoa spinifer*, *Stellifer naso*, *Nebris microps* e *Eucinostomus spp.* Espécies estas altamente abundantes em toda a distribuição de *I. oxyrhynchus*, tanto na fase juvenil quanto adulta (Almeida *et al.*, 2011).

O *I. oxyrhynchus* vem sofrendo com a pressão pesqueira, sendo capturado acidentalmente nas suas áreas de ocorrência por pesca artesanal, que geralmente utiliza itens como rede de emalhas. Estudos demográficos demonstram que a população vem decrescendo cerca de 18% anualmente (Lessa, 1986; Lessa *et al.*, 2006). Como consequência, desde 1990 as capturas têm reduzido sua abundância em 90%, entrando em um colapso populacional, que aliado à sua distribuição reduzida e sua história de vida, o incluíram pela IUCN na categoria de espécie criticamente ameaçada (CA) desde 2006 (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Lessa *et al.*, 2006; Lessa *et al.*, 2016), mostrando a urgentemente necessidade de medidas de conservação, haja vista que ainda persiste a pesca ilegal sobre essa espécie (Feitosa *et al.*, 2018).

O que chama atenção neste vertebrado é a presença de uma cabeça com um focinho longo e achatado, terminando na região da ponta em formato triangular, o que estaria associado a processos adaptativos ao meio que habita. Dessa forma, essa estrutura pode auxiliar na localização de suas presas escondidas na área, atrelado a condição de seus olhos pequenos, devido estar inserido em ambiente com grande quantidade de matéria orgânica suspensa na água e com pouca visibilidade (Casselberry; Carlson, 2015; Compagno, 1988).

Figura 1- *Isogomphodon oxyrinchus* fotografado em campo.



Fonte: Acervo dos autores.

3.3. Utilização de marcadores moleculares mitocondriais

Os marcadores moleculares têm sido bastante utilizados para inferir sobre as relações filogenéticas, taxonomia e estrutura populacional de diferentes organismos marinhos (Baker *et al.*, 1996; Innes *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2019; Rodrigues-Filho *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2021; Sales *et al.*, 2021). Os marcadores oriundos do genoma mitocondrial são frequentemente utilizados nesta finalidade devido a sua alta taxa mutacional. Especialmente, o gene Citocromo oxidase subunidade I (DNA *Barcode*) e a região controle do genoma mitocondrial (RC) por conter porções de grande variabilidade (Avise, 2000; Feitosa *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2019).

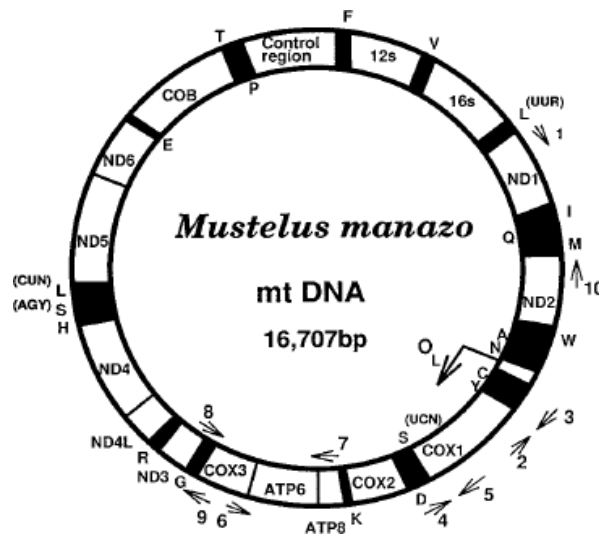
Ferramentas moleculares tornaram-se indispensáveis nos inúmeros estudos de sistemática e populacionais, pois os caracteres moleculares fornecem uma fonte rica de informações para a análise filogenética de espécies e, dentro dos limites, podem servir como indicadores do tempo necessário aos eventos evolutivos, bem como para revelar a sequência dos eventos (Hillis *et al.*, 1996). Dentre as regiões genômicas utilizadas para estudos de sistemática molecular e estrutura genética de populações, o DNA mitocondrial tem sido muito estudado em peixes e utilizado de forma bastante eficiente para tratar diferentes níveis de questões taxonômicas, dependendo da região escolhida para análise (Avise *et al.*, 1987; Stepien; Kocher, 1997).

O sucesso das sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) em estudos filogenéticos é devido a várias características, como: (1) genoma compactado (Cantatore; Saccone, 1987;

Avise; Saunders, 1984); (2) falta de recombinação (Avise & Saunders, *op. cit.*; Clayton, 1982, 1992; Hayashi *et al.*, 1985); (3) herança materna (Avise; Saunders, *op. cit.*; Kondo *et al.*, 1990); (4) evolução mais rápida das sequências quando comparado as sequências nucleares (Brown *et al.*, 1979; Avise & Saunders, *op. cit.*); e (5) muitas cópias por célula (Michaels *et al.*, 1982; Avise & Saunders, *op. cit.*; Robin; Wong, 1988).

O DNA mitocondrial possui forma circular, com cerca de 15 a 20 kb de comprimento, possuindo dois genes de RNA ribossomal (rRNA), 22 genes de RNA transportadores (tRNA) e 13 genes codificadores de proteínas. Segundo Cao *et al.* (1998), o comprimento do DNA mitocondrial de um tubarão, como *Mustelus manazo*, é de 16.707 pares de bases (Figura 2), que é similar aos muitos organismos já sequenciados.

Figura 2- Esquema representativo do genoma mitocondrial da espécie de tubarão *Mustelus manazo*.



Fonte: Adaptada de Cao *et al.* (1998).

3.3.1. Região controle do DNA mitocondrial

A região controle é importante para a regulação, transcrição e replicação do DNA mitocondrial. Além dos sítios de transcrição, essa região contém a origem de replicação da fita pesada (H) do genoma mitocondrial, conhecida como alça D (Goebel *et al.*, 1999; Taanman, 1999).

Dadas essas funções, os estudos têm se concentrado nos padrões funcionais e estruturais dessa região em uma ampla gama de organismos. A região é normalmente dividida em três

domínios, com um domínio central relativamente bem conservado flanqueado pelas seções 5' e 3' hiper variáveis (Stoneking, 2000; Heyer *et al.*, 2001; Maté *et al.*, 2004; Rocha-Olivares *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Pie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012 a, b). Apesar da presença desses domínios hiper variáveis, a região controle contém blocos de sequências conservadas (CSBs), que estão relacionadas ao início da replicação e transcrição do DNA mitocondrial ao longo de sua extensão (Taanman, 1999). No entanto, uma variação considerável no número, localização e grau de conservação desses CSBs foi observada nos vertebrados que foram analisados até o momento, indicando diferenças entre táxons nos mecanismos reguladores (Southern *et al.*, 1988; Sbisa *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2003).

A região controle, comumente conhecida como alça de desdobramento (alça D), possui um tamanho de aproximadamente 1,4 kb, e por não ser codificadora é responsável pela alta variação no genoma mitocondrial, possuindo uma taxa de mutação correspondendo a cinco vezes maior que o restante do genoma mitocondrial (Vigilant *et al.*, 1991; Gissi *et al.*, 1998; Ursing; Arnason, 1998). Por causa desta alta variabilidade, esta região tem sido amplamente utilizada para estudos populacionais e filogeográficos em organismos marinhos, assim como em trabalhos de genética de populações de peixes (Sturmbauer; Meyer, 1993; Brown *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998).

A região controle é uma ferramenta útil para investigar a estrutura genética em tubarões (Heist *et al.* 1996), pois indica níveis elevados de variabilidade intraespecífica (Stepien, 1995). Como exemplo, podem ser citados vários trabalhos que fizeram a utilização de tal ferramenta para análises em elasmobrânquios, como, Pardini *et al.* (2001), Duncan *et al.* (2006), Hoelzel *et al.* (2006), Keeney e Heist (2006) e Stow *et al.* (2006).

Com a utilização de técnicas moleculares é possível determinar o grau de estruturação das populações, medindo a variabilidade genética de espécies ameaçadas, tornando possível avaliar a situação do estoque pesqueiro do tubarão pato, que na costa norte é desconhecido, e assim fornecer informações essenciais para que se possam traçar planos de manejo e conservação eficientes, que evitem que espécies criticamente ameaçadas de extinção venham a sucumbir em consequência à ação da pesca predatória.

3.3.2. Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI)

A Citocromo c Oxidase é uma enzima com 3.606 aminoácidos, onde cada monômero é composto por treze diferentes subunidades polipeptídicas, sendo três codificadas por genes

mitocondriais (COI, COII e COIII) (Adkins; Honeycutt, 1994; Tsukihara *et al.*, 1996). O gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), vem sendo usado com bastante frequência em estudos filogenéticos e filogeográficos por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (Sahls; Nyblom, 2000), mas também, vem sendo utilizado em trabalhos filogeográficos em peixes (Brykov *et al.*, 2003). A técnica do DNA *Barcode*, utiliza um pequeno segmento do COI, com cerca de 648 nucleotídeos (Hebert *et al.*, 2003a, 2003b), com a intenção de criar um banco de dados mundial, para armazenar informações e auxiliar na automatização no procedimento de identificação das espécies. Essa técnica faz comparações entre sequências de material alvo com sequências que foram armazenadas no banco de dados, podendo ser acessado pela plataforma BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) (Hebert *et al.*, 2003). A identificação de elasmobrânquios utilizando o DNA *Barcode* foi padronizado por Ward *et al.* (2005), onde foram sequenciados o gene COI de 61 espécies, e desde então outros pesquisadores corroboram a eficiência da ferramenta para o grupo (Kekkonen; Herbert, 2014; Rodrigues-Filho *et al.*, 2020; Feitosa *et al.*, 2018).

3.3.3. Região do mtDNA compreendida entre rRNA 12S e o rRNA 16S

Esta região por estar compreendida entre genes codificadores de RNA ribossomal (12S e 16S) apresenta baixas taxas de substituição nucleotídica em relação aos genes que codificam proteína, tornando-a um poderoso marcador filogenético para vários grupos de vertebrados (Springer *et al.*, 2001).

Esses dois genes formam os rRNA dos vertebrados, que ocorrem no genoma com apenas uma cópia e sem nenhum espaço associado. Estes são amplamente utilizados em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos em vários organismos, assim como representam bons marcadores moleculares na identificação de espécies (Mindell; Honeycutt, 1990; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Doady *et al.*, 2003; Greig *et al.*, 2005).

Trabalhos como de Doady *et al.* (2003) e Greig *et al.* (2005) reforçam o poder desta região como ferramenta filogenética para análises com tubarões, mostrando sua eficiência para resolver relações de nível taxonômico. Greig *et al.* (2005) discriminaram cerca de 35 espécies de tubarões, mostrando que, apesar de ser uma região conservada, foi eficiente para distinguir espécies próximas, com um bom sinal filogenético para resolver questões abaixo

do nível de família.

3.4.Utilização de marcadores nucleares

Os marcadores nucleares são bastante utilizados, em estudos relacionados a identificação, parentesco, relações filogenéticas, filogeográficos e populacionais em associação ou não com marcadores mitocondriais, em diferentes organismos (Pereira *et al.*, 2004; Westneat; Alfaro, 2005; Miller *et al.*, 2008; Perdices *et al.*, 2008).

Em relação aos elasmobrânquios, a maioria dos trabalhos acerca das relações evolutivas baseados em sequências de DNA, são realizados em associação com marcadores mitocondriais, informados anteriormente, e nucleares, principalmente, o gene de ativação de recombinação 1 (RAG1) (Iglésias *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2006). O RAG1, assim como o gene RAG 2 estão envolvidos na codificação de enzimas que desempenham um papel importante no rearranjo e recombinação dos genes das imunoglobulinas e dos receptores de células T. São genes bastante conservados entre diferentes grupos taxonômicos, inclusive os elasmobrânquios.

3.5.Status taxonômico de *Isogomphodon oxyrhynchus*

No que diz respeito a estudos relacionados à filogenia de elasmobrânquios através de análises com sequências de DNA, voltados a altos níveis taxonômicos demonstra carência em informações, principalmente para os Carcharhinídeos, o que torna difícil obter dados quanto ao histórico evolutivo e relações entre as espécies, principalmente para o tubarão pato, espécie alvo de nosso estudo (Douady *et al.*, 2003; Dunn; Morrissey 1995; Winchell *et al.*, 2004; Naylor *et al.*, 2005; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009). Neste cenário, características como essa representam uma grande problemática no sentido de compreender com exatidão as relações filogenéticas entre os membros da família Carcharhinidae, o que demonstra a importância da aplicabilidade deste estudo.

Dentre os estudos que comportam informações filogenéticas para os Carcharhinídeos, observa-se casos de parafiletismo em relação ao gênero *Carcharhinus*, devido incluir espécies de outros gêneros em seus clados, como *Sphyrna*, *Galeocerdo*, *Rhizoprionodon* e *Negaprion* (Lavery, 1992; Naylor, 1992; López *et al.*, 2006).

Na década de 90 Lavery (1992), por meio de aloenzimas de 17 espécies de

Carcharhinidae, que por apresentarem pesos moleculares distintos e padrões de bandas variados, constatou em seus resultados que o gênero *Carcharhinus* e família Carcharhinidae podem ser parafiléticos, devido a inclusão de espécies de outros gêneros, como *Negaprion acutidens* e *Galeocerdo cuvier*. E espécies de outra família, como Hemigaleidae, (*Hemipritys elongatus*) (Lavery, 1992).

Utilizando a mesma metodologia de análise eletroforética de alozimas, Naylor (1992) reconstruiu as relações evolutivas do grupo. Neste estudo também foi sugerido que *Carcharhinus* seja parafilético, devido a inclusão de tubarões do gênero *Sphyrna*, *Galeocerdo*, *Rhizoprionodon* e, além disso, contou com a presença de *P. glauca* (Naylor, 1992). Utilizando sequências de DNA, López *et al.*, (2006) constatou o mesmo parafiletismo de Carcharhinidae observado por Lavery (1992) e Naylor (1992), o qual *Galeocerdo cuvier* agrupou com Hemigaleidae, numa ramificação fora do clado formado por Carcharhinidae e Sphyrnidae. Tais estudos demonstram a grande problemática quando se trata das relações filogenéticas dos carcharhinídeos, ressaltando a necessidade de mais estudos para estes organismos, o que reforça a relevância do presente estudo.

Análises em regiões ribossômicas, como ITS1 e ITS2, buscando entender as relações de parentesco dentro do gênero *Carcharhinus* por Dosay-Akbulut (2008) deixou claro que o tubarão azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) não é um gênero monotípico, pois está dentro do gênero *Carcharhinus* e a divergência genética entre *P. glauca* e *Carcharhinus* variou de 5 a 9%, enquanto a divergência intergenérica é de 5 a 10% (Dosay-Akbulut, 2008). Hoje, poucos trabalhos que abordam as relações filogenéticas de tubarões citam a espécie *I. oxyrinchus*. Rodrigues-Filho *et al.* (2009) realizou análises de identificação genética usando segmento de 12S-16S (mesma região usada no presente estudo) de espécies de tubarões comercializadas no litoral Norte brasileiro. Tais resultados indicam que o tubarão pato, assim *P. glauca*, possa ser incluído no gênero *Carcharhinus*.

3.6. Iniciativas à conservação

Quando observamos os compromissos voltados à conservação dos elasmobrânquios conseguimos compreender a necessidade de preservar a sua existência, visto o papel ecológico que eles ocupam. Ao longo do tempo, com o conhecimento gradativo destes animais temos a percepção dos principais problemas que afetam sua sobrevivência é a exploração econômica sobre estes animais. Na década de 90, os tubarões e raias passaram a

atrair uma significativa atenção em relação aos problemas de conservação no momento em que instituições de pesquisas foram voltadas a estes recursos pesqueiros. Como exemplos, temos o REVIZEE (Programa de Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos da Zona econômica Exclusiva), criada pelo Ministério do Meio Ambiente em 1994 (ICMBio, 2020) e o Sociedade Brasileira para estudos de Elasmobrânquios (SBEEL) fundada em 1997. Esta última, busca incessantemente à conservação de tubarões e raias (SBEEL, 2020).

Neste contexto, o conhecimento destes animais e sua vulnerabilidade deu origem ao Plano de Ação Internacional para a Conservação e Gerenciamento de Tubarões (IPOA-SHARK), com apoio da FAO, em 1998. No mesmo período, o Brasil publicou a primeira normativa de anti-*finning*, proibindo a retirada das nadadeiras em todo território brasileiro sem aproveitamento de suas carcaças. No entanto, somente em 2012 passou a ser obrigado o desembarque de tubarões e raias com suas nadadeiras aderidas ao corpo do animal, haja vista que representam um dos produtos mais caros no mar (IPOA, 2020; IBAMA. Portaria N° 14, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2012).

As poucas normativas em vigor determinada pelo ministério do meio ambiente que fala que o tamanho mínimo de capturas é de 60 cm para espécies marinhas e estuarinas, mas somente no litoral Sul e Sudeste do Brasil encontrada em seu anexo I (INSTRUÇÃO NORMATIVA MMA N° 53, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2005). Com intuito de manter a transparência na comercialização da carne. Desde 2015 foi então determinado que as principais espécies de peixes de valor comercial devem receber rótulos, com informações básicas, como o nome comum e científico, que estão incluídas na lista anexa da presente normativa (INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 29, DE 23 DE SETEMBRO DE 2015).

O declínio das populações resultou em alerta e execução do plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção no Brasil (PAN-Tubarões), dando ênfase a 12 espécies, tais como tubarão *Isogomphodon oxyrinchus*, com vigência até 2019, sendo realizado um monitoramento com o apoio de grupo de assessoramento técnico aprovado pela Portaria N° 575, de 05 de Dezembro de 2014 (PORTARIA N° 125, DE 04 DE DEZEMBRO DE 2014; PORTARIA N° 575, DE 05 DE DEZEMBRO DE 2014; ICMBio, 2014).

O que está em vigor é a portaria MMA n° 445/2014 que oficializa a lista de espécies Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Nesta norma, as espécies foram classificadas em categorias de espécies ameaçadas de extinção. As espécies encontradas nesta portaria devem ser protegidas de modo integral, incluindo dentre outras medidas, a

proibição de captura, transporte, armazenamento, manejo, beneficiamento e comercialização. E acrescenta que essas restrições estabelecidas não são aplicáveis aos exemplares para fins científicos, mediante a autorização de órgãos responsáveis (MMA. PORTARIA MMA Nº 445, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014).

Diante disso, percebemos as fortes violações com o compromisso da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) assinado por diversos países, incluindo o Brasil, demonstrando que são patrimônios biológico naturais fundamentais e não são inesgotáveis (DECRETO Nº 4.339/2002).

Nesta perspectiva, os tubarões costeiros são os mais impactados justamente pela degradação ambiental. Nestes casos, são oriundos da ocupação residencial e comercial, poluição e destruição de manguezais, o que fere os princípios do artigo 225 da constituição federal de 88, os quais é direito um ambiente ecologicamente equilibrado, sendo responsabilidade do poder público o dever de protegê-los para as presente e futuras gerações (Brasil, 2020). Como forma de mitigar, foi aprovado o Plano de Ação Nacional para Conservação das Espécies Ameaçadas e de Importância Socioeconômica do Ecossistema Manguezal - PAN Manguezal, com vista a proteção dos manguezais brasileiros, as espécies focos do PAN-Tubarões, respeitando seus usos e saberes das comunidades tradicionais, podendo conciliar com os conhecimentos científicos. A normativa deve ser desenvolvida em áreas estratégicas na costa brasileira (PORTARIA ICMBio Nº 09, DE 29 DE JANEIRO DE 2015).

Além disso, este PAN estabelece ações para conversação de 74 espécies de peixes até 2020, dos quais 20 são ameaçadas nacionalmente de extinção, incluindo as endêmicas na costa norte do Brasil (PORTARIA ICMBio Nº 09, DE 29 DE JANEIRO DE 2015).

Recentemente, foi desenvolvido um projeto de áreas marinhas e costeiras protegidas. Neste contexto, foi identificado áreas com alta relevância para pesca artesanal, e as que têm interação com espécies ameaçadas situadas na região Norte do Brasil, com intuito de proibir a pesca e, assim, conservar a biodiversidade regional resultante das capturas como fauna acompanhante ou acidental. O estabelecimento destas áreas marinhas se tornou necessário, haja vista que poderão ser utilizadas como área de recuperação de espécies altamente ameaçadas, servindo como berçário. Dentre as áreas com restrições de pesca, temos as desembocaduras que compreende os estados do litoral Norte (Ruffino, 2018).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a posição filogenética do Cação Pato (*Isogomphodon oxyrinchus*, Valenciennes, 1839) e a analisar a validade do gênero monotípico *Isogomphodon* (Gill, 1862). Descrever a constituição estrutural e os padrões evolutivos da sequência completa da região de controle do genoma mitocondrial de espécies de tubarões, bem como verificar se essa região altamente variável é potencialmente útil para a geração de análises genéticas.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Sequenciar regiões do DNA mitocondrial para *Isogomphodon oxyrinchus*;
- ✓ Esclarecer as relações filogenéticas de *Isogomphodon oxyrinchus* com as demais espécies que compõem a família Carcharhinidae.
- ✓ Proceder às análises estatísticas sobre o Status taxonômico e diversidade genética da espécie *Isogomphodon oxyrinchus*;

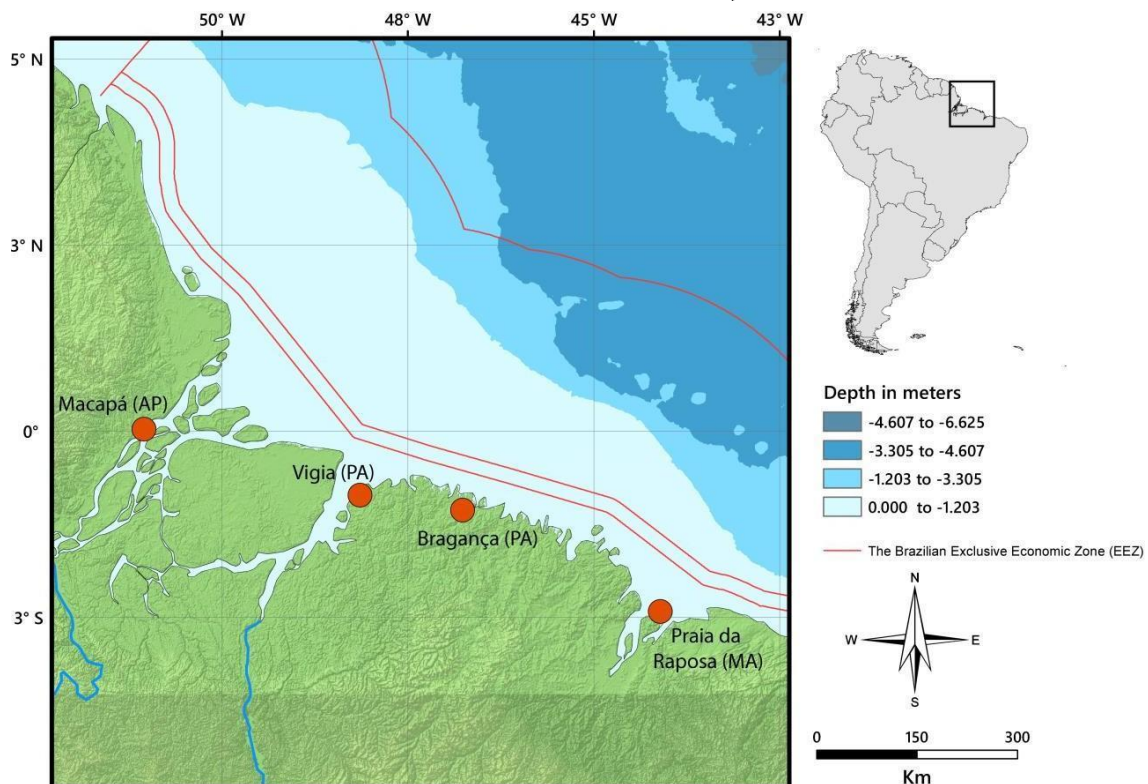
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato

5.1.1. Área de estudo e amostragem

Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas no litoral norte do Brasil. Esta última área, é uma das cinco regiões distintas da costa brasileira, classificadas de acordo com suas características climatológicas e oceanográficas (Amaral; Jablonski, 2005). O norte do Brasil vai desde a foz do rio Oiapoque, no extremo norte do estado brasileiro do Amapá, até a Baía de São Marcos, no estado do Maranhão (Isaac; Barthem, 1995; Pollon *et al.*, 2020) (Figura 3).

Figura 3- Área de estudo no norte do Brasil. Os pontos vermelhos representam os locais de amostragem nos estados brasileiros do Amapá (AP), Pará (PA) e Maranhão (MA). As inserções mostram os estados brasileiros do litoral norte e sua localização dentro do Brasil.



Fonte: Acervo dos autores.

Amostras de tecido muscular foram obtidas de *I. oxyrinchus* e outros tubarões capturados acidentalmente na Praia da Raposa (N= 1 amostra), no estado brasileiro do

Maranhão, Bragança (N = 10) e Vigia (N = 5), ambas no estado do Pará, e Macapá (N= 2), no estado do Amapá (Tabela 1, Figura 3). As amostras foram colocadas em micro tubos contendo álcool 70% e armazenadas a -20°C no Laboratório de Genética e Biotecnologia do campus Capanema da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA – Campus Capanema). A coleta de amostras foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO) através da licença nº 12773-1 emitida a Iracilda Sampaio, e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético Brasileiro e Conhecimento Tradicional Associado (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGen) por meio da autorização número AD61D8E.

Sequências de espécies representando gêneros das famílias Carcharhinidae (*Carcharhinus* Blainville, 1816; *Galeocerdo* Müller e Henle, 1837; *Glyphis* Agassiz, 1843; *Lamiopsis* Gill, 1862; *Loxodon* Müller e Henle, 1838; *Nasolamia* Compagno e Garrick, 1983; *Negaprion* Whitley, 1940; *Prionace* Cantor, 1849; *Rhizoprionodon* Whitley, 1929; *Scoliodon* Müller e Henle, 1838; e *Triaenodon* Müller e Henle, 1837), Triakidae (*Mustelus* Link, 1970), Scyliorhinidae (*Scyliorhinus* Blainville, 1816) e Sphyrnidae (*Sphyrna* Griffith e Smith, 1834) também foram incluídos nas análises filogenéticas. Essas sequências foram recuperadas do GenBank (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies utilizadas para análises filogenéticas com o código de depósito no *GenBank* para cada marcador empregado, com ênfase nos códigos destacados em negrito que fazem parte do acervo depositado pelos autores.

Família/Gênero	Espécies			
	mtDNA		nuDNA	
	COI (Genbank)	12S16S(Genbank)	ND4(Genbank)	RAG1(Genbank)
	<i>C. acronotus</i> (OK092567)	<i>C. acronotus</i> (OK169912)	<i>C. acronotus</i> (OK094394)	<i>C. acronotus</i> (OK104478)
	<i>C. falciformis</i> (FJ519607)	<i>C. falciformis</i> (OK169913)	<i>C. falciformis</i> (OK094395)	<i>C. falciformis</i> (OK104479)
	<i>C. leucas</i> (OK092568)	<i>C. leucas</i> (OK169914)	<i>C. leucas</i> (OK094396)	<i>C. leucas</i> (OK104480)
	<i>C. limbatus</i> (OK092569)	<i>C. limbatus</i> (OK169915)	<i>C. limbatus</i> (OK094397)	<i>C. limbatus</i> (OK104481)
	<i>C. perezii</i> (MH9111298)	<i>C. perezii</i> (OK169916)	<i>C. perezii</i> (OK094398)	<i>C. perezii</i> (OK104482)
Carcharhinidae	<i>C. plumbeus</i> (FJ519154)	<i>C. plumbeus</i> (OK169917)	<i>C. plumbeus</i> (OK094399)	<i>C. plumbeus</i> (OK104483)
<i>Carcharhinus</i>	<i>C. porosus</i> (OK092570)	<i>C. porosus</i> (OK169918)	<i>C. porosus</i> (OK094400)	<i>C. porosus</i> (OK104484)
	<i>C. albimarginatus</i> (HQ171610)	-	-	-
	<i>C. altimus</i> (FJ519046)	<i>C. altimus</i> (AY830722)	<i>C. altimus</i> (HM446375)	-
	<i>C. amblyrhynchoides</i> (GQ227287)	<i>C. amblyrhynchoides</i> (NC023948)	<i>C. amblyrhynchoides</i> (GQ227276)	-
	<i>C. amblyrhynchos</i> (KP193415)	-	<i>C. amblyrhynchos</i> (KX713064)	-
	<i>C. amboinensis</i> (JF493047)	<i>C. amboinensis</i> (KM921745)	<i>C. amboinensis</i> (HM446377)	-

	<i>C. brachyurus</i> (FJ519061)	-	-	-
	<i>C. brevipinna</i> (KM244770)	<i>C. brevipinna</i> (AY830723)	<i>C. brevipinna</i> (HM446389)	-
	<i>C. cautus</i> (EU398605)	-	-	-
	<i>C. coatesi</i> (JN313265)	-	-	-
	<i>C. dussumieri</i> (FJ519078)	-	<i>C. dussumieri</i> (GQ227279)	-
	<i>C. fitzroyensis</i> (KU366616)	-	<i>C. fitzroyensis</i> (HM446402)	-
	<i>C. galapagensis</i> (FJ519090)	-	-	-
	<i>C. isodon</i> (FJ519104)	<i>C. isodon</i> (AY830727)	-	-
	<i>C. leiodon</i> (JN034903)	-	-	-
	<i>C. longimanus</i> (EU396227)	<i>C. longimanus</i> (AY830733)	-	-
	<i>C. macloti</i> (EU398629)	<i>C. macloti</i> (KJ865755)	<i>C. macloti</i> (HM446410)	-
	<i>C. melanopterus</i> (FJ519127)	<i>C. melanopterus</i> (KJ720818)	-	-
	<i>C. obscurus</i> (KC470543)	<i>C. obscurus</i> (AY830737)	<i>C. obscurus</i> (KJ004551)	-
	<i>C. sealei</i> (EU398644)	-	-	-
	<i>C. signatus</i> (MH911151)	<i>C. signatus</i> (AY830744)	-	-
	<i>C. sorrah</i> (NC023521)	<i>C. sorrah</i> (KF612341)	<i>C. sorrah</i> (HM446413)	-
	<i>C. tilstoni</i> (GQ227285)	-	<i>C. tilstoni</i> (HM446458)	-
	<i>C. tjutjot</i> (KP091436)	<i>C. tjutjot</i> (KP091436)	-	-
	<i>G. fowlerae</i> (KT698062)	<i>G. fowlerae</i> (KT698062)	<i>G. fowlerae</i> (KT698062)	-
	<i>G. gangeticus</i> (KT698058)	<i>G. gangeticus</i> (KT698058)	<i>G. gangeticus</i> (KT698058)	-
<i>Glyphis</i>	<i>G. garricki</i> (KT698059)	<i>G. garricki</i> (KT698059)	<i>G. garricki</i> (KT698059)	-
	<i>G. glyphis</i> (KT698055)	<i>G. glyphis</i> (KT698055)	<i>G. glyphis</i> (NC021768)	-
	<i>G. siamensis</i> (KT698052)	<i>G. siamensis</i> (KT698052)	<i>G. siamensis</i> (KT698052)	-

<i>Lamiopsis</i>	<i>L. temminckii</i> (KT698048)	<i>L. temminckii</i> (KT698048)	<i>L. temminckii</i> (KT698048)	-
	<i>L. tephrodes</i> (KT698047)	<i>L. tephrodes</i> (KT698047)	<i>L. tephrodes</i> (KT698047)	-
<i>Negaprion</i>	<i>N. acutidens</i> (KP193438)	-	-	-
	<i>N. brevirostris</i> (FJ519235)	<i>N. brevirostris</i> (AY830756)	-	-
<i>Prionace</i>	<i>P. glauca</i> (NC0222819)	<i>P. glauca</i> (OK169919)	<i>P. glauca</i> (OK094401)	<i>P. glauca</i> (OK104485)
<i>Isogomphodon</i>	<i>I. oxyrhynchus</i> (OK092571)	<i>I. oxyrhynchus</i> (OK169920)	<i>I. oxyrhynchus</i> (OK094402)	<i>I. oxyrhynchus</i> (OK104486)
<i>Rhizoprionodon</i>	<i>R. acutus</i> (FJ519253)		<i>R. acutus</i> (HQ530209)	-
	<i>R. lalandii</i> (FJ519255)	<i>R. lalandii</i> (OK169921)	<i>R. lalandii</i> (OK094403)	<i>R. lalandii</i> (OK104487)
	<i>R. oligolinx</i> (MH429295)	-	-	-
	<i>R. porosus</i> (OK092572)	<i>R. porosus</i> (OK169922)	<i>R. porosus</i> (OK094404)	<i>R. porosus</i> (OK104488)
	<i>R. taylori</i> (EU399001)		-	-
	<i>R. terraenovae</i> (FJ519275)	<i>R. terraenovae</i> (AY830763)	-	-
<i>Loxodon</i>	<i>L. macrorhinus</i> (HQ171691)	<i>L. macrorhinus</i> (NC029843)	<i>L. macrorhinus</i> (NC029843)	-
<i>Triaenodon</i>	<i>T. obesus</i> (FJ519288)	<i>T. obesus</i> (KJ748376)	<i>T. obesus</i> (KJ748376)	-
<i>Scoliodon</i>	<i>S. laticaudus</i> (NC042504)	<i>S. laticaudus</i> (NC042504)	<i>S. laticaudus</i> (NC042504)	
	<i>S. macrorhynchus</i> (NC018052)	<i>S. macrorhynchus</i> (NC018052)	<i>S. macrorhynchus</i> (NC018052)	-
Galeocerdonidae <i>Galeocerdo</i>	<i>G. cuvier</i> (OK092573)	<i>G. cuvier</i> (OK169923)	<i>G. cuvier</i> (OK094405)	<i>G. cuvier</i> (OK104489)

	<i>S. tudes</i> (OK092574)	<i>S. tudes</i> (OK169924)	<i>S. tudes</i> (OK094406)	<i>S. tudes</i> (OK104492)
	<i>S. mokarran</i> (OK092576)	<i>S. mokarran</i> (OK169926)	<i>S. mokarran</i> (OK094408)	<i>S. mokarran</i> (OK104491)
Sphyrnidae <i>Sphyrna</i>	<i>S. lewini</i> (OK092577)	<i>S. lewini</i> (OK169927)	<i>S. lewini</i> (OK094409)	<i>S. lewini</i> (OK104490)
	<i>S. tiburo</i> (OK092575)	<i>S. tiburo</i> (OK169925)	<i>S. tiburo</i> (OK094407)	<i>S. tiburo</i> (OK104493)
	<i>S. zygaena</i> (OK092578)	<i>S. zygaena</i> (OK169928)	<i>S. zygaena</i> (OK094410)	<i>S. zygaena</i> (OK104494)
Triakidae <i>Mustelus</i>	<i>M. mustelus</i> (JN641215)	-	<i>M. mustelus</i> (KU523365)	-
	<i>M. higmani</i> (OK092579)	<i>M. higmani</i> (OK169929)	<i>M. higmani</i> (OK094411)	<i>M. higmani</i> (OK104495)
Scyliorhinidae <i>Scyliorhinus</i>	<i>S. canicula</i> (Y16067)	<i>S. canicula</i> (Y16067)	<i>S. canicula</i> (Y16067)	-
	<i>S. torazame</i> (AP019520)	<i>S. torazame</i> (AP019520)	<i>S. torazame</i> (AP019520)	-

5.1.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA genômico foi extraído usando o kit *Wizard Genomic DNA purification* (Promega Corporation), seguindo o protocolo mouse-tail. O produto de cada extração foi executado a 60V em gel de agarose 1% por 20 minutos e fotografado sob luz ultravioleta. Para a análise filogenética, fragmentos de três loci mitocondriais e um locus nuclear foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As PCRs foram executadas usando os seguintes primers para os loci mitocondriais: Fish F1 e Fish R2 (Ward *et al.*, 2005) para o gene da subunidade 1 do citocromo C oxidase (COI), ND4 F e Leu-Scyliorhinus (Naylor *et al.*, 2005) para o gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase (ND4), e 12SA e 16SA (Greig *et al.*, 2005) para uma região que abrange os genes 12S rRNA, Valine tRNA e 16S rRNA (12S-16S). O locus nuclear foi o Recombination Activating Gene 1 (RAG1), para o qual os primers foram Chon-Rag1-S026 e Chon-Rag1-R025 (Naylor *et al.*, 2005).

As PCRs foram executadas em um volume final de 12,5 µL, contendo 0,5 µM de cada primer, 0,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), tampão 1x (Tris-HCl [Invitrogen] e KCl, pH 7,8), 1U de Taq polimerase (Invitrogen: 5 U/µL), e aproximadamente 100ng/µL de DNA, com água ultrapura para completar o volume final. Dois primers internos foram desenvolvidos no presente estudo para sequenciar RAG1 – Rag-Tuba-For (5'-TAGATGAGTTTGTGAGTGGRCCG -3') e Rag- Tuba-Ver (5'-GGGTCTTGTGCAGRTAGTTGGTG -3').

O seguinte protocolo de PCR foi usado para amplificar todas as amostras: 5 minutos para desnaturação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 50–60°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C. Os amplicons resultantes foram purificados usando o protocolo polietileno glicol 20% (20% PEG), adaptado de Dun e Blattner (1987). O material purificado foi então precipitado e sequenciado com o kit *Big Dye* (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e sequenciado com o ABI 3500 Genetic Analyzer no Laboratório de Filogenômica da UFPA Bragança campus. Os primers internos adicionais para RAG1 (Chon-Rag1-S030 e Chon-Rag1-S031 (Naylor *et al.*, 2005)) e 12S-16S (Greig *et al.*, 2005) foram usados para sequenciar RAG1 e 12S-16S, respectivamente.

5.1.3. Análises filogenéticas e de distância genética

As sequências geradas durante esse processamento inicial foram editadas, alinhadas e corrigidas usando a ferramenta de alinhamento automático ClustalW (Thompson *et al.*, 1997), executada no BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). O programa Gblocks 0.91b (Talavera; Castresana, 2007) foi usado para processar as regiões ribossômicas 12S-16S para evitar erros de homologia nas porções desse fragmento sujeitas a indels e outras posições variáveis, que foram removidas seguindo critérios pré-estabelecidos (Castresana, 2000). Após as correções de alinhamento e sequenciamento, todas as sequências disponíveis foram analisadas separadamente para cada um dos quatro loci (quatro conjuntos de dados de marcadores únicos) e um conjunto de dados adicional de sequências mitocondriais concatenadas foi produzido para análises filogenéticas (doravante denominado “conjunto de dados mtDNA”). O conjunto de dados do mtDNA incluiu uma sequência representando cada uma das 37 espécies para as quais todos os três loci mitocondriais estavam disponíveis para concatenação.

A composição de nucleotídeos e os números de sítios conservados, variáveis e parcimoniosos, bem como os modelos de substituição de nucleotídeos mais adequados para cada conjunto de dados, foram calculados no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). O número de transições e transversões foram plotadas contra a divergência de cada região no DAMBE 7 para verificar os níveis de saturação dos marcadores (Xia, 2018). Matrizes de distância de nucleotídeos, com base nas distâncias corrigidas e p, foram geradas no MEGA X para os dados mitocondriais e nucleares (Kumar *et al.*, 2018). Quatro métodos diferentes de inferência filogenética foram usados para construir as árvores filogenéticas. A abordagem de Máxima Verossimilhança (ML) foi executada no PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), enquanto a Inferência Bayesiana (BI) foi aplicada no MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). As árvores Maximum Parsimony (MP) e Neighbor Joining (NJ) foram geradas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Árvores filogenéticas individuais também foram construídas em cada análise para cada locus. A robustez dos clados gerados pelas análises ML, NJ e MP foi estimada usando 1000 réplicas bootstrap (Felsenstein, 1985).

A inferência bayesiana foi baseada na amostragem MCMC (Markov Chain Monte Carlo), com quatro execuções simultâneas de quatro cadeias (uma fria e três quentes) e 50 milhões de gerações. As probabilidades a posteriori foram definidas usando a regra de 80% de consenso, com amostras sendo retiradas a cada 1000 gerações e 10% das árvores iniciais sendo descartadas como *burn-in*. Os arquivos de log-verossimilhança gerados por cada execução

foram visualizados no Tracer v.1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018), considerando apenas as execuções com um tamanho mínimo de amostra efetiva (ESS) de pelo menos 200 (ou seja, $ESS > 200$).

5.1.4. Estimativas de tempo de divergência

Os tempos de divergência foram estimados usando o modelo GTR, com as frequências de base sendo determinadas empiricamente, no BEAST 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019). O modelo Yule Calibration foi selecionado como o parâmetro prioritário da árvore, usando o relógio molecular relaxado com taxas não correlacionadas, que assume taxas heterogêneas nos diferentes ramos (Drummond *et al.*, 2006). Esta análise foi realizada usando o conjunto de dados mtDNA, uma vez que a maioria das sequências utilizadas como pontos de calibração estão disponíveis para os táxons aqui investigados.

Três pontos de calibração baseados no registro fóssil foram usados para estimar o tempo do Antepassado Comum Mais Recente (MRCA) dos clados principais, implantado a priori como a idade dos nós na árvore. O nó ancestral que está associado à origem dos Carcharhiniformes, é estimado em aproximadamente 148,5 milhões de anos atrás (Ma), enquanto os tempos de divergência de *Carcharhinus* e *Sphyrna* foram datados de ~38–42 Ma e ~16–23 Ma, respectivamente (Cappetta, 1987; Martin, 1995).

As pré-árvores foram modeladas com base na calibração do processo de especiação de Yule, com todos os outros parâmetros sendo baseados nos valores padrão do BEAST 2.5. As análises MCMC foram baseadas em uma corrida de 50 milhões de gerações, com quatro corridas simultâneas de quatro cadeias (uma fria e três aquecidas) amostradas a cada 100 gerações, com 10% das amostras sendo descartadas como *burn-in*. Os resultados foram inspecionados usando o Tracer v1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) e apenas execuções com um ESS de pelo menos 200 para todos os parâmetros marginais foram usados. Após descartar o *burn-in*, os resultados das execuções do MCMC foram submetidos ao TreeAnnotator v1.7 (Rambaut; Drummond, 2013) para inclusão dos tempos de calibração nos ramos da árvore final.

5.2. Descrição da região controle do DNA mitocondrial e diversidade genética de *C. oxyrinchus*

5.2.1. Amostragem, extração e sequenciamento de DNA

Para o presente estudo, dez espécies de tubarões foram coletadas sendo identificadas por meio da análise molecular de um fragmento mitocondrial que engloba os genes 12S rRNA, valina tRNA e 16S rRNA (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009). Utilizando também sequências da RC de forma completa ou parcial oriundas do *GenBank*, sendo adicionadas ao banco de dados, totalizando 40 espécies, compostas por oito gêneros da família Carcharhinidae Jordan & Evermann, 1896, 1 gênero da família Galeocerdonidae Poey, 1875; 1 gênero da família Triakidae Gray, 1851 e 1 gênero da família Scyliorhinidae Gill, 1862 utilizadas como *outgroup* para análises de estrutura da região controle e relações filogenéticas (Tabela 2). Já para as análises de diversidade genética de *C. oxyrinchus*, foram utilizadas 12 amostras, coletadas em três estados, sendo três amostras de tecido do Amapá- AP, oito de Vigia- PA e uma de São Luís- MA, passando pelo mesmo processo de identificação que as demais espécies.

O DNA total das 10 espécies coletadas e identificadas foi extraído usando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega Corporation), seguindo o protocolo mouse-tail. Após a extração, a PCR foi realizada nas amostras com um volume final de 25 μL , contendo: 0,25 μL de cada primer (Pro-L = 5 pmol/ μL , 12SrRNA = 5 pmol/ μL), 1 μL de MgCl_2 (50 mM), 4 μL de mistura dNTP (1,25 mM), 2,5 μL de tampão 10x (Invitrogen – Tris-HCl e KCl, pH 7,8), 0,2 μL de Taq (5 U/ μL) polimerase (Invitrogen), aproximadamente 100 ng do DNA total e água purificada para completar o volume final. O ciclo de temperatura para amplificação da região controle e os primers utilizados foram os descritos por Keeney *et al.* (2005).

Os amplicons resultantes foram purificados usando o protocolo polietileno glicol 20% (20% PEG), adaptado de Dun e Blattner (1987). O material purificado foi então precipitado e sequenciado com o kit *Big Dye* (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e sequenciado com o ABI 3500 Genetic Analyzer no Laboratório de Filogenômica da UFPA Bragança campus. Além dos primers mencionados acima, o primer F3 D-loop interno descrito por Keeney *et al.* (2005) foi incluído para o sequenciamento completo da região alvo.

Tabela 2- Sequências de DNA utilizadas para formação do banco de dados, divididas por famílias e contendo seus respectivos códigos de acesso para o GenBank e seu tamanho original, onde (p) representa amostras com tamanho parcial. As espécies sequenciadas que ainda não foram depositadas estão representadas por XXXX.

Família	Espécies	Cód. GenBank	Comprimento RC
	<i>Carcharhinus leucas</i> (Müller & Henle, 1839)	XXXX	1068
	<i>Carcharhinus acronotus</i> (Poey, 1860)	XXXX	1075
	<i>Carcharhinus limbatus</i> (Müller & Henle, 1839)	XXXX	1066
	<i>Carcharhinus porosus</i> (Ranzani, 1839)	XXXX	1065
	<i>Carcharhinus perezii</i> (Poey, 1876)	XXXX	1067
	<i>Carcharhinus plumbeus</i> (Nardo, 1827)	XXXX	1066
	<i>Carcharhinus oxyrhynchus</i> (Valenciennes, 1839)	XXXX	951(p)
	<i>Carcharhinus obscurus</i> (Lesueur, 1818)	KC470543.1	1.065
	<i>Carcharhinus sorrah</i> (Müller & Henle, 1839)	KF612341.1	1.065
	<i>Carcharhinus melanopterus</i> (Quoy & Gaimard, 1824)	NC_024284.1	1.066
	<i>Carcharhinus macloti</i> (Müller & Henle, 1839)	NC_024862.1	1.065
	<i>Carcharhinus longimanus</i> (Poey, 1861)	NC_025520.1	1.065
	<i>Carcharhinus tjujot</i> (Bleeker, 1852)	NC_026871.1	1.065
	<i>Carcharhinus amboinensis</i> (Müller & Henle, 1839)	NC_026696.1	1.066
	<i>Carcharhinus brevipinna</i> (Müller & Henle, 1839)	NC_027081.1	1.067
	<i>Carcharhinus albimarginatus</i> (Rüppell, 1837)	NC_047239.1	1.068
	<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> (Bleeker, 1856)	MT663280.1	1.066
	<i>Carcharhinus amblyrhynchoides</i> (Whitley, 1934)	NC_023948.1	1.066
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus brachyurus</i> (Günther, 1870)	NC_057525.1	1.060
	<i>Carcharhinus galapagensis</i> (Snodgrass & Heller, 1905)	MG241894.1	942 (p)
	<i>Carcharhinus isodon</i> (Müller & Henle, 1839)	KU255142.1	1.076
	<i>Carcharhinus signatus</i> (Poey, 1868)	MG787978.1	1.066
	<i>Triaenodon obesus</i> (Rüppell, 1837)	MN943497.1	1.063
	<i>Glyphis fowlerae</i> Compagno, White & Cavanagh, 2010	KT698062.1	1.065
	<i>Glyphis gangeticus</i> (Müller & Henle, 1839)	NC_028338.1	1.066
	<i>Glyphis garricki</i> Compagno, White & Last, 2008	NC_023361.1	1.066
	<i>Glyphis glyphis</i> (Müller & Henle, 1839)	NC_021768.2	1.065
	<i>Negaprion acutidens</i> (Rüppell, 1837)	FJ008699.1	1.077
	<i>Negaprion brevirostris</i> (Poey, 1868)	OQ476208.1	1.066
	<i>Lamiopsis tephrodes</i> (Fowler, 1905)	KT698047.1	1.068
	<i>Lamiopsis temminckii</i> (Müller & Henle, 1839)	KT698048.1	1.067
	<i>Loxodon macrorhinus</i> Müller & Henle, 1839	NC_029843.1	1.062
	<i>Scoliodon macrorhynchos</i> (Bleeker, 1852)	NC_018052.1	1.063
	<i>Scoliodon laticaudus</i> Müller & Henle, 1838	NC_042504.1	1.062
	<i>Rhizoprionodon porosus</i> (Poey, 1861)	XXXX	1.067
	<i>Carcharhinus glaucus</i> (Linnaeus, 1758)	NC_022819.1	1.067
Galeocerdonidae	<i>Galeocerdo cuvier</i> (Péron & Lesueur, 1822)	XXXX	1.065
Triakidae	<i>Mustelus higmani</i> Bleeker, 1854	XXXX	1.068
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus stellaris</i> (Linnaeus, 1758)	NC_066805.1	1.047
	<i>Scyliorhinus canicula</i> (Linnaeus, 1758)	NC_001950.1	1.074

5.2.2. Alinhamento, estrutura e comparação de sequências

Para o alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foi utilizado o Clustal W (Laekin *et al.*, 2007) presente como extensão no software BioEdit, v. 5.0.6 (Hall, 1999). As regiões de sequências conservadas foram identificadas por meio da busca por blocos conservados e trechos de baixa entropia média (*Entropy plots*). O *Entropy plots* indica o grau de substituição nucleotídica em um determinado sítio, baseada na fórmula $H(l) = - \sum f(b,l) \ln(f(b,l))$, onde $H(l)$ representa a entropia na posição l e $f(b,l)$ é a frequência com que um nucleotídeo b é encontrado na posição l .

Os domínios da RC foram determinados conforme a presença e distribuição dos blocos conservados encontrados ao longo do alinhamento do banco de dados e do perfil de substituições nucleotídicas determinado pela análise de *Entropy plots* (Hall, 1999). Subsequentemente os blocos de sequências conservadas (CSBs) foram identificados por meio de comparação de semelhanças com outros blocos disponíveis na literatura para diferentes táxons de vertebrados. Já o reconhecimento das sequências associadas à terminação da transcrição (TAS) se basearam no padrão de sequência descrito por Jemt *et al.* (2015), assumindo o formato padrão de “ATGN9CAT”, onde N9 representa as nove possíveis variações de nucleotídeos entre as trincas ATG e CAT. Devido a variação interespecífica que tende a ocorrer entre os componentes do banco de dados, os blocos CSBs e TAS, para fins de comparação entre as espécies, adotam o padrão de bases degeneradas da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), disponível em: <https://iupac.org/>.

5.2.3. Análise das Repetições em Tandem

Foram gerados diferentes padrões de repetições para uma mesma área do banco de dados, utilizando as análises de repetições em tandem realizadas através da versão online do programa *Tandem Repeat Finder* v. 2022, seguindo as orientações do site, inserindo as informações do banco de dado separadamente para cada espécie e sem os espaços entre os pares de base. A opção de análise escolhida foi do tipo avançada, possibilitando a alteração dos parâmetros, no entanto, a única alteração feita foi nos parâmetros de alinhamento (correspondência, incompatibilidade, *indels* - 2,5,7), mantendo a pontuação mínima de alinhamento para repetição do relatório em 50, tamanho máximo do período de 500 e tamanho máximo da matriz TR (bp, milhões) em 2, como previamente definido pelo programa.

Para espécies com mais de um resultado gerado pela análise, levou-se em consideração os valores disponibilizados para cada porcentagem de correspondência, porcentagem de indels e valor da entropia (Suplementar, tabela 3). as posições foram ajustadas para dos valores correspondentes a sua posição real no alinhamento com o banco de dados. a variação de repetições encontradas pelo software levou a delimitação de uma área dentro do banco de dados, formando uma região denominada *Box All*.

5.2.4. Diversidade genética

Por meio do programa DNAsp 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) foram identificados os haplótipos referentes a cada marcador utilizado, sendo apenas estes usados nas análises populacionais. Uma rede de haplótipos foi construída para mostrar as correlações genéticas entre os haplótipos existentes, utilizando o programa Haploviewer (Salzbzburger *et al.*, 2011). Os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) (Nei, 1987) para os marcadores mitocondriais foram obtidos no programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Os testes de neutralidade de Fu (F_s) (Fu, 1996) foram realizados no ARLEQUIN 3.1 para verificar se há desvios de neutralidade, e inferir sobre a história demográfica das populações identificadas. Valores de F_s significativamente diferentes de zero são indicativos de desvios de neutralidade, enquanto valores que tendem a ser negativos quando há excesso de mutações recentes são indicativos de desvios causados pelo crescimento populacional, assim como outras forças revolucionárias, tais como *hitchhiking* (Fu, 1997). Valores positivos indicam possível seleção balanceadora, subdivisão populacional ou efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*) (Tajima, 1989).

6. RESULTADOS

6.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato

6.1.1. Distâncias genéticas

Os marcadores mitocondriais (COI: 599 pares de bases (pb), NAD4: 813 pb e 12S16S: 1.252 pb) foram agrupados em um único conjunto de dados de 2.664 pb, com 1.050 locais variáveis, 830 locais informativos para parcimônia e 219 únicos locais de mutação. A

composição nucleotídica deste fragmento concatenado era de 28,4% de timina, 23,9% de citosina, 32,1% de adenina e 15,5% de guanina.

A sequência RAG1 tinha 1.110 pb, com 122 sítios variáveis, 72 sítios informativos e 50 mutações únicas. A composição nucleotídica era de 24,9% de timina, 17,7% de citosina, 33,0% de adenina e 24,4% de guanina. Nenhum dos segmentos estava saturado, visto que as taxas de transição observadas foram maiores que as taxas de transversão em todos os casos (Apêndice: Figura 1).

As matrizes de distância p (distP) e corrigida (distC) foram geradas para os conjuntos de dados mtDNA e RAG1 (Tabela 3) para calcular os intervalos de divergência par a par entre as espécies de estudo (Apêndice: Tabelas 1 e 2). No caso das distâncias corrigidas, o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para o conjunto de dados mtDNA foi o modelo GTR+G(0,5093)+I(0,4665), enquanto o melhor ajuste para os dados RAG1 foi o modelo TN93+G(0,0963). No caso da matriz distP, as distâncias genéticas entre *I. oxyrinchus* e as demais espécies de Carcharinídeos variaram de 4,8% a 11,2% para o mtDNA e de 0,5% a 3,4% para RAG1. Nas comparações baseadas na matriz distC, as distâncias variaram de 5,8% a 19,3% para o mtDNA e de 0,6% a 5% para RAG1.

Tabela 3- Distâncias médias de p (distP) e corrigidas (distC) calculadas para as comparações entre *I. oxyrinchus* e as demais espécies de carcharinídeos analisadas no presente estudo. As análises foram baseadas no modelo GTR+G (0,5093)+I (0,4665) para o conjunto de dados mtDNA (COI, ND2 e 12S/16S) e no modelo TN93+G (0,0963) para o gene RAG1

a)

RAG1						
<i>I. oxyrinchus</i>						
	distP			distC		
Espécies do gênero	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
<i>Carcharhinus</i>	0.77	0.5	1.1	0.87	0.6	1.2
<i>Prionace</i>	1.4	1.4	-	1.6	1.6	1.6
<i>Galeocerdo</i>	3.2	3.2	-	4.5	4.5	4.5
<i>Rhizoprionodon</i>	3.35	3.3	3.4	4.95	4.9	5.0

b)

Espécies do gênero	mtDNA					
	<i>I. oxyrhynchus</i>					
	distP			distC		
	Média	Mínimo	Máximo	Méda	Mínimo	Máximo
<i>Carcharhinus</i>	5.65	4.8	6.8	7.06	5.8	8.7
<i>Prionace</i>	6.4	6.4	-	8.4	8.4	8.4
<i>Triaenodon</i>	6.6	6.6	-	8.8	8.8	8.8
<i>Lamiopsis</i>	7.35	7.3	7.4	9.85	9.8	9.9
<i>Glyphis</i>	7.54	7.4	7.8	10.12	9.9	10.5
<i>Rhizoprionodon</i>	8.65	8.6	8.7	12.9	12.9	-
<i>Galeocerdo</i>	9.5	9.5	-	14.5	14.5	-
<i>Loxodon</i>	9.8	9.8	-	15.2	15.2	-
<i>Scoliodon</i>	11.15	11.1	11.2	19.1	18.9	19.3

As distâncias genéticas intergenéricas médias foram registradas entre *I. oxyrhynchus* e as espécies de *Carcharhinus*, tanto para os conjuntos de dados mtDNA (distP = 5,65%; distC = 7,06%) quanto para RAG1 (distp = 0,77%; distC = 0,87%) (Tabela 3, Apêndice: Tabelas 1 e 2). Os significativos valores registrados entre *I. oxyrhynchus* e as espécies de *Carcharhinus* são consistentes com os registrados dentro do gênero *Carcharhinus*, ou seja, 3,6–6,8% para o mtDNA e 1,4–7,9% para RAG1 (Apêndice: Tabelas 1 e 2). Valores de distância genética muito maiores foram registrados entre *I. oxyrhynchus* e as espécies dos demais gêneros analisados no presente estudo, ou seja, *Rhizoprionodon*, *Loxodon* e *Scoliodon* (Carcharhinidae) e *Galeocerdo* (Galeocerdonidae) (Tabela 3; Apêndice: Tabelas 1 e 2).

6.1.2. Análise filogenética e tempos de divergência

As árvores de inferência filogenética geradas separadamente para os conjuntos de dados concatenados de mtDNA e RAG1 (Figura 4) e para cada locus (Apêndice: Figura 7) resultaram em topologias geralmente semelhantes indicando parafilia de *Carcharhinus*, com arranjos incluindo *I. oxyrhynchus*, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) e *Triaenodon obesus* (Rüppell, 1837), dentro do clado *Carcharhinus*. Houve um apoio particularmente forte para a colocação interna de *I. oxyrhynchus* e *P. glauca* dentro deste clado nas análises BI dos loci COI e 12S-

16S (Apêndice: Figuras 4 e 4a). A árvore nuclear RAG1 mostrou *I. oxyrhynchus* dentro de *Carcharhinus*, mas colocou *P. glauca* como mais intimamente relacionado com *Rhizoprionodon* e *Galeocerdo* (Figura 4 (b)), mas a cobertura táxon para os dados nucleares foi menor (apenas sete *Carcharhinus* e nenhum *T. obesus*), e as relações filogenéticas não foram significativamente apoiadas.

Além das análises filogenéticas anteriores (Figura 4), as probabilidades posteriores para todos os nós do tempo até a análise do ancestral comum mais recente (TMRCA, Figura 4) são fortes (PP > 0: 9), colocando *Isogomphodon* e *Prionace* conclusivamente dentro o gênero *Carcharhinus*. *P. glauca* diversificou-se de sua espécie irmã na árvore (*C. falciformis*) durante o Mioceno, aproximadamente 16,61 milhões de anos atrás (~9,68–23,98 milhões de anos atrás), praticamente durante o mesmo período em que *I. oxyrhynchus* e *C. porosus* se separaram em aproximadamente 16,44 milhões de anos atrás (~9,38–23,74 milhões de anos). Uma outra característica importante das estimativas do TMRCA é a subdivisão do gênero *Carcharhinus* em pelo menos três subclados monofiléticos, todos com altos valores de probabilidade posterior, que divergiram durante o Oligoceno. O clado composto por *I. oxyrhynchus*, *C. porosus*, *Carcharhinus brevipinna* (Valenciennes, 1839) e *Carcharhinus acronotus* Poey, 1860 teve um TMRCA estimado de aproximadamente 26,37 mya (19,12–33,26). É um clado irmão do clado *Carcharhinus limbatus* (Valenciennes, 1839) + *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) + *Carcharhinus amblyrhynchoides* (Bleeker, 1856) que tem um TMRCA de cerca de 22,29 mya (15,29–28,99) e o *P. glauca* + *C. falciformis* + *Carcharhinus obscurus* Lesueur, 1818 + *Carcharhinus perezi* (Valenciennes, 1839) + *Carcharhinus sorrah* (Valenciennes, 1839) clado que tem um TMRCA de cerca de 26,01 Ma (19,42–32,51)

Houve fraco suporte para um subclado *Carcharhinus* + *Isogomphodon* + *Prionace* dentro do clado *Triaenodon* + *Carcharhinus* + *Isogomphodon* + *Prionace* deixando a localização filogenética de *Triaenodon* como incerta. O clado *Triaenodon* + *Carcharhinus* + *Isogomphodon* + *Prionace* compartilha um TMRCA com o clado irmão *Glyphis* + *Lamiopsis* em aproximadamente 48,24 Ma atrás (39,98–58). Os gêneros *Rhizoprionodon*, *Loxodon* e *Scoliodon* são então os componentes mais antigos dos Carcharhinídeos restantes, que se diversificaram durante o Eoceno, por volta de 49,31 milhões de anos atrás (33,91–64,75 Ma atrás). Finalmente, há um clado de suporte relativamente fraco formado por *Galeocerdo* (Galeocerdonidae) e *Sphyrna* (Sphyrnidae) que aparece como um grupo irmão do clado formado pelas espécies de carcharhinídeos, que se separaram no final do Paleoceno, aproximadamente 54,92 Ma atrás (~35,22 – 75,39 Ma). O TMRCA estimado para

Carcharhinidae + Galeocerdonidae + Sphyrnidae indica que este grupo começou a diversificar no final do Cretáceo e início do Paleoceno, por volta de 70,68 milhões de anos atrás (54,25-89,21 Ma atrás).

As subdivisões de *Carcharhinus* observadas na análise TMRCA também são aparentes nas inferências filogenéticas baseadas no conjunto de dados do mtDNA (Figura 4 (a)), embora sem suporte, (exceto para 0.9). As distâncias genéticas entre esses subclados foram as mesmas observadas nas comparações entre *I. oxyrinchus* e as espécies de *Carcharhinus* (mtDNA: distP: 5,5–5,8%, distC: 5,9–6,2%; RAG1: distP e distC: 0,8–0,9%).

No geral, os métodos filogenéticos (21 árvores representando análises de tempo de divergência de NJ, ML, MP, BI e TMRCA) gerados no presente estudo definem um arranjo parafilético para o gênero *Carcharhinus* em relação ao que foi anteriormente classificado como *I. oxyrinchus* e *P. glauca* e possivelmente também *Triaenodon*. Dada esta evidência molecular, reconhecemos oficialmente a combinação anterior *Carcharhinus oxyrinchus* (vs. *I. oxyrinchus*) e propomos a nova combinação *Carcharhinus glaucus* (vs. *P. glauca*).

Figura 4- Árvores consenso mostrando as relações filogenéticas das espécies da família Carcharhinidae, geradas pelos métodos ML, NJ, MP e BI, para (a) o conjunto de dados mtDNA (COI, ND2 e 12S+16S), com base em o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G (0,5093) + I (0,4665) e (b) RAG1 (baseado no modelo TN93+G (0,0963)). Os símbolos representam três diferentes níveis de suporte: (*) = *bootstrap* > 90%, probabilidade posterior > 0,9; (▲) = *bootstrap* > 70%, probabilidade posterior > 0,9; (■) = probabilidade posterior > 0,7. Os ramos sem símbolos têm valores de suporte inferiores a 70% (*bootstrap*) ou 0,70 (probabilidade posterior).

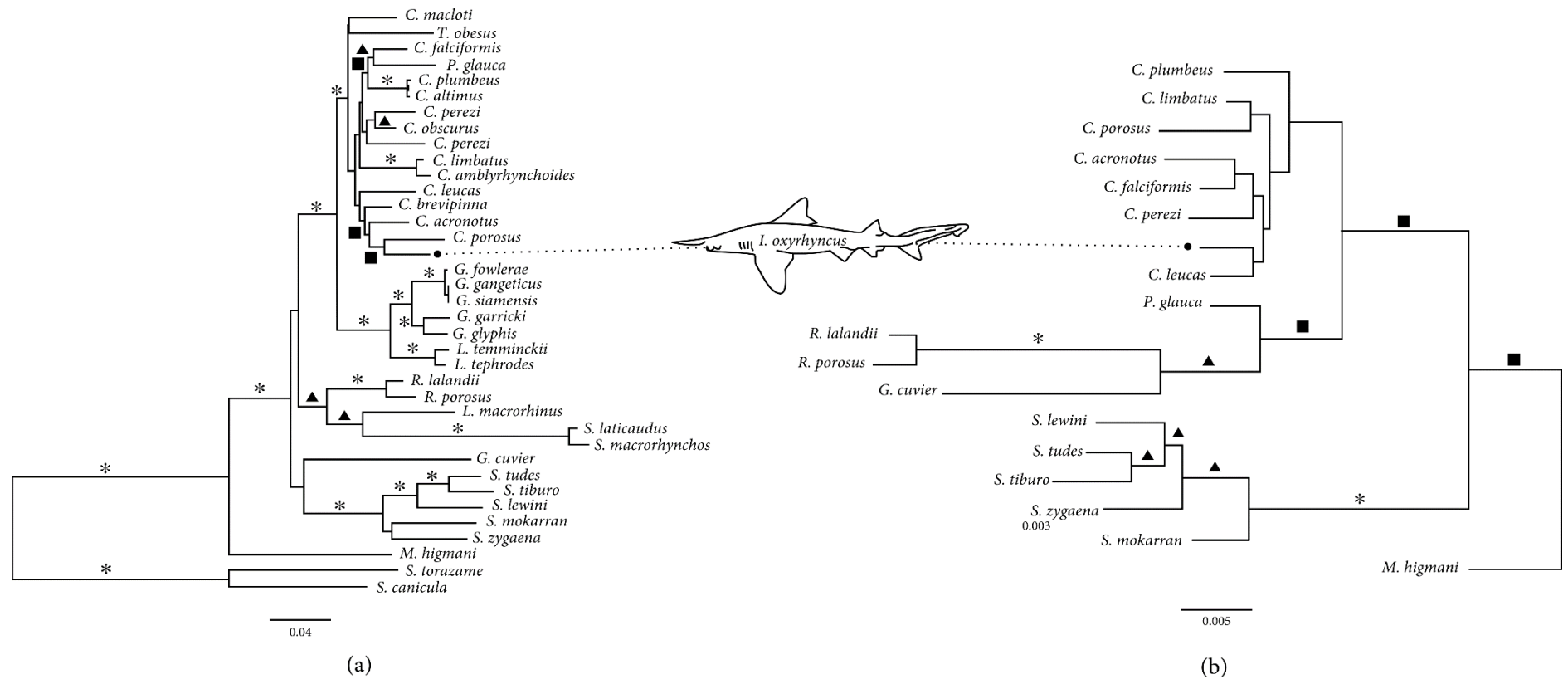
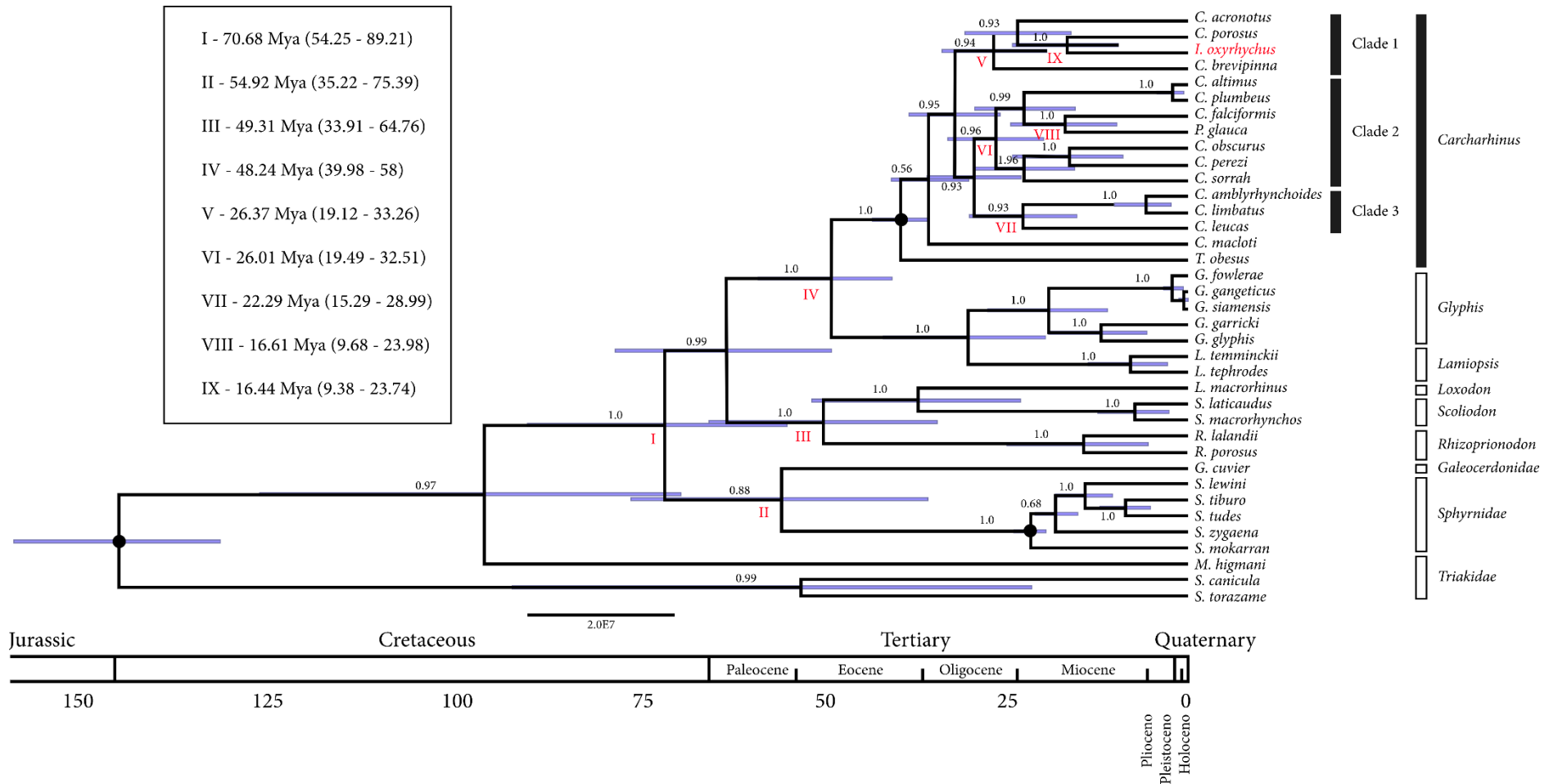


Figura 5- Árvore consenso mostrando o tempo de divergência estimado de cada nó ancestral da família Carcharhinidae, com o respectivo limite de confiança (barras roxas horizontais). A inserção mostra os valores registrados para cada nó marcado com um numeral romano. Os pontos de calibração são destacados por círculos pretos.



6.2. Descrição da região controle do DNA mitocondrial e diversidade genética de *C. oxyrhynchus*

6.2.1. Caracterização estrutural da região controle em tubarões

Nosso estudo foi baseado em um banco de dados de 1154 pares de bases nucleotídicas, composto por 40 espécies de tubarões de quatro famílias distintas, contendo sequências completas e parciais da região controle do DNA mitocondrial (Tabela 2). A composição nucleotídica estimada apresentou um alto percentual de adenina e timina para o banco de dados, sendo a composição de guanina a menor entre as quatro bases nucleotídicas (T – 35.1%; C – 19.7%; A – 32.1% e G – 13.2%) (Tabela 4). Os sítios invariáveis (V) e a taxa de transição versus transversão (R) para este banco de dados foram de 581 e 1.55, respectivamente Tabela 4).

Tabela 4- Composição nucleotídica para as 40 espécies do banco de dados, representadas por domínio (HV 3', Central e HV 5') e para a região controle (RC) como um todo. Contendo também os valores para sítios invariáveis (V) e a taxa de transição versus transversão (R).

	T	C	A	G	V	R
HV 3'	36.9%	20.0%	32.7%	10.5%	106/244	2.44
Central	34.0%	19.8%	29.4%	16.8%	181/310	1.64
HV 5'	31.1%	18.6%	36.2%	14.2%	294/600	1.74
RC	35.1%	19.7%	32.1%	13.2%	581/1154	1.55

A busca por blocos conservados se deu tanto para o banco de dados contendo apenas representantes da família Carcharhinidae quanto para o que continha as famílias representantes do *outgroup*, resultando em 17 blocos conservados (BC) divididos em três domínios, sendo eles: Hiper variável 5' (HV 5'), Central e Hiper variável 3' (HV 3'). Os 9 BC presentes na HV 5' se distribuíram entre os sítios 59 e 571 pb com uma distribuição de 13 e 30 pares de bases por bloco, os 5 BC da Central se distribuíram entre 621 e 903 pb com uma distribuição de entre 12 e 50 pb por bloco e os 3 BC do domínio HV 3' se distribuíram entre 923 e 1086 pb com blocos de 12 a 30 pb de comprimento.

Variações mais abundantes entre os bancos de dados foram observadas principalmente para os Scyliorhinideos, onde alguns blocos conservados para as outras espécies não condizem com os encontrados no padrão de *S. stelares* e *S. canícula*, sendo computados padrões onde se teve mais de 5 pb diferentes por bloco, encontramos mais de 6 nucleotídeos diferentes nos blocos conservados distribuídos na HV 5', chegando até 15 nucleotídeos no bloco conservado

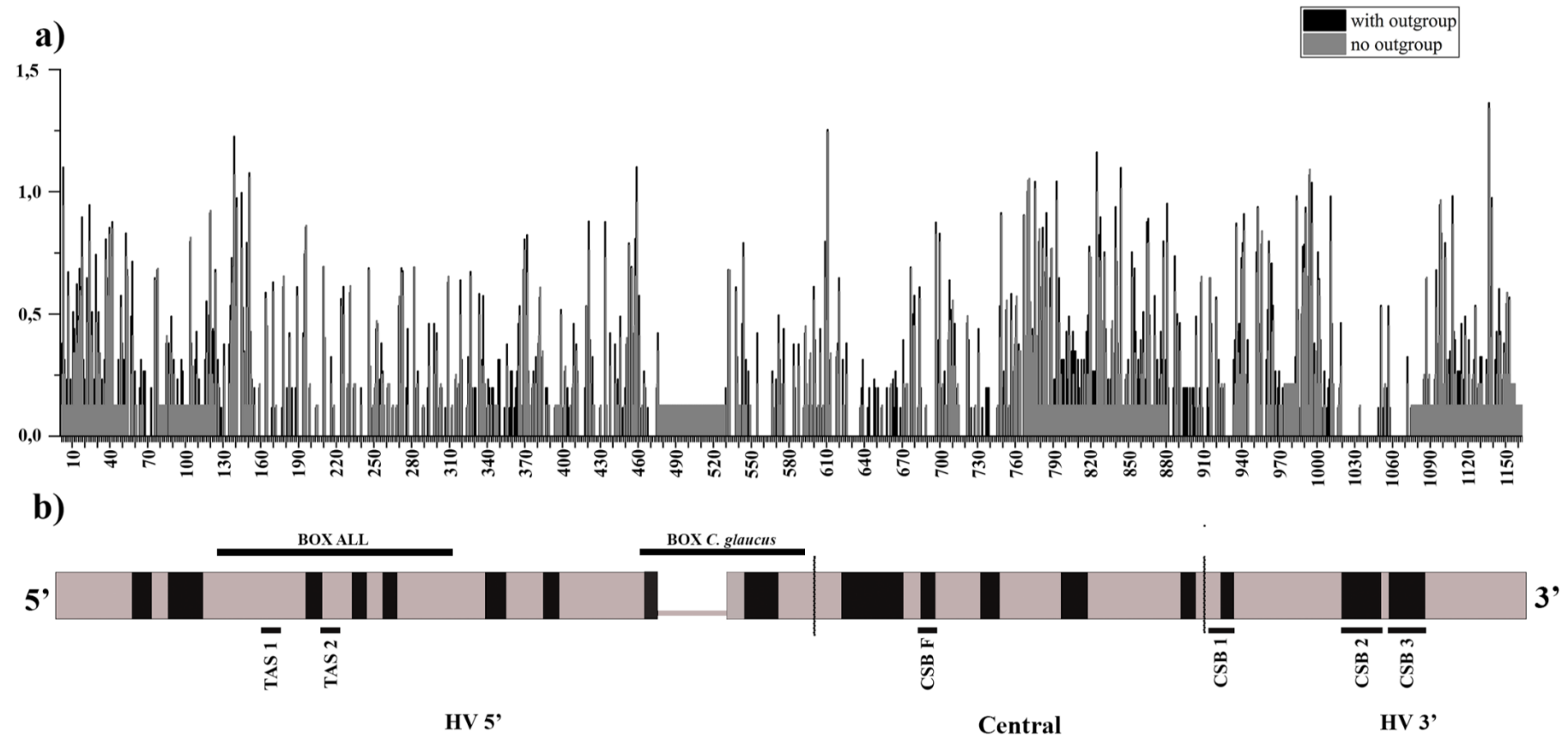
do domínio Central (Apêndice: Tabela 3).

Os valores de Entropia quantificam a variabilidade por sítio de acordo com a frequência com que as bases nucleotídicas (A, C, G e T) ocorrem no mesmo sítio. A análise para a família Carcharhinidae (Figura 6-a), forneceu índices de variação de até 1,3 H para alguns sítios, com médias entre 0 e 1 H para a maioria dos sítios. Com base nesses valores, e no arranjo dos blocos conservados foi possível identificar os domínios 5' e 3', com aproximadamente 600 bps e 188 bps, respectivamente, bem como o domínio central, com cerca de 365 bps.

Uma vez estabelecidos os domínios, as sequências associadas ao término de replicação (TAS) e CSBs foram identificadas por meio de comparações com sequências provenientes da literatura, juntamente com os blocos conservados estabelecidos em análises anteriores (Figura 6-b). Dois blocos observados no domínio 5' foram muito semelhantes aos blocos de sequência associados ao término da replicação (TAS1: 5'-**ATGYWTAAYMCYCAT**-3' e TAS-2: 5'-**ATGYWTAATMCRCAT**-3') (Figura 6-b).

Neste estudo, identificamos apenas a região CSB-F (5'-RRMTATYCTCGACA-3') na região central, e os CSB-1 (5'-HTCA(Y/-)TDTMTYTGGCATAD-3'), CSB-2 (5'-GTAAAAACCCCC(C/-)TCCCCCTT-3') e CSB-3 (5'-GAAAAACCCWAAAACGA-3') no domínio 3' (Figura 6).

Figura 6- Padrões de entropia e análise compilada dos dados a). gráfico de entropia composto por barras que representam os *outgroups* (em preto) e sem *outgroups* (em cinza), sobrepostos para enfatizar as diferenças de variação a presença deste grupo externo. b) A barra representa cinza representa o “genoma” da Região Controle de todas as espécies, com uma área pertencente somente a *C. glaucus* e em branco para as outras espécies, dividida em três domínios: Hiper variável 5’, Central, Hiper variável 3’; os blocos pretos representam áreas conservadas e as linhas horizontais representam as regiões funcionais e os Boxes de repetição.



6.2.2. Padrões de repetição em tandem

O banco de dados foi submetido a uma análise de busca por blocos de repetição em tandem, no qual encontramos uma porção de ocorrência das repetições, para todas as espécies analisadas, denominada *Box All* no domínio HV5' situada entre os sítios 124 e 303 (197pb). Nesta porção observamos diferentes perfis de duplicação, variando entre perfis com números de repetições incompletas variando entre 1.9 e 3.3 repetições, e espécies com perfis da repetição completa, se apresentando caracteristicamente em 2 repetições começando no sítio 154 e finalizando no sítio 249, com exceção de *Scyliorhinus stellaris* sendo o único a apresentar 3 repetições completas (Apêndice: Figura 8 e Tabela 4). No entanto o software não localizou nenhum padrão de repetição para 30% das espécies nos níveis de análise definidos (Apêndice: Tabela 4)

A repetição disposta entre os sítios 154 e 249 foi observada para 40% das espécies presentes no banco de dados, com motif de tamanho médio de 46 nucleotídeos, para compreender melhor a sua distribuição dentro do *Box All* e possibilitar a compreensão das demais variações, como a de *C. oxyrhynchus* e *C. glaucus* que recebem destaque no presente estudo, foi gerada uma imagem suplementar, disponível como apêndice, Figura 8-b e 8-c.

Na espécie *C. glaucus*, observamos mais um bloco de repetições em tandem do tipo incompletas com o tamanho de 2.5, compreendendo uma região de 132 pb entre os sítios 462 e 594 do domínio HV5'. Esse padrão específico causa uma lacuna de 132 pb em relação às demais espécies analisadas durante o alinhamento das sequências (Apêndice: Tabela 4).

6.2.3. Variabilidade genética de *Carcharhinus oxyrhynchus*

As análises de variabilidade intraespecífica, detalhando a proporção de sítios variáveis foram realizadas para 12 amostras de tecido muscular de espécimes de *C. oxyrhynchus*, realizada utilizando a região controle (951 pares de base) e um fragmento concatenado com porções dos genes mitocondriais COI (638 pb) e Citb (568 pb) totalizando para as análises de variabilidade um fragmento de genes mitocondriais de 1206 pares de bases. Neste último

fragmento foi observado que todos os indivíduos compartilham o mesmo haplótipo, apresentando, assim, níveis de diversidade genética zero.

Para o fragmento da região controle, apenas três sítios variáveis (correspondentes ao domínio 5' da região controle). Vale ressaltar que este fragmento não contém uma porção de 112 pb da região central. Em relação aos sítios variáveis observados na HV 5', nota-se que estes sítios se apresentam em uma região que compreende entre os sítios 176-425 (249 pb) do fragmento amplificado, onde se concentra toda a variação intraespecífica encontrada para *C. oxyrinchus*. Segundo os sítios variáveis foram observados cinco haplótipos, sendo o haplótipo 4 o mais frequente sendo compartilhado por oito indivíduos, seguido dos haplótipos únicos (Figura 7). De acordo com os índices de diversidade genética, encontramos valores moderados de diversidade haplotípica ($h - 0,5758 \pm 0,1634$) e baixos valores de diversidade nucleotídica ($\pi - 0,000348 \pm 0,000292$).

Os testes de neutralidade foram calculados apenas para o fragmento da região controle, devido ao fragmento COI+Citb não apresentar variação genética. Estes testes apresentaram valores negativos, contudo apenas o teste de Fu's F_s foi significativo (Tajima's D : -0,27845 $P > 0,05$; Fu's F_s : -2,14438 $P < 0,05$). Estes resultados somados ao observado no gráfico de diferenças par a par, produzido apenas para a região controle, indicam um crescimento populacional para a espécie após um evento de redução populacional (gargalo populacional) (Figura 8).

Figura 7- Rede de haplótipos mostrando as relações dos diferentes haplótipos encontrados neste estudo para a espécie *Carcharhinus oxyrinchus*. a – Rede de haplótipos produzida a partir do fragmento mitocondrial (COI+Citb); b - Rede de haplótipos produzida a partir do fragmento da região controle.

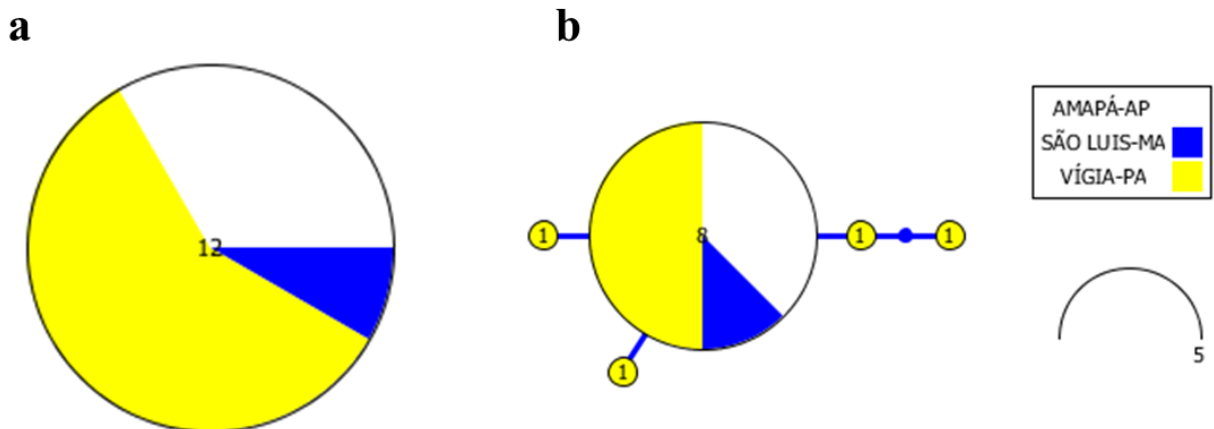
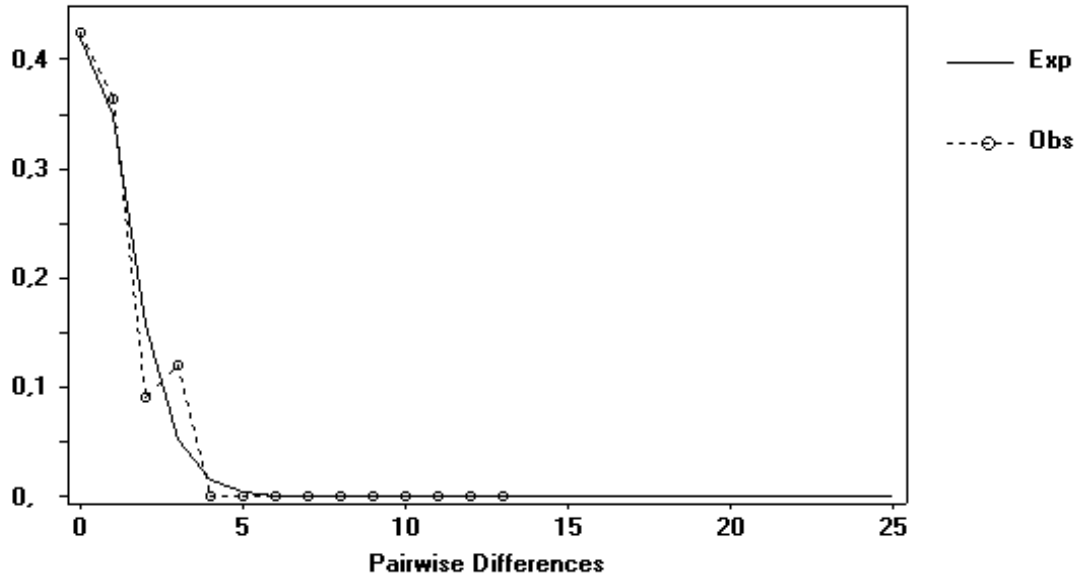


Figura 8- Gráfico da frequência das diferenças par a par da população de *Carcharhinus oxyrhynchus* de parte do fragmento da região controle. As linhas pontilhadas representam a distribuição observada (Obs) enquanto a linha inteira representa valores esperados (Exp), segundo modelo de expansão-declínio populacional.



7. DISCUSSÃO

7.1. História evolutiva e reclassificação taxonômica do tubarão pato

7.1.1. Os Carcharhinidae, *Carcharhinus* e *Isogomphodon*

Os resultados deste estudo refletem a longa e controversa história da classificação taxonômica de *C. oxyrhynchus*, originalmente descrito como *Carcharias oxyrhynchus*, reatribuído a *Isogomphodon* e então atribuído como *Carcharhinus*, antes de Springer (1950) e estudos posteriores ressuscitarem o gênero *Isogomphodon* (Compagno, 1984). Gill (1862) criou o gênero *Isogomphodon* para acomodar *I. oxyrhynchus*. *Isogomphodon maculipinnis* Poey, 1865, adicionado posteriormente, é agora considerado sinônimo de *Carcharhinus brevipinna* (Compagno, 1984). Rodrigues Filho *et al.* (2009) levantaram a hipótese de que o tubarão pato era na verdade um membro do gênero *Carcharhinus*, com base em uma filogenia fracamente apoiada e com baixa cobertura taxonômica, resultado do fato de que o estudo se concentrou principalmente na identificação de espécies, em vez de resultados de inferência filogenética, e não buscando fazer alterações de classificação.

Compagno (1984) propôs a alocação de tribos dentro dos Carcharhinidae, caso em que *C. oxyrhynchus* seria atribuído à tribo Isogomphodontini, com base em suas características morfológicas únicas. Essas diferenças levaram Garrick (1982) a excluir *C. oxyrhynchus*, juntamente com outras cinco espécies, de um estudo que visava definir os limites de *Carcharhinus* (Garrick, 1982), com base na evidência de variáveis como morfologia externa, parâmetros morfométricos e merísticos, e coloração. Garrick (1982) concluiu que a utilização destas características para a avaliação da sistemática deste gênero deveria ser reconsiderada, dado que, apesar da sua importância ao nível da espécie, são inconclusivas para a definição de arranjos subgenéricos ou inferências sobre as relações entre *Carcharhinus* e outros gêneros semelhantes.

Carcharhinus oxyrhynchus é um tubarão demersal que habita águas rasas e lamacentas em áreas costeiras e estuarinas, embora poucos dados estejam disponíveis sobre suas características biológicas básicas (Lessa, 1997). Esta espécie, no entanto, possui uma série de características morfológicas únicas que a distinguem de todos os outros Carcharhinídeos, como a relação entre a barbatana peitoral e o tamanho do corpo, bem como o focinho achatado e alongado e o tamanho significativamente reduzido dos olhos (Compagno, 1984), que está provavelmente associado às águas lamacentas que este tubarão habita e à sua predação de organismos bentônicos e nectônicos (Compagno, 1984; Stride *et al.* 1992). A cabeça e as barbatanas também são sexualmente dimórficas (Martins *et al.*, 2015), o que pode estar associado a padrões de comportamento de acasalamento (Crooks; Waring, 2013). Silva (2021) apresentou uma descrição anatômica de *C. oxyrhynchus* baseada na análise de características esqueléticas, incluindo a série dentária e a morfologia do neurocrânio, arcos mandibular e braquial, claspers, nadadeiras e dentículos dérmicos, que foi usada para comparações sistemáticas com outros membros da família Carcharhinidae. Silva (2021) inicialmente comparou *C. oxyrhynchus* com as espécies fósseis atribuídas ao gênero *Isogomphodon*, incluindo *Isogomphodon acuarius* (Probst, 1879), *Isogomphodon lerichei* (Darterville e Casier, 1943), *Isogomphodon gracilis* (Jonet, 1966), *Isogomphodon caunellensis* (Cappetta, 1988) e *Isogomphodon aikenensis* (Cicimurri e Knight, 2019), afirmando que apenas os táxons fósseis *C. aikenensis* e *C. acuarius* deveriam ser mantidos em *Isogomphodon* enquanto outros táxons foram atribuídos a *Carcharhinus*. *I. aikenensis* e *I. acuarius* devem, portanto, agora também ser reconhecidos como *Carcharhinus aikenensis* n. pentear. e *Carcharhinus acuarius* n. pentear. Sorenson *et al.* (2014) também descobriram que *C. porosus* e *T. obesus* são as espécies de Carcharhinídeos mais semelhantes a *C. oxyrhynchus*. Embora não tenham sido encontradas

semelhanças exclusivas entre *C. oxyrinchus* e *C. porosus*, 26 (58%) das 45 características analisadas foram altamente semelhantes, incluindo a morfologia dos dentes inferiores, que possuem coroa alongada, com raízes estreitas nas fileiras anteriores (Silva, 2021). A morfologia distinta de *C. oxyrinchus* não exclui esta espécie do gênero *Carcharhinus*, dado que a topologia das árvores e as distâncias genéticas encontradas no presente estudo apoiam enfaticamente a inclusão desta espécie em *Carcharhinus*. Os resultados também são consistentes com achados anteriores do arranjo parafilético de *Carcharhinus* considerando *C. glaucus* (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Vélez-Zuazo; Agnarsson, 2011; Naylor *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2018; Dorsay-Akbulut, 2008; Compagno 1984; Kousteni *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022; Springer, 1951), mas esta é a primeira vez que é reconhecido como um nova combinação e todos os táxons fósseis em *Prionace* (*Prionace antiquus* (Agassiz, 1856), *Prionace egertoni* (Agassiz, 1843) e *Prionace tenuis* (Agassiz, 1843) também devem ser realocados para *Carcharhinus* ou reconhecidos como novas combinações. O conjunto de dados relativamente grande empregado no presente estudo, juntamente com as abordagens filogenéticas robustas aplicadas nas análises, apoiam esta conclusão. No entanto, serão necessárias mais pesquisas utilizando mais dados nucleares e uma cobertura taxonômica mais completa para reavaliar a classificação do *Triaenodon*, bem como a estrutura filogenética do gênero *Carcharhinus*.

As subdivisões bem fundamentadas do gênero *Carcharhinus* estabelecidas na análise TMRCA são consistentes com as descobertas de Springer (1950, 1951), Garrick (1982) e Compagno (1988). Springer (1950, 1951) sugeriu a divisão do *Carcharhinus* em dois grupos de tubarões, aqueles com costas lisas e aqueles com costas estriadas. No presente estudo, as estimativas do TMRCA também apoiam uma divisão entre os tubarões de dorso liso (clado 1: *C. acronotus*, *C. brevipinna*, *C. porosus* e *C. oxyrinchus* e clado 3: *C. leucas*, *C. limbatus* e *C. amblyrhynchoides*) e as formas com dorso de crista (clado 2: *C. glaucus*, *C. falciformis*, *C. obscurus*, *C. plumbeus*, *C. perezi* e *C. sorrah*). Naylor (1992) referiu-se a um clado monofilético de grandes tubarões com cristas dérmicas interdorsais, que incluía *C. sorrah*, *C. longimanus*, *C. falciformis*, *C. plumbeus*, *C. altimus*, *C. perezi* e *C. glaucus* (clado 2 em nosso estudo). Os resultados do presente estudo refinam ainda mais este arranjo ao reconhecer dois cladogramas distintos (1 e 3) de tubarões de dorso liso (Figura 5), dos quais o clado 3 é o grupo irmão mais recente do clado de tubarões de dorso liso (2). Garrick (1982) e Compagno (1988) sugeriram outros grupos dentro de *Carcharhinus*, com base em suas semelhanças morfológicas, como (i) *C. porosus*, *Carcharhinus dussumieri*, *Carcharhinus macloti*, *C. sorrah* e *Carcharhinus sealei*;

(ii) *Carcharhinus albimarginatus*, *Carcharhinus amblyrhynchos*, *C. perezi* e *Carcharhinus wheeleri*; e (iii) *C. limbatus*, *C. amblyrhynchos* e *C. brevipinna*. No entanto, nenhum destes arranjos foi reconhecido por Naylor (1992) ou Lavery (1992), e nenhuma evidência foi encontrada para apoiá-los no presente estudo. Naylor (1992) argumentou que as semelhanças morfológicas encontradas entre as espécies de cada grupo devem ser resultado de uma evolução convergente e que há necessidade de mais estudos sobre a estrutura filogenética de *Carcharhinus*. Reclassificações futuras baseadas nessas subdivisões são possíveis, mas mesmo com os conjuntos completos de dados do mitogenoma de Kousteni *et al.* (2021) e Wang *et al.* (2022), estes acordos são atualmente incertos.

Com base em um estudo eletroforético de aloenzimas, Naylor (1992) concluiu que Carcharhinidae conforme descrito na época era um grupo parafilético que incluía os tubarões-martelo do gênero *Sphyrna*, com *Galeocerdo* e *Rhizoprionodon* como os gêneros mais basais desta família. Usando sequências de DNA, López *et al.* (2006) relataram parafilia nos Carcharhinidae como classificados naquela época, mostrando suporte marginal, mas consistente, para um clado correspondente a Carcharhinidae+Sphyrnidae, com exclusão de Hemigaleidae + *Galeocerdo cuvier*, embora apenas três espécies de carcharhinídeos tenham sido incluídas. No entanto, esses achados foram corroborados por Naylor *et al.* (2012) e Amaral *et al.* (2018), que definiram *Galeocerdo* como um grupo basal e um táxon irmão do clado Carcharhinidae+Sphyrnidae. Rodrigues-Filho *et al.* (2009) também observaram a proximidade filogenética de *Galeocerdo* e *Sphyrna*, sendo *Rhizoprionodon* o grupo irmão deste clado. Esses autores destacaram a divergência genética de *G. cuvier* e *Rhizoprionodon* das demais espécies de carcharhinídeos incluídas nas análises e sugeriram que esses dois gêneros podem representar famílias carchariniformes distintas. No presente estudo, *Rhizoprionodon* foi recuperado como um grupo irmão mais basal do clado formado por *Scoliodon* e *Loxodon*. Naylor *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes, recuperando o mesmo arranjo para esses gêneros, mas colocando-os todos dentro do clado carcharhinídeos. Vélez-Zuazo e Agnarsson (2011) recuperaram *Scoliodon* como um gênero irmão de *Rhizoprionodon*, embora seu estudo não incluísse representantes do gênero *Loxodon*. Poey (1875) alocou *Galeocerdo* em sua própria família Galeocerdonidae, com base na morfologia, e alguns deles (olhos grandes, dobras labiais muito longas e espiráculos grandes) e seu modo reprodutivo ovovivíparo não são observados em táxons mais derivados (Compagno, 1984; Naylor, 1992; Heemstra *et al.*, 2022), demonstrando a divergência considerável dos Carcharhinidae. Apesar da alocação de Poey, *Galeocerdo* foi até recentemente atribuído aos Carcharhinidae, só recentemente sendo

amplamente reconhecido como o único membro dos Galeocerdonidae (Poey, 1875; Heemstra *et al.*, 2022). Esta recente adoção do uso da família Galeocerdonidae é fortemente apoiada pelos resultados filogenéticos do presente estudo.

7.1.2. Adaptações do tubarão pato e *insights* sobre o processo de especiação

A análise TMRCA indica que *C. oxyrhynchus* divergiu de sua linhagem irmã mais próxima na análise (*C. porosus*) durante o Mioceno, com um intervalo de confiança variando de aproximadamente 9,38 a 23,74 milhões de anos atrás. A distribuição geográfica desta espécie está intimamente associada à área da pluma amazônica, que corresponde a mais de 80% de sua área de ocorrência (Feitosa *et al.*, 2019). Durante a transição do Oligoceno para o Mioceno, a proto-Amazônia drenou para o norte ao longo da bacia paleo-Orinoco para desaguar no Mar do Caribe perto do atual Lago Maracaibo, com um aumento na turbidez das águas costeiras locais devido à intensa deposição de sedimentos (Hoorn *et al.*, 2010; Leigh, 2014). Entre o início e o final do Mioceno, os padrões de drenagem dos rios no norte da América do Sul mudaram significativamente (Figueiredo *et al.*, 2009), com quantidades cada vez maiores de sedimentos andinos sendo depositados no Oceano Atlântico a partir da foz do rio Amazonas (Hoorn *et al.*, 2017).

A elevação dos Andes durante o Mioceno (~10 milhões de anos) também contribuiu para a formação do Rio Amazonas, bem como aumentou a vazão do sistema do Rio Paleorinoco em direção ao Caribe, diminuindo a transparência da água (Hoorn *et al.*, 1995). As evidências mais recentes indicam a ocorrência de três fases distintas de deposição de sedimentos relacionadas à formação da pluma amazônica: (i) taxas de deposição relativamente baixas (~11,8–6,8 milhões de anos atrás), (ii) volume crescente (~6,8–2,4 milhões de anos atrás) e (iii) altas taxas de deposição, de aproximadamente 2,4 milhões de anos até os dias atuais (Figueiredo *et al.*, 2009). O rio Amazonas descarrega aproximadamente 6.300 km³ de água por ano (Milliman; Meade, 1983), criando uma pluma de água doce carregada de sedimentos que se estende por aproximadamente 200 km da foz do rio, atingindo a isóbata de 30 m no setor médio da plataforma continental (Nittrouer; DeMaster, 1986; Masson; Delecluse, 2001). Esta pluma representa uma barreira suave (a Barreira do Rio Amazonas) à dispersão de muitas espécies marinhas (Floetter *et al.*, 2007; Luiz *et al.*, 2012; Cord *et al.*, 2022), que recentemente demonstrou ter uma influência indireta nos processos de especiação de elasmobrânquios (Fontenelle *et al.*, 2021).

Compagno (1984, 1988), Compagno *et al.* (2005) e Ebert *et al.* (2021) avaliaram um total de 24 características para apoiar o status de *Isogomphodon* como um gênero distinto de *Carcharhinus*. No entanto, a maioria dessas características foi compartilhada com *C. oxyrinchus* com apenas seis traços distintos: (1) focinho agudamente triangular ou subtriangular na visão dorso ventral e muito alongado (comprimento pré-oral muito maior que o espaço interno ou a largura da boca); (2) olhos extremamente pequenos sem incisuras posteriores; (3) os dentes não são fortemente diferenciados tanto na mandíbula superior quanto na inferior, com cúspides agudas estreitas ântero-posteriores e sem cúspides ou lâminas proximais ou distais; (4) dentes do maxilar superior com cúspides largas e planas, e dentes do maxilar inferior com cúspides mais delgadas e bordas lisas; (5) um total de 49–60/49–56 fileiras de dentes; e (6) nadadeiras peitorais largas e triangulares, cujo comprimento da origem até a ponta posterior livre é aproximadamente 3/4 do comprimento das margens peitorais anteriores.

Essas características distintivas de *C. oxyrinchus* quase certamente representam adaptações às condições encontradas na pluma amazônica, e Compagno (1984) já propôs que as características distintas desta espécie são o resultado de um processo de adaptação às águas turvas da costa e ambientes estuarinos associados à descarga do Rio Amazonas. Essas adaptações incluem mudanças na estrutura do focinho e um aumento associado na área das ampolas de Lorenzini que melhora sua função, facilitando a movimentação e a alimentação em águas turvas (Compagno, 1984). A necessidade de adaptação a ambientes escuros e com pouca visibilidade no norte da América do Sul teria favorecido o aprimoramento do focinho de *C. oxyrinchus* em detrimento de seu sistema visual, sendo que essa morfologia sensorial, dentária e mandibular favoreceu a predação de pequenas presas (Feitosa *et al.*, 2021; Stride; Batista; Raposo, 1992; Fontenelle *et al.*, 2005).

7.1.3. Conservação de *Carcharhinus oxyrinchus*

Dada a importância do papel desempenhado pela maioria dos elasmobrânquios nos ecossistemas que habitam e o aumento da pressão pesqueira em todo o mundo, esforços de conservação são urgentemente necessários para garantir a proteção desse importante grupo de peixes. A principal ameaça à sua sobrevivência é a expansão progressiva das operações de pesca. Tubarões e raias começaram a atrair a atenção dos conservacionistas na década de 1990, quando instituições de pesquisa começaram a avaliar esse recurso pesqueiro de forma mais sistemática. No Brasil, duas iniciativas se destacaram nesse período – o Programa REVIZEE

(Programa de Avaliação do Potencial de Sustentabilidade dos Recursos da Zona Econômica Exclusiva), criado pelo Ministério do Meio Ambiente em 1994 (REVIZEE, 2020) e a criação da Sociedade Brasileira de Estudos de Elasmobrânquios (SBEEL), fundada em 1997, que atua na promoção da conservação de tubarões e raias no Brasil (SBEEL, 2020).

A crescente evidência da vulnerabilidade dos elasmobrânquios levou ao estabelecimento, em 1998, do Plano de Ação Internacional para a Conservação e Manejo de Tubarões (IPOA-SHARK), com o apoio da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Nesse mesmo período, o Brasil implementou sua primeira legislação federal anti-finning, que proibia a retirada das barbatanas de tubarões e raias (os subprodutos mais caros) sem posterior aproveitamento da carcaça. No entanto, o desembarque de tubarões e raias com as barbatanas ainda presas ao corpo só se tornou obrigatório em 2012 (ICMBio, 2012; FAO, 2020). Além disso, a capacidade do *C. oxyrinchus* de recuperar a saúde após interações estressantes pode resultar em maiores riscos de sobrevivência em comparação com outros Carcharhiniformes, mesmo se for libertado vivo após captura acidental (Wosnick *et al.*, 2023).

O declínio observado nas populações brasileiras de elasmobrânquios foi considerado um alerta e incentivou a implementação do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Tubarões e Raias Marinhas Ameaçadas de Extinção no Brasil (PAN- Tubarões), criado pela portaria federal nº. 575, de 5 de dezembro de 2014 (ICMBio, 2020; ICMBio, 2014b). Este plano concentra-se em 12 espécies, incluindo *C. oxyrinchus*, com o apoio de grupos técnicos de assessoria.

Uma iniciativa associada é o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Espécies Ameaçadas e de Importância Socioeconômica no Ecossistema Manguezal (PAN-Manguezal), que visa proteger os manguezais brasileiros, incluindo as espécies contempladas pelo PAN-Tubarões (dentre elas *C. oxyrinchus*), respeitando as tradições locais, que se conciliam com o conhecimento científico. O plano de ação do PAN- Manguezal contempla a conservação de 74 espécies de elasmobrânquios, das quais 20 estão ameaçadas de extinção no Brasil, incluindo *C. oxyrinchus* (ICMBio, 2015).

Recentemente, o projeto Áreas Costeiras e Marinhas Protegidas (GEFMar) foi implementado para proteger a biodiversidade das áreas marinhas e costeiras dos impactos da captura acidental. Este projeto visa identificar áreas costeiras prioritárias no norte do Brasil tanto para espécies ameaçadas quanto para a pesca artesanal e, em particular, o estabelecimento de áreas marinhas protegidas que possam contribuir para a recuperação das espécies mais ameaçadas, em particular, por meio da proteção de áreas de berçário. Isso levou à imposição de

restrições à pesca nos estuários dos estados que compõem a região norte do Brasil (Ruffino, 2018).

Evidentemente, as estratégias empregadas para garantir a conservação dos elasmobrânquios brasileiros, em particular das espécies mais ameaçadas, como o tubarão-pato, não serão alteradas significativamente em resposta ao presente estudo, que se refere especificamente a uma questão de nomenclatura científica. Importa, no entanto, referir que esta espécie habita as águas pouco profundas do Atlântico ocidental, em regiões onde predominam as condições quentes e chuvosas, onde prefere as águas turvas e salobras dos estuários dominados por mangais, e tem uma reprodução vivípara, sexuada tardia maturidade e um ciclo reprodutivo semestral (Compagno, 1984; Lessa *et al.*, 2000). Essas características, juntamente com a perda de habitat e a pressão da pesca, se combinam para ameaçar intensamente a sobrevivência da espécie, reforçando sua classificação como criticamente ameaçada pela IUCN (Pollom *et al.*, 2020).

7.2. Descrição da região controle do DNA mitocondrial e diversidade genética de *C. oxyrhynchus*

7.2.1. Descrição da região controle

A região controle é uma região não codificadora, que possui um tamanho de aproximadamente 1,4 kb, sendo localizada entre os genes tRNA da Prolina e da Fenilalanina para a maioria dos vertebrados (Pereira 2000). Esta região apresenta uma alta variabilidade, o que a tornou um dos marcadores comumente utilizados para estudos de fitogeografia e trabalhos de genética de populações, tanto para os teleósteos como para os tubarões (Chen *et al.* 1998; Duncan *et al.* 2006; Keeney; Heist, 2006). A região controle é uma porção do DNA mitocondrial importante para a regulação, transcrição e replicação do material genético, pois além de possuir sítios de transcrição, ela contém a origem da replicação da fita pesada (H) do genoma mitocondrial, conhecida como alça de desdobramento (D loop). Essa alça, por muitas vezes, foi considerada como sinônimo da região controle em vários trabalhos. No entanto, a D loop é na verdade uma porção da região controle, com formas onde a fita pesada é separada da fita leve para começar a replicação (Goebel *et al.* 1999; Taanman 1999).

Estudos baseados na distribuição de sítios variáveis e nas frequências nucleotídicas ao longo de seu comprimento, revelam que a região controle possui uma estrutura subdividida em três domínios, sendo uma região central conservada flanqueada por duas seções hiper variáveis (seção 5' e 3') (Heyer *et al.* 2001; Pie *et al.* 2008; Rocha-Olivares *et al.* 2005). Apesar de suas seções hiper variáveis, a região controle também contém blocos de sequências conservadas (CSB), que estão associadas com a iniciação da replicação e transcrição no DNA mitocondrial ao longo de seu comprimento (Taanman, 1999). Quanto ao número, localização e o grau de conservação entre os CSBs, existem variações consideráveis entre os vertebrados, sugerindo que os mecanismos de regulação podem diferir entre eles (Sbisà *et al.* 1997; Southern *et al.* 1988).

A busca por blocos conservados realizadas neste estudo para a região controle resultou em 17 blocos conservados (BC) divididos em três domínios identificados (HV 5', Central e HV 3'), observando variação entre as espécies em relação ao número de BCs identificados, corroborando as citações anteriores.

Uma vez estabelecidos os domínios (HV 5', Central e HV 3'), as sequências associadas ao término de replicação (TAS) e CSBs foram identificadas por meio de comparações com sequências provenientes da literatura, juntamente com os blocos conservados estabelecidos em análises anteriores (Figura 6-b). Dois blocos observados no domínio 5' foram muito semelhantes aos blocos de sequência associados ao término da replicação (TAS1: 5'-ATGYWTAAYMCYCAT-3' e TAS-2: 5'-ATGYWTAATMCRCAT-3') (Figura 6-b).

Southern *et al.* (1988) reconheceram pelo menos cinco CSBs (CSB-B, CSB-C, CSB-D, CSB-E, CSB-F) no domínio central da região de controle de mamíferos. No entanto, normalmente apenas CSB-F, CSB-E e CSB-D são encontrados em teleósteos (BROUGHTON & DOWLING, 1994; LEE *et al.*, 1995). O CSB-1 é descrito por sua associação ao início da replicação do mtDNA e é altamente conservado nos mamíferos (Sbisa *et al.*, 1997), no entanto é muito variável em peixes (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011). Neste estudo, identificamos apenas a região CSB-F (5'-RRMTATYCTCGACA-3') na região central, já as sequências CSB-2 e CSB-3 são descritas como relativamente mais conservadas que a CSB-1 (Zhang *et al.*, 2011), sendo descritas como onipresentes por alguns autores, esses CSBs podem ser observados para indicar se há presença de repetições em tandem (Zhang *et al.*, 2013), além de serem facilmente identificáveis quando analisamos o banco de dados. Nesse trabalho identificamos apenas os CSB-1 (5'-NHTCA(Y/-)TDTMTYTGGCATAD-3'), CSB-2 (5'-

GGTAAAAACCCCC(C/-)TCCCCCTTAATATACA-3') e CSB-3 (5'-YCTCGAAAAACCCWAAAACGAGGGCCR-3') no domínio 3'. Onde a conservação dos blocos CSB-2 e CSB-3 entre as espécies de tubarões estudadas é evidente, inclusive entre os registrados na literatura (Chen *et al.*, 1998; Nesbø *et al.*, 1998; Maté *et al.*, 2004; Rocha-Olivares *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). A similaridade entre CSB-2 e CSB-3 pode refletir seu papel na transcrição ou síntese da fita H do DNA mitocondrial, visto que esses blocos podem constituir sítios de *splicing* direto na transcrição primária, resultando em primers adequados para a iniciação da síntese da cadeia H (Taanman, 1999).

O perfil variável nas repetições observadas no Box *All*, possivelmente, deriva do processo de evolução em concerto (Diaz *et al.* 1999; Gomes *et al.*, 2016). Vale ressaltar que nesta região de 197 pb encontramos os TAS descritos anteriormente, demonstrando o nível de conservação desta porção, inclusive para os *outgroups* (Galeocerdonidae, Tryakidae e Scyliorhynidae).

7.2.2. Diversidade genética de *C. oxyrinchus*

A região controle é uma ferramenta útil para investigar a estrutura genética em tubarões (Heist *et al.*, 1996), pois indica níveis elevados de variabilidade intraespecífica (Stepien, 1995). Por causa desta alta variabilidade, esta região tem sido amplamente utilizada para estudos populacionais e filogeográficos em organismos marinhos, assim como em trabalhos de genética de populações de peixes (Sturmbauer; Meyer, 1993; Brown *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Como exemplo, podem ser citados vários trabalhos que fizeram a utilização de tal ferramenta para análises em elasmobrânquios, como, Pardini *et al.* (2001), Duncan *et al.* (2006), Hoelzel *et al.* (2006), Keeney e Heist (2006) e Stow *et al.* (2006). Com a utilização de técnicas moleculares é possível determinar o grau de estruturação das populações, medindo a variabilidade genética de espécies ameaçadas, tornando possível avaliar a situação do estoque pesqueiro do tubarão pato, que na costa norte é desconhecido, e assim fornecer informações essenciais para que se possam traçar planos de manejo e conservação eficientes, que evitem que espécies criticamente ameaçadas de extinção venham a sucumbir em consequência à ação da pesca predatória.

Para o fragmento COI+Citb, a ausência de diversidade genética remete a um pesado evento de declínio populacional para *C. oxyrinchus*. Rus Hoelzel (2001) comparou populações

de tubarões-frade, *Cetorhinus maximus* (Gunnerus, 1765), entre o Atlântico Norte e o Pacífico Sul com base na sequência de Citb, não observando diferenças entre as regiões, com o compartilhamento de apenas dois haplótipos. Estudo que foi ampliado em relação ao número de populações em 2006 (Rus Hoelzel *et al.*, 2006), utilizando como marcador a região controle do DNA mitocondrial. Neste estudo, apenas seis haplótipos foram observados, evidenciando o baixo nível de diversidade genética, corroborando, assim, o estudo anterior de Rus Hoelzel (2001).

Pereyra *et al.* (2010), estudando populações de cação da Patagônia, *Mustelus schmitti* Springer, 1939, com um fragmento do gene Citb, também evidencia um número baixo de haplótipos (10), com um haplótipo mais frequente em todas as localidades, dos quais os demais haplótipos diferem por uma ou duas mutações, resultando em baixos índices de diversidade genética para esta espécie (π - 0,0015; h - 0,226), que se encontra ameaçada de extinção, assim como, *C. oxyrinchus*. Estudos estes, que corroboram nossos resultados, tendo em vista que, recuperamos apenas um único haplótipo para o fragmento COI+Citb e cinco haplótipos para a região controle.

Os índices de diversidade genética encontrados neste estudo (região controle - π - 0,000348 +/- 0,000292; h - 0,5758 +/- 0,1634, COI+Citb - π - 0; h - 0) foram menores, em relação ao observado por Rus Hoelzel *et al.* (2006) para *Cetorhinus maximus* (π - 0,0013 +/- 0,0009; h - 0,720 +/- 0,028) e Pereyra *et al.* (2010) para *Mustelus schmitti*. Assim como, em outros estudos, utilizando Citb: Murray *et al.* (2008) (*Somniosus pacificus*: π - 0,0031 +/- 0,0020; h - 0,7937 +/- 0,0424, *Somniosus antarcticus*: π - 0,0023 +/- 0,0015; h - 0,6667 +/- 0,1130, *Somniosus microcephalus*: π - 0,0022 +/- 0,0015; h - 0,7750 +/- 0,0876), Chevrolet *et al.* (2006) (*Raja clavata*: π - 0,000 a 0,007; h - 0,000 a 0,720); e região controle: Schultz *et al.* (2008) (*Negaprion brevirostris*: π - 0,00585; h - 0,78, *Negaprion acutidens*: π - 0,00056; h - 0,28), Pardini *et al.* (2001) (*C. carcharias*; π - 0,0203), Keeney *et al.* (2005) (*Carcharhinus limbatus*; π - 0,0021 +/- 0,0013; h - 0,805 +/- 0,018), Sodr e *et al.* (2012) (*Carcharhinus limbatus*; π - 0,0021; h - 0,796); Camargo *et al.* (2016) (*Carcharhinus longimanus*; π - 0,0013; h - 0,5953).

De acordo com os índices de diversidade genética estabelecidos neste estudo e aos testes de desvios da neutralidade, onde observam-se valores significativos apenas para os testes F_s de F_u , indicam a presença de mutações recentes sendo indícios de desvios causados por crescimento populacional ocorrido após um evento de gargalo genético. Este mesmo padrão é bastante observado em trabalhos populacionais com diferentes espécies de tubarões (Keeney *et al.*, 2005; Chevrolet *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2006; Stow *et al.*, 2006; Lewallen *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2008; Schluessel *et al.*, 2010; Sodr e *et al.* 2012; Camargo *et al.*, 2016). Tal

hipótese é apoiada pela rede de haplótipos, onde existem haplótipos mais frequentes, dos quais se originam a maioria dos demais haplótipos e pela diferença entre os haplótipos ser de apenas uma ou duas mutações, assim como as curvas unimodais de distribuição da diferença par a par.

Ao contrário de muitos elasmobrânquios, *C. oxyrinchus*, possui uma das áreas de distribuição mais restrita do mundo, compreendida entre as águas da costa da Venezuela e se estendendo até o norte do litoral brasileiro (Feitosa *et al.*, 2019). Espécie que vem sofrendo com a pressão pesqueira, sendo capturado acidentalmente nas suas áreas de ocorrência por pesca artesanal. Estudos demográficos demonstram que a população vem decrescendo cerca de 18% anualmente (Lessa, 1986; Lessa *et al.*, 2006). Como consequência, desde 1990 as capturas têm reduzido sua abundância em 90%, entrando em um colapso populacional, que aliado à sua distribuição reduzida e sua história de vida, o incluíram pela IUCN na categoria de espécie criticamente ameaçada (CA) desde 2006 (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Lessa *et al.*, 2006; Lessa *et al.* 2016), mostrando a urgente necessidade de medidas de conservação, haja vista que ainda persiste a pesca ilegal sobre essa espécie (Feitosa *et al.*, 2018).

Os parâmetros biológicos desta espécie como: a baixa fecundidade, geração de 2 a 8 filhotes por ninhada, maturação sexual tardia, machos chegando a fase adulta entre 5 e 6 anos e fêmeas entre de 6 a 7 anos, ciclo reprodutivo bianual com um longo período gestacional de 12 meses, dificultam o crescimento populacional desta espécie, agravando a sua possível recuperação a ação pesqueira (Lessa *et al.*, 2000; Lessa *et al.*, 2006; Feitosa *et al.* 2019).

Nossos resultados, não só corroboram o exposto acima, ressaltando a necessidade de medidas de conservação para esta espécie. O estudo de Domingues *et al.* (2018), afirma que as políticas de gestão e conservação da pesca de tubarões e raias devem considerar informações de diversidade genética, porque a sobrevivência a longo prazo de uma espécie depende fortemente dos níveis de diversidade genética dentro e entre as populações. Principalmente pela crescente sobre-exploração das populações de tubarões, que deverá produzir um impacto a longo prazo na variabilidade genética destas populações e, assim, reduzindo a sua aptidão e capacidade de resposta às alterações ambientais.

Entretanto, Tavares *et al.* (2013), alerta que a região controle de tubarões, pode apresentar viés devido a presença de sítios homoplásicos (*hotspot* mutacional), proporcionando interpretações errôneas para futuros planos de manejo e conservação deste grupo. O domínio hiper variável 5' é caracterizada por altos níveis de substituições, o que segundo Tavares *et al.* (2013) explica o surgimento de blocos de sítios hiper variáveis (região compreendida entre os sítios 176-425, no qual encontra-se aos três sítios variáveis observados na região controle de *C. oxyrinchus*), já reportado para o domínio hiper variável 5' de *C. porosus* e outras duas espécies

(*Carcharhinus limbatus* e *Rhizoprionodon porosus*). Segundo o autor, possivelmente, esse bloco de sítios hiper variáveis venha a ser um *Hotspot* mutacional, o que poderia explicar o surgimento de homoplasias a nível intraespecífico, (Tavares *et al.* 2013; Stoneking, 2000; Galtier *et al.*, 2006).

A baixa diversidade de nucleotídeos e haplótipos encontrada para *C. oxyrinchus* indica um evento de gargalo populacional, seguido de expansão ou seleção recente (Avice, 2004), esta conclusão é apoiada pelos índices de diversidade e testes de neutralidade. No entanto, a seleção positiva também pode levar a um excesso de haplótipos de baixa frequência, tornando difícil discernir as consequências de seleção natural e a expansão populacional (Akey *et al.*, 2004). Por tanto, o uso apenas de sequências mitocondriais para detecção de processos evolutivos, ou mais precisamente, para a detecção de efeitos de sobrepesca, deve ser usado com cautela, pois a baixa variabilidade intrínseca dos tubarões pode enviesar os resultados. Por exemplo, no mtDNA eles chegam a ter uma taxa mutacional seis vezes mais lenta que a taxa observada nos mamíferos (Martin *et al.* 1992). Assim, para este fim, necessita-se do uso de sequências nucleares (ou microssatélites) para a real detecção da variabilidade genética destas espécies ameaçadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No geral, o presente estudo fornece evidências enfáticas da necessidade da realocação de *I. oxyrinchus* e *P. glauca* em *Carcharhinus* e declaramos, para fins do Código Nacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN), que esses táxons devem doravante ser sinonimizados no gênero *Carcharhinus*, como *Carcharhinus oxyrinchus* e *Carcharhinus glaucus* (Linnaeus, 1758), respectivamente. O conjunto de dados relativamente grande empregado no presente estudo, juntamente com as abordagens filogenéticas robustas aplicadas nas análises, apoia esta conclusão. No entanto, mais pesquisas serão necessárias para confirmar o status de *Triaenodon*, bem como a estrutura filogenética do gênero *Carcharhinus* e possíveis subdivisões futuras. Entretanto, a reclassificação dos gêneros não apagam seus históricos, e principalmente voltado a *C. oxyrinchus* o processo de sobrepesca e o status de criticamente ameaçado de extinção descrito pela IUCN, tendo sua última análise atualizada em 2019, corroborando outras questões abordadas, visando que por meio de nossa amostragem fica claro que a espécie está com pouca variabilidade em sua população e isso denota um alto risco de extinção para *C. oxyrinchus*.

9- REFERÊNCIAS

- AMARAL, A.C.Z.; JABLONSKI, S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *In: SILVA, J.M.C.; FONSECA, M. (eds) MEGADIVERSIDADE*, 1st edn, Brasília, DF, Brasil, pp 43-51. 2005.
- AMARAL, C.R.L. *et al.* The mitogenomic phylogeny of the Elasmobranchii (Chondrichthyes). **Mitochondrial DNA Part a**, v.29, p. 867–878, 2018.
<https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1376052>
- BENSON, A.J.; MACFARLANE, G.A.; KING, J.R. **A Phase “0” Review of Elasmobranch Biology, Fisheries, Assessment and Management**. Ottawa. Research Document. 2001.
- BIGELOW, H.B.; SCHROEDER, W.C. Fishes of the western north Atlantic. Mem. Sears Found. **Mar Res Part**, v. 1, p. 282-292. 1948.
- BOUCKAERT, R. *et al.* BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 15, n. 4, p. 1–28, 2019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- BAUM, J. K.; KEHLER, D.; MYERS, R. A. Robust estimates of decline for pelagic shark populations in the northwest Atlantic and Gulf of Mexico. **FISHERIES-BETHESDA-**, v. 30, n. 10, p. 27, 2005.
- BRÄUTIGAM, A.; CALLOW, M.; CAMPBELL, I. R. Global priorities for conserving sharks and rays: a 2015-2025 strategy. 2016. Retrieved from
<https://policycommons.net/artifacts/1375898/global-priorities-for-conserving-sharks-and-rays/1990160/> on 07 Feb 2024. CID: 20.500.12592/s532n0.
- BROUGHTON, R. E.; DOWLING, T. E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*. **Genetics**, v. 138, n. 1, p. 179-190, 1994.
<https://doi.org/10.1093/genetics/138.1.179>
- CAPPETTA, H. Chondrichthyes II, Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii. *In: SHULTZE, H.P. (ed) Handbook of Paleoichthyology*, 3rd edn. Verlag, Munich, pp 474- 475, 1987.
<https://doi.org/10.1080/02724634.1988.10011678>
- CASSELBERRY, G.A.; CARLSON, J.K. Endangered Species Act Status Review of the Argentine angel shark (*Squatina argentina*). Report to the National Marine Fisheries Service, Office of Protected Resources. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), Panama City, Florida. 2015.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and Evolution**, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- CASTRO, A. L. F. *et al.* Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 24, p. 5183-5192, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03597.x>

CHEN, I.S. *et al.* Sequence length and variation in the mitochondrial control region of two freshwater gobiid fishes belonging to *Rhinogobius* (Teleostei: Gobioidae). **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 1, p. 179-191, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00119.x>

CHEVOLOT, M. *et al.* Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 12, p. 3693-3705, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03043.x>

COMPAGNO, L. FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 1. Hexanchiformes to Lamniformes. FAO fisheries synopsis, 125, 1984.

COMPAGNO, L. FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. FAO series, Rome, 1984.

COMPAGNO, L.; DANDO, M.; FOWLER, S. Princeton field guides: Sharks of the World. Vol. 2. 2005.

COMPAGNO, L.J.V. Sharks of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press. New Jersey, 1988.

CORD, I. *et al.* Brazilian marine biogeography: a multi-taxa approach for outlining sectorization. **Marine Biology**, v. 169, n. 5, p. 1-13, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04045-8>

CROOKS, N.; WARING, C.P. Sexual dimorphisms in the dermal structure of the lesser-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). **Acta Zoologica**, v. 94, n. 3, p. 331-334, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2012.00560.x>

DAVIDSON L.N.; DULVY N.K. Global marine protected areas to prevent extinctions. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0040-0040>

DIAZ, M. *et al.* Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 825-833, 1999. <https://doi.org/10.1093/intimm/11.5.825>

DOMINGUES, R. R.; HILSDORF, A. W. S.; GADIG, O. B. F.. The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. **Conservation genetics**, v. 19, p. 501-525, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1038-3>

DOUZERY, E.; RANDI, E. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 11, p. 1154-1166, 1997. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025725>

DOSAY-AKBULUT, M. The phylogenetic relationship within the genus *Carcharhinus*.

Comptes Rendus Biologies, v. 331, n. 7, p. 500-509, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.04.001>

DOUADY, C.J. *et al.* Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Mol. Phylogenet. **Molecular phylogenetics and evolution***, v. 26, n. 2, p. 215-221, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00333-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00333-0)

DRUMMOND, A.J. *et al.* Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**, v. 4, n. 5, p. 699-710, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>

DULVY, N. K. *et al.* Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. **elife**, v. 3, p. e00590, 2014. <https://doi.org/10.7554/eLife.00590>

DULVY, N. K. *et al.* Challenges and priorities in shark and ray conservation. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R565-R572, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.038>

DUN, I.S.; BLATTNER, F.R. Charons 36 to 40: Multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 6, p. 2677-2698, 1987. <https://doi.org/10.1093/nar/15.6.2677>

DUNCAN, K.M.; MARTIN, A.P.; BOWEN, B.W.; DE COUET, H.G. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). **Molecular ecology**, v. 15, n. 8, p. 2239-2251, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02933.x>

DUNCAN, K. M. *et al.* Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). **Molecular ecology**, v. 15, n. 8, p. 2239-2251, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02933.x>

DUNN K.A.; MORRISSEY J.F. Molecular phylogeny of elasmobranchs. **Copeia**, p. 526- 531, 1995. <https://doi.org/10.2307/1446750>

EBERT, D.A.; WINTNER, S.P.; KYNE, P.M. An annotated checklist of the chondrichthyans of South Africa. **Zootaxa**, v. 4947, n.1, p. 1-127, 2021.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4947.1.1>

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100003, 2005. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>

FAO (2020) iSharkFin | International Plan of Action for Conservation and Management of Sharks | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acesso em: 22 de abr. de 2021. <http://www.fao.org/ipoa-sharks/en/>

FEITOSA L.M. *et al.* DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific reports**, v. 8, n. 3347 , p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21683-5>

FEITOSA, L.M. *et al.* Daggernose Shark: An Elusive Species from Northern South America. **Fisheries**, v. 44, n. 3, p. 144-147, 2019. <https://doi.org/10.1002/fsh.10205>

- FEITOSA, L.M. *et al.* DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21683-5>
- FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- FIGUEIREDO, J. *et al.* Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. **Geology**, v. 37, p. 619-622, 2009. <https://doi.org/10.1130/G25567A.1>
- FLOETTER, S.R. *et al.* Atlantic reef fish biogeography and evolution. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 1, p. 22-47, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01790.x>
- FONTENELLE, J.P. *et al.* Biogeography of the Neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. **Journal of Biogeography**, v. 48, n. 6, p. 1406-1419, 2021. <https://doi.org/10.1111/jbi.14086>
- GARRICK, J.A.F. Sharks of the genus *Carcharhinus*. NOAA Technical Report NMFS Circular 445, p. 1-194, 1982.
- GOMES, Camila *et al.* Concerted evolution in the mitochondrial control region of the Amazon small-bodied frog *Pseudopaludicola canga* (Anura, Leiuperidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 4270-4273, 2016. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1060477>
- GRANT, W. A. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of heredity**, v. 89, n. 5, p. 415-426, 1998. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>
- GREIG, T.W. *et al.* Mitochondrial gene sequences useful for species identification of western North Atlantic Ocean sharks. **Fish. Bull.**, v. 103, p. 516-523, 2005.
- GUINDON, S. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- HALL, T. A. *et al.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98. 1999.
- HEYER, E. *et al.* Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. **The American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 5, p. 1113-1126, 2001.
- HOELZEL, A. R. Shark fishing in fin soup. **Conservation Genetics**, v. 2, p. 69-72, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011590517389>

HOORN, C. *et al.* Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology** v. 23, n. 3, p. 237-240, 1995. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1995\)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1995)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2)

HOORN, C. *et al.* The Development of the Amazonian Mega-Wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia) *In*: HOORN, C.; WESSELINGH, F. (eds) **Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past**. 1st edn. Blackwell, New York, pp 1230-142, 2010.

HOORN, C.M. *et al.* The Amazon at sea: Onset and stages of the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in the drainage basin. **Global and Planetary Change** [serial on the Internet], v. 153, p. 51-65, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2017.02.005>

ICMBIO (2012) INSTRUÇÃO NORMATIVA INTERMINISTERIAL MPA/MMA N° 14, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2012. Acesso em: 22 de abr. de 2021. https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2012/in_inter_mpa_mma_14_2012_normasprocedimentoscapturatubaroes_raias.pdf

ICMBIO (2014a). PORTARIA N° 125, DE 04 DE DEZEMBRO DE 2014 Acesso em: 22 de abr. de 2021. <https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-pan/pan-tubaroes/1-ciclo/pan-tubaroes-portaria-aprovacao.pdf>

ICMBIO (2014b). PORTARIA N° 575, DE 05 DE DEZEMBRO DE 2014. Acesso em: 22 de abr. de 2021. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra148925.pdf>

ICMBIO (2015). PORTARIA ICMBIO N° 09, DE 29 DE JANEIRO DE 2015. Acesso em: 22 de abr. de 2021. https://www1.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2015/p_icmbio_09_2015_aprova_pan_manguezais.pdf

ICMBIO (2020). Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de Extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Acesso em: 22 de abr. de 2021. <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/plano-de-acao-nacional/lista/2839-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-tubaroes>

ISAAC, V.J.; BARTHEM, R.B. Os recursos pesqueiros da Amazônia Brasileira. Bol. Mus. Para. **Emílio Goeldi**, v. 11, p. 151–194, 1995.

JABADO, R. W. *et al.* **The conservation status of sharks, rays, and chimaeras in the Arabian Sea and adjacent waters**. Environment Agency-Abu Dhabi & IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group, 2017.

KEENEY, D.B.; *et al.* Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. **Molecular Ecology** v. 14, n. 7, p. 1911–1923, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02549.x>

KEENEY, D. B.; HEIST, E. J. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western

Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 12, p. 3669-3679, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03036.x>

KRIWET, J.; BENTON, M. J. Neoselachian (chondrichthyes, elasmobranchii) diversity across the cretaceous–tertiary boundary. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 214, n. 3, p. 181-194, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.02.049>

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

LAVERY, S. Electrophoretic analysis of phylogenetic relationships among Australian Carcharhinid sharks. *Australian Marine and Freshwater Research*, v. 43, n. 1, p. 97 – 108, 1992. <https://doi.org/10.1071/MF9920097>

LEIGH, E.G.; O’DEA, A.; VERMEIJ, G.J. Historical biogeography of the isthmus of panama. **Biological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 148-172, 2014. <https://doi.org/10.1111/brv.12048>

LESSA, R. *et al.* Age and growth of the daggernose shark, *Isogomphodon oxyrinchus*, from northern Brazil. **Marine and Freshwater Research**, v. 51, n. 4, p. 339-347, 2000. <https://doi.org/10.1071/MF99125>

LESSA, R. *et al.* Biodiversidade de Elasmobrânquios no Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Projeto de Conservação e utilização da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO). 1999.

LESSA, R. *et al.* *Isogomphodon oxyrinchus*. The IUCN Red List of Threatned Species. V.2014.3. 2006. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T60218A12323498>. Acesso em: 19 out. 2020.

LESSA, R.; BATISTA, V.S.; SANTANA, F.M. Close to extinction? The collapse of the endemic daggernose shark (*Isogomphodon oxyrinchus*) off Brazil. **Global Ecology and Conservation**, v. 7, p. 70-81, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.04.003>

LESSA, R.; SANTANA, F.M.; DUARTE-NETO, P. A critical appraisal of marginal increment analysis for assessing temporal periodicity in band formation among tropical sharks. *Environ. Environmental Biology of Fishes*, v. 77, n. 3, p. 309-315, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-9111-7>

LESSA, R.P. Sinopse dos estudos sobre elasmobrânquios da costa do Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 10, n. 1, p. 19-36, 1997. <http://dx.doi.org/10.18764/>

LESSA, R; BATISTA, V.S; SANTANA, F.M. Close to extinction? The collapse of the endemic daggernose shark (*Isogomphodon oxyrinchus*) off Brazil. **Global Ecology and Conservation**. v. 7, p. 70-81, 2016.

LEE, W.J. *et al.* Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of molecular evolution**, v. 41, p. 54-66, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00174041>

- LEWALLEN, E. A.; ANDERSON, T. W.; BOHONAK, A. J. Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. **Marine Biology**, v. 152, p. 599-609, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0714-0>
- LIBRADO, P.; ROZAS, J.. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- LÓPEZ, J.A. *et al.* Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implications for the evolution of carcharhiniform placental viviparity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 50-60, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.011>
- LUIZ, O.J. *et al.* Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: Insights from tropical Atlantic reef fishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1730, p. 1033-1040, 2012. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1525>
- MARTIN, A.P. Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: rates, patterns and phylogenetic inferences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1114-1123, 1995.
- MARTINS, A.P.B. *et al.* Sexual dimorphism of sharks from the Amazonian equatorial coast. **Universitas Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 297-304, 2015. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-3.sdos>
- MARTINS, A.P.B. *et al.* Analysis of the supply chain and conservation status of sharks (Elasmobranchii: Superorder Selachimorpha) based on fisher knowledge. **PLoS ONE**, 13, n. 3: e0193969. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193969>.
- MASSON, S.; DELECLUSE, P. Influence of the Amazon River runoff on the tropical Atlantic. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere**, v. 26, n. 2, p. 137-142, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1464-1909\(00\)00230-6](https://doi.org/10.1016/S1464-1909(00)00230-6)
- MARSHALL, H. D.; BAKER, A. J. Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla* spp.) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*). **Molecular Biology and evolution**, v. 14, n. 2, p. 173-184, 1997. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025750>
- MCMILLAN, W. Owen; PALUMBI, Stephen R. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). **Journal of Molecular Evolution**, v. 45, p. 473-484, 1997. <https://doi.org/10.1007/PL00006252>
- MURRAY, B. W. *et al.* Mitochondrial cytochrome b variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). **Marine Biology**, v. 153, p. 1015-1022, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0871-1>
- MILLIMAN, J.D.; MEADE, R.H. World-wide delivery of river sediment to the oceans. **The Journal of Geology**, v. 91, n. 1, p. 1-21, 1983.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Instrução Normativa n° 5, de 21 de maio de 2004:

Anexo I – LISTA NACIONAL DE ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS E PEIXES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO. Diário Oficial da União – seção 1 nº102, sexta-feira, 28 de maio de 2004. 2004.

NAYLOR G.J.P. *et al.* Elasmobranch Phylogeny: A Mitochondrial Estimate Based on 595 Species. *In:* Carrier J C, Musick J A, Heithaus M R (eds) **Biology of Sharks and Their Relatives**, 2nd edn. Taylor & Francis, Boca Raton, p. 31-56, 2012.

NAYLOR, G.J.P. *et al.* Phylogenetic relationships among the Major Lineages of Modern Elasmobranchs. *In:* HAMLETT, W.C.; JAMIESON B.G.M. (eds) Phylogenetic relationships among the Major Lineages of Modern Elasmobranchs. *Reprod. Biol. Phylogeny*, 3rd edn. Science Publishers, EnWeld, NH, pp. 1–25, 2005.

NAYLOR, G.J.P. The phylogenetic relationships among requiem and hammerhead sharks: inferring phylogeny when thousands of equally most parsimonious trees result. **Cladistics**, v. 8, n. 4, p. 295-318, 1992.

NITTROUER, C.A.; DEMASTER, D.J. Sedimentary processes on the Amazon continental shelf: past, present and future research. **Continental Shelf Research**, v. 6, n. 1-2, p. 5-30, 1986. [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(86\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0278-4343(86)90051-8)

PALMEIRA, C.A.M. *et al.* Commercialization of a critically endangered species (Largetooth Sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. **Food Control** v. 34, n. 1, p. 249–252, 2013.

PANK, M. *et al.* Rapid and Simultaneous Identification of Body Parts from the Morphologically Similar Sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) Using Multiplex PCR. **Marine Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 231-240, 2001. <https://doi.org/10.1007/s101260000071>

PARDINI, A. T. *et al.* Sex-biased dispersal of great white sharks. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 139-140, 2001. <https://doi:10.1038/35084125>

PIE, M. R. *et al.* The organization of the mitochondrial control region in 2 brachyuran crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). **Journal of Heredity**, v. 99, n. 4, p. 432-437, 2008. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn024>

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

POLLOM, R. *et al.* *Isogomphodon oxyrhynchus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T60218A3094144, 2020. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020->

Programa Nacional de Diversidade Biológica (PRONABIO) – Necton – Elasmobrânquios, Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal (MMA). Recife, 119p, 1999.

RAMBAUT, A. *et al.* Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, p. 901-904, 2018. [10.1093/sysbio/syy032](https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032)

- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. TreeAnnotator v1.7.0. **Available as part of the Beast package at:** <http://beast.bio.ed.ac.uk>, 2013.
- REVIZEE 2020. DECRETO Nº 1.203, DE 28 DE JULHO DE 1994. Acesso em: 22 de abr. de 2021. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1990-1994/D1203.htm
- RODRIGUES-FILHO, L.F, *et al.* Identification and phylogenetic inferences on stocks of sharks affected by the fishing industry off the Northern coast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 405-413, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000039>
- RODRIGUES-FILHO, L. F., *et al.* Shark DNA forensics: Applications and impacts on genetic diversity. **Analysis of Genetic Variation in Animals**, p. 269-286, 2012.
- RODRIGUES FILHO, L. F., *et al.* Molecular identification of ray species traded along the Brazilian Amazon coast. **Fisheries Research**, v. 223, p. 105-407, 2020.
- RONQUIST, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- ROZAS, Julio, *et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.
- ROGERS, R. & HARPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9, 552-69.
- RUS HOELZEL, A. *et al.* Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). **Biology letters**, v. 2, n. 4, p. 639-642, 2006. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0513>
- RUFFINO, M.L. Identificação e caracterização das áreas relevantes para a pesca artesanal e das principais interações com espécies da megafauna marinha sensíveis biologicamente na região norte (AP, PA, MA e PI). MMA, Brasília, 2018.
- SALES J.B.L. *et al.* Phylogeography of eagle rays of the genus *Aetobatus*: *Aetobatus narinari* is restricted to the continental western Atlantic Ocean. **Hydrobiologia**, v. 836, n. 1, p. 169-183, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-3949-0>
- SBEEL (2020). Sociedade Brasileira para estudos de elasmobrânquios. Acesso em: 22 de abr. de 2021. <http://www.sbeel.org.br>
- SILVA, A.L.O. **Skeletal Anatomical Description of *Isogomphodon oxyrhynchus* (Müller & Henle, 1839) and Discussion of its Phylogenetic Position within Carcharhinidae (Chondrichthyes, Carcharhiniformes)**. 2021. Tese de Doutorado. Museu Zoologia da Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.11606/D.38.2021.tde-15042021-152715>
- SORET, B. Guia de identificação das principais espécies de raias e tubarões do Atlântico oriental tropical, para observadores de pesca e biólogos. 76 p, species in a global

elasmobranch conservation hotspot. **Scientific reports**, v. 8, n. 3347, p. 1-11, 2006.

SOUZA, B.C. *et al.* Genetic diversity assessment for the vulnerable migratory cownose ray *Rhinoptera bonasus* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) from the southwestern Atlantic Ocean. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.

SPRINGER, S. *et al.* A revision of North American sharks allied to the Genus *Carcharhinus*. American Museum Novitates, n. 1451, p. 1-13, 1950.

SPRINGER, S. *et al.* Correction for “A revision of North American sharks allied to the Genus *Carcharhinus*.”. Copeia, 1951, p. 1-244, 1951.

STRIDE, R.K.; BATISTA, V.S.; RAPOSO, L.A.B. Pesca experimental de tubarão com redes de emalhar no litoral maranhense. v. 3, p. 160. CORSUP/EDUFMA. São Luís. Maranhão, Brazil, 1992.

SBISÀ, Elisabetta *et al.* Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**, v. 205, n. 1-2, p. 125-140, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00404-6)

SCHLUESSEL, V. *et al.* Evidence for extensive population structure in the white-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitochondrial gene sequences. **Journal of Zoology**, v. 281, n. 1, p. 46-55, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00680.x>

SCHULTZ, J. K. *et al.* Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). **Molecular Ecology**, v. 17, n. 24, p. 5336-5348, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04000.x>

SHEPHERD, T. D.; MYERS, R. A. Direct and indirect fishery effects on small coastal elasmobranchs in the northern Gulf of Mexico. **Ecology letters**, v. 8, n. 10, p. 1095-1104, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00807.x>

SOUTHERN, Š. O.; SOUTHERN, P. J.; DIZON, A. E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. **Journal of molecular evolution**, v. 28, p. 32-42, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02143495>

STONEKING, Mark. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 4, p. 1029-1032, 2000.

TAANMAN, J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1410, n. 2, p. 103-123, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology** v. 56, n. 4, p. 564–577, 2007 <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>

TSUKIHARA, T. *et al.* The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**,1136-1144(1996). DOI:[10.1126/science.272.5265.1136](https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136)

VÉLEZ-ZUAZO, X.; AGNARSSON, I. Shark tales: A molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 58, n. 2, p. 207-217, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.018>

VIANA, J.P. Recursos pesqueiros do Brasil: Situação dos estoques, da gestão, e sugestões para o futuro. *Boletim regional, urbano e ambiental*, v. 07, p. 45-59, 2013.

UNDERWOOD, C. J. Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. *Paleobiology*, v. 32, n. 2, p. 215-235, 2006.

WARD, R.D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>

WINCHELL C.J.; MARTIN A.P.; MALLATT J. Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 31, p. 214–224, 2004. DOI:10.1016/J.YMPEV.2003.07.010

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of heredity*, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.

XIA, X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1550-1552, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy073>

APÊNDICES

Figura 1- Gráficos do número de transições e transversões versus a divergência encontrada nos conjuntos de dados RAG e mtDNA, usados para determinar os níveis de saturação.

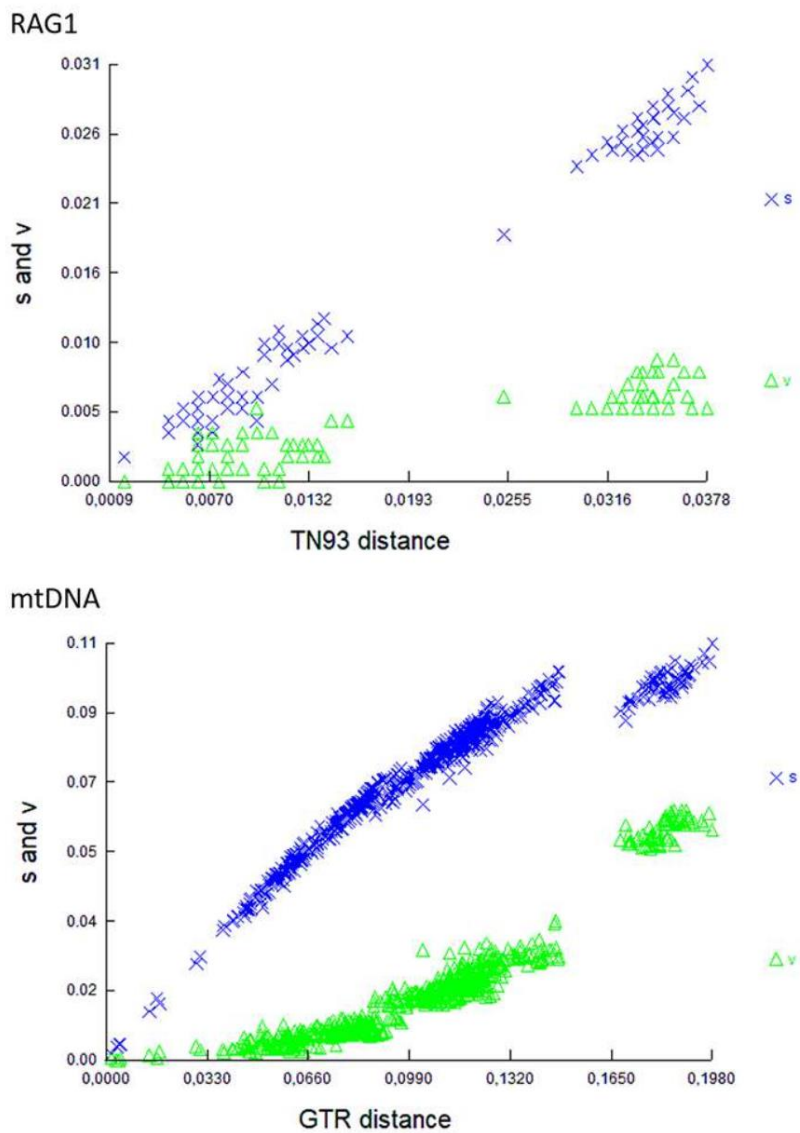


Figura 2- Inferência filogenética, baseada na abordagem de Máxima Verossimilhança (ML), para cada locus mitocondrial de forma independente, com os respectivos valores de *bootstrap*. Os modelos evolutivos utilizados para os diferentes loci mitocondriais foram (a) COI: HKY+G(1,0428)+I(0,6049), (b) 12S-16S: GTR+G(0,4122)+I(0,3388) e (c) ND4: TN93+ G(1,1641)+I(0,5130). Apenas os valores de *bootstrap* superiores a 50% são apresentados nos gráficos



Figura 3- Inferência filogenética, baseada na abordagem de Neighbor Joining (NJ), para cada locus mitocondrial de forma independente, com os respectivos valores de *bootstrap*. Os modelos evolutivos utilizados para os diferentes loci mitocondriais foram (a) COI: HKY + G (1,0428) + I (0,6049), (b) 12S-16S: GTR + G (0,4122) + I (0,3388) e (c) ND4: TN93+ G(1,1641)+I(0,5130). Apenas os valores de *bootstrap* superiores a 50% são apresentados nos gráficos

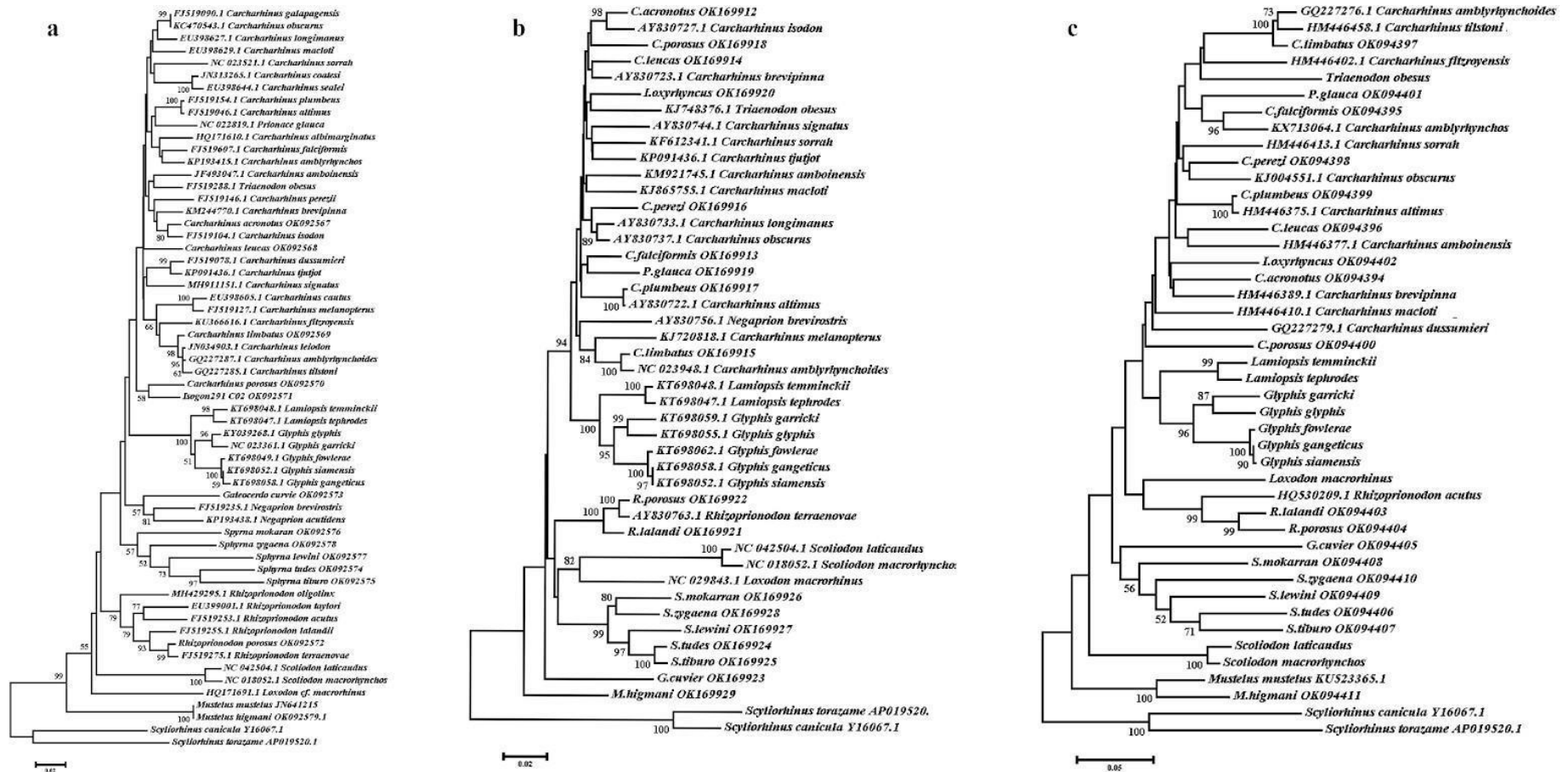


Figura 4- Inferência filogenética, baseada na abordagem de Inferência Bayesiana (BI), para cada locus mitocondrial de forma independente, com os respectivos valores de bootstrap. Os modelos evolutivos utilizados para os diferentes loci mitocondriais foram (a) COI: HKY+G(1,0428)+I(0,6049), (b) 12S-16S: GTR+G(0,4122)+I(0,3388) e (c) ND4: TN93+ G(1,1641)+I(0,5130). Apenas os valores de bootstrap superiores a 50% são apresentados nos gráficos.

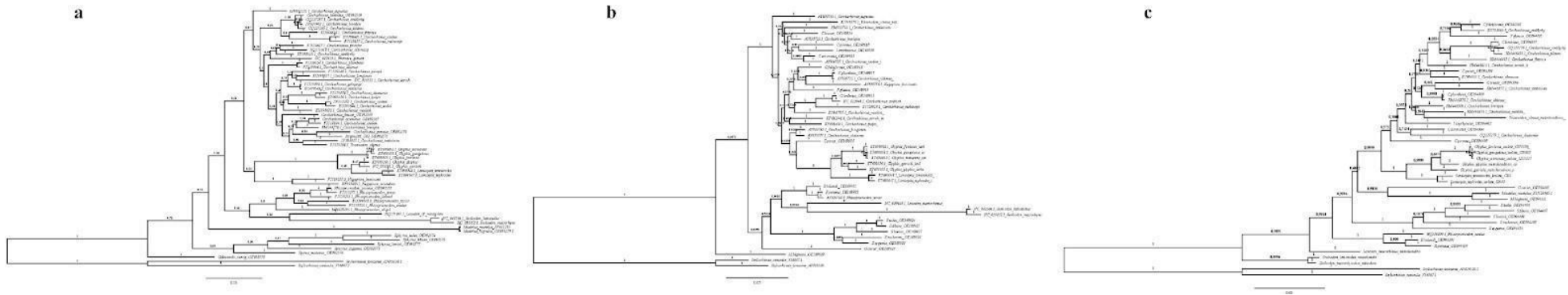


Figura 5- Inferência filogenética, baseada na abordagem de Máxima Parcimônia (MP), para cada locus mitocondrial de forma independente, com os respectivos valores de *bootstrap*. Apenas os valores de *bootstrap* superiores a 50% são apresentados nos gráficos

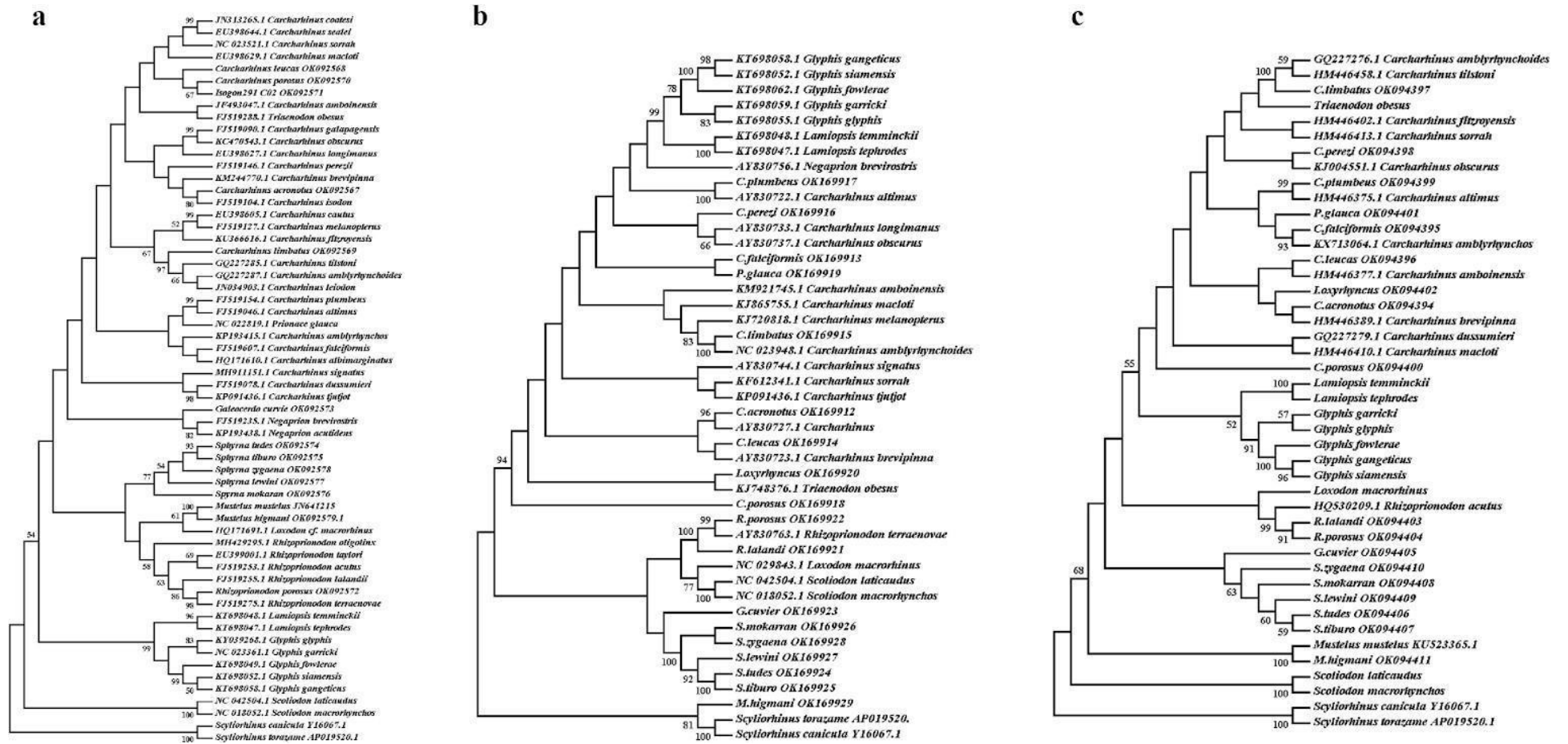


Figura 6- Inferências filogenéticas do conjunto de dados mtDNA, com os respectivos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. O modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G(0,5093)+I(0,4665) foi utilizado para as abordagens de Máxima Verossimilhança (ML), Neighbor Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (BI). Apenas os valores de *bootstrap* superiores a 50% são apresentados nos gráficos.

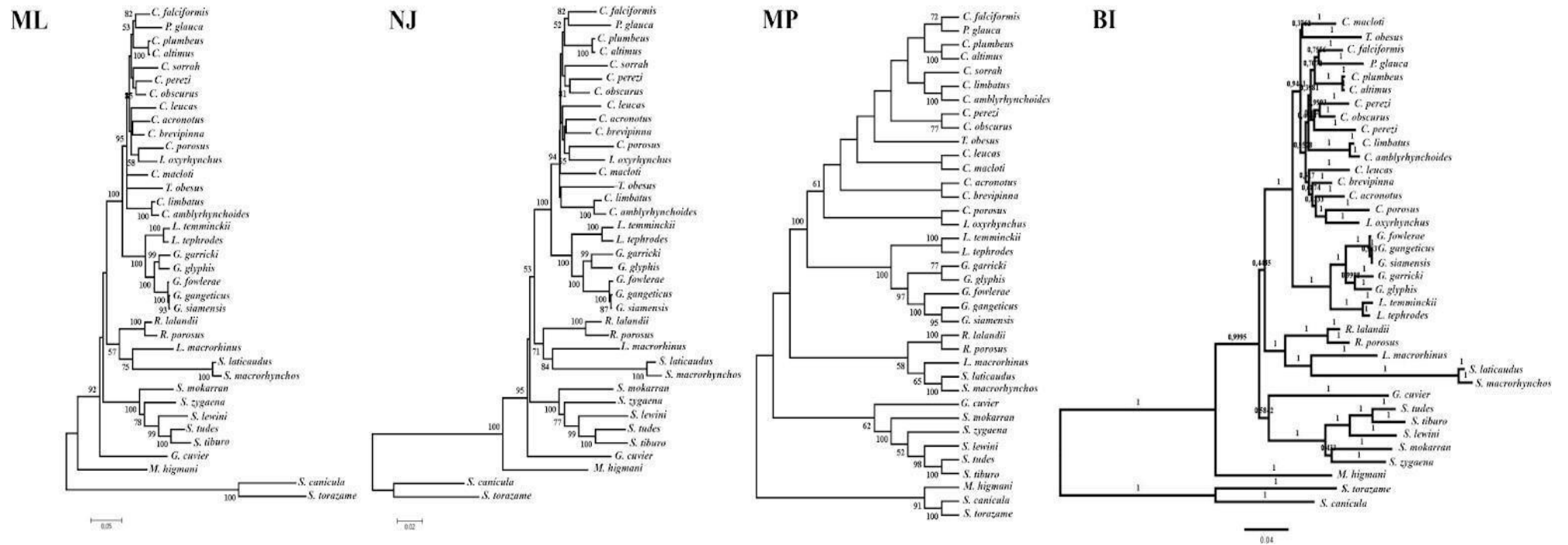


Figura 7- Inferências filogenéticas do conjunto de dados RAG1, com os respectivos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. O modelo de substituição de nucleotídeos TN93+G(0,0963) foi utilizado para as abordagens de Máxima Verossimilhança (ML), Neighbor Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (BI). Apenas os valores de *bootstrap* superiores a 50% são apresentados nos gráficos.

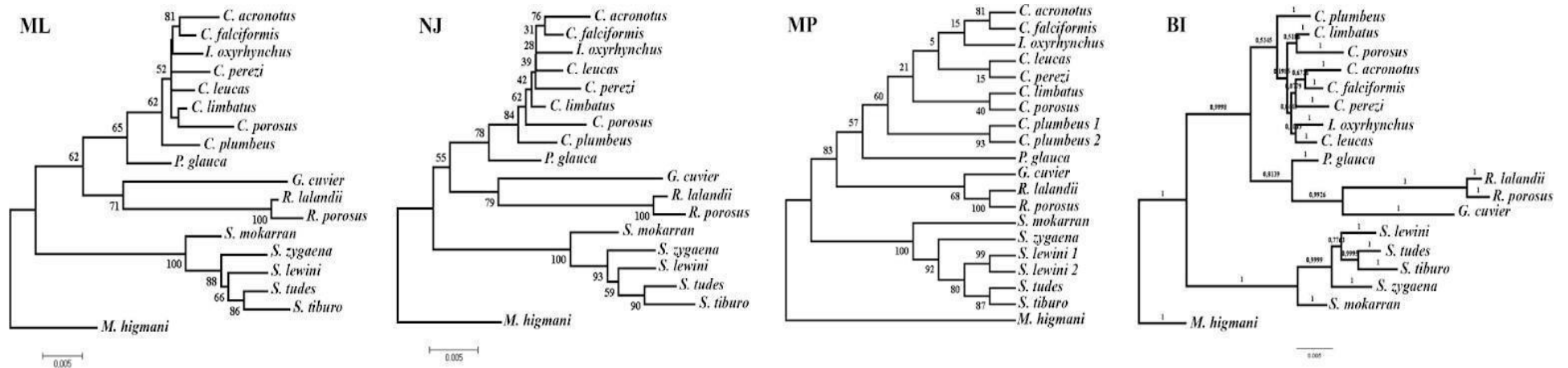


Tabela 1- Matriz de distância genética (%) para as espécies da família Carcharhinidae com base no conjunto de dados mtDNA. As distâncias p são apresentadas abaixo da diagonal, enquanto as distâncias corrigidas (GTR+G (0,5093)+I (0,4665)) são apresentadas acima da diagonal, em negrito.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1 <i>L_oxy</i>		5,8	7,5	6,9	7,6	7,1	7,0	7,0	6,8	8,7	5,8	7,2	6,7	7,7	8,4	8,8	9,8	9,9	9,9	10,0	10,1	10,1	10,5	12,9	12,9	14,5	15,2	18,9	19,3
2 <i>C_acr</i>	4,8		6,0	6,2	6,7	5,8	5,9	6,9	6,0	7,2	4,5	6,3	5,1	7,1	7,5	8,5	9,9	9,4	9,5	9,7	9,8	9,6	9,9	12,0	13,1	13,9	13,3	18,5	18,8
3 <i>C_fal</i>	5,8	4,9		6,7	6,3	6,0	5,4	8,3	5,3	6,7	5,2	6,2	5,1	6,8	6,0	8,6	8,7	8,7	9,2	9,0	9,1	9,9	9,5	11,5	12,9	15,0	14,5	20,2	20,8
4 <i>C_jeu</i>	5,5	5,1	5,4		6,9	6,3	6,3	7,5	6,3	7,2	5,6	6,4	5,6	7,4	7,9	8,9	10,4	10,1	10,1	10,1	10,2	9,9	10,2	12,4	13,8	15,1	14,8	19,2	19,6
5 <i>C_lim</i>	6,1	5,5	5,2	5,6		7,9	6,8	8,6	6,8	1,4	6,4	6,6	6,2	7,3	7,8	8,4	10,3	9,7	10,2	10,3	10,2	10,2	10,2	11,9	13,1	14,2	13,9	18,5	18,7
6 <i>C_per</i>	5,7	4,8	4,9	5,1	6,2		6,2	8,2	6,1	8,1	5,7	6,7	4,2	6,7	7,7	8,8	10,3	10,3	10,1	10,1	10,2	10,0	10,2	12,8	14,3	15,6	15,2	20,9	20,9
7 <i>C_plu</i>	5,6	4,9	4,5	5,2	5,6	5,1		7,9	0,4	7,1	5,2	6,1	5,2	6,7	6,5	8,3	9,1	8,9	9,1	9,1	9,2	9,4	9,5	11,9	12,8	14,2	14,2	17,6	17,6
8 <i>C_por</i>	5,6	5,6	6,4	5,9	6,7	6,3	6,2		8,0	8,8	6,8	7,6	6,9	9,0	9,4	10,3	10,2	10,5	9,9	10,0	10,1	10,3	9,7	13,9	14,2	14,9	13,4	19,3	19,7
9 <i>C_alt</i>	5,5	5,0	4,4	5,2	5,6	5,0	0,4	6,3		7,2	5,2	5,9	5,1	6,8	6,9	8,0	9,1	9,0	8,9	8,8	8,8	9,3	9,3	11,9	12,6	14,5	14,0	17,7	17,7
10 <i>C_amb</i>	6,8	5,8	5,4	5,8	1,4	6,4	5,8	6,8	5,9		6,8	7,1	6,2	7,5	7,9	8,9	10,8	10,6	10,8	10,9	10,8	10,8	10,6	12,0	13,9	14,8	14,2	19,0	19,3
11 <i>C_bre</i>	4,8	3,9	4,4	4,7	5,3	4,7	4,4	5,5	4,4	5,5		5,4	4,2	6,9	6,9	7,6	8,7	9,1	9,4	9,5	9,6	9,0	9,3	11,2	11,7	14,8	13,5	18,5	19,0
12 <i>C_mac</i>	5,8	5,2	5,0	5,2	5,4	5,4	5,0	6,0	4,9	5,8	4,5		4,9	7,3	8,0	8,3	9,3	9,2	9,6	9,7	9,7	8,9	9,2	11,7	12,6	15,2	13,5	18,6	20,0
13 <i>C_obs</i>	5,4	4,4	4,3	4,7	5,1	3,7	4,4	5,5	4,3	5,1	3,6	4,2		5,7	6,1	7,7	9,0	9,2	8,8	8,8	8,9	8,4	8,9	11,5	12,2	14,7	13,2	18,9	19,2
14 <i>C_sor</i>	6,0	5,7	5,4	5,9	5,8	5,4	5,4	6,8	5,4	6,0	5,6	5,8	4,7		8,1	9,8	10,1	10,1	9,9	9,8	9,9	10,1	10,3	13,4	14,5	15,3	15,6	22,1	22,7
15 <i>P_gla</i>	6,4	5,9	4,8	6,2	6,1	6,0	5,3	7,0	5,5	6,2	5,5	6,3	5,0	6,3		9,7	10,8	10,5	11,0	10,8	10,8	10,6	10,6	12,6	13,1	15,7	15,2	19,2	19,7
16 <i>T_obe</i>	6,6	6,5	6,5	6,7	6,5	6,6	6,3	7,5	6,1	6,8	5,9	6,4	6,0	7,2	7,2		12,0	11,6	11,9	12,1	12,1	12,2	11,9	13,3	14,6	17,3	16,4	20,9	21,1
17 <i>L_tem</i>	7,4	7,1	6,6	7,5	7,3	7,6	6,8	7,6	6,9	7,9	6,9	7,0	7,0	7,5	7,7	8,2		1,7	6,7	6,8	6,8	7,1	7,0	13,1	14,4	16,7	14,9	19,3	20,3
18 <i>L_tep</i>	7,3	7,4	6,7	7,7	7,7	7,6	7,0	7,5	7,0	8,0	6,7	7,1	6,9	7,5	7,9	8,6	1,6		7,0	7,1	7,2	7,1	6,8	13,6	14,9	17,3	15,3	20,2	21,4
19 <i>G_fow</i>	7,4	7,2	6,9	7,5	7,7	7,5	6,9	7,3	6,8	8,0	7,2	7,3	6,8	7,4	7,9	8,4	5,6	5,4		0,4	0,4	4,5	4,9	13,4	14,5	15,2	16,5	20,6	22,0
20 <i>G_sia</i>	7,5	7,3	6,8	7,6	7,7	7,6	7,0	7,5	6,8	8,1	7,2	7,3	6,8	7,3	7,8	8,5	5,7	5,4	0,4		0,1	4,6	5,1	13,4	14,4	15,0	16,6	20,6	22,0
21 <i>G_gan</i>	7,5	7,4	6,8	7,6	7,7	7,6	7,0	7,5	6,8	8,0	7,3	7,3	6,8	7,3	7,9	8,5	5,7	5,5	0,4	0,1		4,7	5,1	13,4	14,5	15,1	16,7	20,7	22,1
22 <i>G_gly</i>	7,5	7,3	7,4	7,4	7,7	7,5	7,2	7,6	7,1	8,0	6,9	6,8	6,5	7,5	7,7	8,6	5,7	5,7	3,9	4,0	4,0		3,3	13,1	14,4	15,1	15,9	20,6	22,5
23 <i>G_gar</i>	7,8	7,4	7,1	7,6	7,6	7,6	7,2	7,2	7,1	7,9	7,1	7,0	6,8	7,6	7,7	8,4	5,4	5,6	4,2	4,3	4,4	3,0		13,1	14,6	15,4	15,7	20,2	21,3
24 <i>R_la</i>	8,7	8,4	8,0	8,5	8,3	8,8	8,3	9,2	8,3	8,4	7,9	8,2	8,1	9,0	8,5	8,9	9,2	8,9	9,0	9,0	9,0	8,9	8,8		3,2	15,5	12,5	17,8	18,2
25 <i>R_po</i>	8,6	8,9	8,6	9,2	8,9	9,4	8,6	9,3	8,6	9,2	8,0	8,6	8,3	9,4	8,6	9,5	9,8	9,5	9,5	9,4	9,4	9,4	9,5	2,8		17,2	13,2	18,0	18,4
26 <i>G_cur</i>	9,5	9,2	9,7	9,8	9,5	10,1	9,5	9,6	9,6	9,8	9,6	10,0	9,7	9,9	10,0	10,7	10,9	10,7	9,8	9,7	9,8	9,8	10,0	9,8	10,5		18,9	21,9	23,0
27 <i>L_mac</i>	9,8	9,0	9,5	9,7	9,3	9,8	9,5	8,9	9,3	9,5	9,0	9,0	8,9	10,0	9,8	10,4	9,9	9,8	10,4	10,4	10,5	10,1	10,0	8,6	8,9	11,3		16,6	17,5
28 <i>S_lat</i>	11,1	11,0	11,5	11,3	11,1	12,0	10,5	11,2	10,6	11,3	10,9	11,0	11,1	12,4	11,2	11,9	11,6	11,3	11,8	11,8	11,8	11,7	11,7	10,8	10,8	12,2	10,4		1,8
29 <i>S_mac</i>	11,2	11,0	11,7	11,4	11,0	11,8	10,4	11,2	10,5	11,3	11,0	11,4	11,1	12,5	11,3	11,8	12,0	11,6	12,3	12,3	12,3	12,4	12,0	10,7	10,7	12,5	10,7	1,7	

Tabela 2- Matriz de distância genética (%) para as espécies da família Carcharhinidae com base no conjunto de dados RAG1. As distâncias p são apresentadas abaixo da diagonal, enquanto as distâncias corrigidas (TN93+G (0,0963)) são apresentadas acima da diagonal, em negrito.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>I. oxyrinchus</i>		0,6	0,7	0,7	0,9	1,0	1,0	1,2	1,6	4,5	4,9	5,0
2 <i>C. limbatus</i>	0,5		0,5	0,5	0,7	0,8	0,8	0,8	1,4	4,2	4,6	4,7
3 <i>C. falciformis</i>	0,6	0,5		0,6	0,8	0,7	0,9	1,2	1,5	4,4	4,8	4,9
4 <i>C. leucas</i>	0,6	0,5	0,5		0,8	0,9	0,9	1,1	1,5	4,2	4,4	4,6
5 <i>C. perezi</i>	0,8	0,6	0,7	0,7		1,1	1,1	1,3	1,7	4,6	4,6	4,8
6 <i>C. acronotus</i>	0,9	0,7	0,6	0,8	1,0		1,2	1,5	1,8	4,9	5,2	5,4
7 <i>C. plumbeus</i>	0,9	0,7	0,8	0,8	1,0	1,1		1,2	1,3	4,5	4,4	5,0
8 <i>C. porosus</i>	1,1	0,7	1,0	1,0	1,2	1,3	1,1		1,6	5,0	5,5	5,6
9 <i>P. glauca</i>	1,4	1,2	1,3	1,3	1,4	1,5	1,2	1,4		3,1	4,1	4,3
10 <i>G. cuvier</i>	3,2	3,1	3,2	3,1	3,3	3,4	3,2	3,4	2,4		4,6	4,7
11 <i>R. lalandii</i>	3,3	3,2	3,2	3,1	3,2	3,5	3,2	3,5	2,9	3,2		0,5
12 <i>R. porosus</i>	3,4	3,2	3,3	3,2	3,3	3,6	3,4	3,6	3,0	3,3	0,5	

Tabela 3- Descrição da composição nucleotídica para cada bloco conservado encontrado para o banco de dados, divididos por domínios e descritos em consenso por família, com exceção a *C. Glaucus*, mediante a não existência do segundo bloco por falta de informação para o domínio HV 5'.

Consenso por Família	HV 5'								
	59-75	87-116	197-209	232-245	257-269	339-355	385-398	462-476	545-571
Carcharhynidae	TGACATATTAA TGATAT	YCYTRATATACCACATAH(T/-)(A/-))CCMTCATTCC	ATWACATRCT ATG	TCRRCTATWTC ATT	YYTARYCCTC AYT	TGCCG- TTGGTAAGAAA	TGTACGGTTT GTGG	CWTMTAATCCTT GAWY	RGTCMTCTAGyTCCCTTTAA TGCATA
Carcharhynidae (<i>C. glaucus</i>)	TACCACGCTAA TGATAT	-	ATTACATACT ATG	TCGACTATTTT ATT	YTAAACCCTC ATT	TAACA- TTAATAAGAAA	TGAATGGTTA ACAA	CATATAATCCTTG ATA	AGTCCTCTAGCTCCCTTTAA TGACAT-
Galeocerdo	TGACATATTAA TGATAT	TCCTAATATACCACATACAACCCTC ATTCC	ATTACATACT ATG	TCAGCTATTTT ATT	YTAAACCCTC ATT	TGCCG- TTGGTAAGAAA	TGTACGGTTT GTGG	CATATAGTCCTTG ATA	AGTCCTCTAGCTCCCTTTAA TGGCATA
Triakidae	TGACATATATA TGATAT	TACTGATATACCACATAATACCCA TATTCC	ATTACATACT ATG	TCAGCTATWTC ATT	TTTAACCCTCA TT	TGCCG- TTGGCGAGAGA	TGAACGGTTT GTGG	CATCTAATCCTTG ATA	AGTACTCTAGCTCCCTTTAA TGGCATA
Scyliorhinidae	TAACAYCtATA TGAYAT	CCYTAATRTAT- ACATAATACATTCA	ATTACATACT ATG	TCAGCTATTTT ATT	TTTAACCCTCA TT	TGYGGGCTGGATA GAAA	TGTTCCGGTTT GTGG	CATACAATCCTTG ATC	WTTACTCTAGCTCCCTTTAA TGCAMA

Consenso por Família	Cental					
	621-662	685-696	732-747	797-818	892-903	
Carcharhynidae	TTCGGWATGAAGCAAAYCSCTATTC	CCCCGGAAGRGCTCATYTGTTTCATT	CTATYCTCGACA	GAGATTAGATTGTCTRA	GTTTGGKITTITTTGATTARTGM	CATTTCATTATT
Carcharhynidae (<i>C. glaucus</i>)	TTTTGGATGAAGCAAATCGCTATT	CCCCGGAAGGGCTCATCTGGTTTCATT	CTATCCTCGACA	GAGATTAGATTGTCAA	GTTTGGTTTWTITGATTAATTC	CATTTCATWATT
Galeocerdo	TTCGGTATGAAGCAAATAACTATT	CCCCGGAAGGGCTCATCTGGTACATT	CTATCCTCGACA	GAGATTAGATTGTCAA	GTTTAGGTTTITTTGATTAATGC	CATTTCATTATT
Triakidae	TTCGGTATGAAGCAAATAACTACT	CCCCGGAAGGGCTCATCTGGGACACT	CTATCCTCGACA	GAGATTAGATTGTCAA	GTTTGGGTTTITTTGATTAATGA	CATTTCATTATT
Scyliorhinidae	TGGGGATGAAGCAAATCGCTAT	GCCCWAGGAGGGCTGATCTWRGTCATT	ATATCCTCGACA	GARATATAATTGTCAA	TCCTTRTARRMRTAATCARTAW	CACCCAAAT-CY

Consenso por Família	HV 3'		
	923-934	1020-1050	1058-1086
Carcharhynidae	TMTYTGGCATA	GGTAAAAACCCCC-TCCCCCTTAATATACA	TCTCGAAAAACCCWAAAACGAGGGCCGA
Carcharhynidae (<i>C. glaucus</i>)	TATTTGGCATA	GGTAAAAACCCCC-TCCCCCTTAATATACA	TCTCGAAAAACCCCTAAAACGAGGGCCGA
Galeocerdo	TATCTGGCATA	GGTAAAAACCCCC-TCCCCCTTAATATACA	TCTCGAAAAACCCCTAAAACGAGGGCCGA
Triakidae	TATCTGGCATA	GGTAAAAACCCCC-TCCCCCTTAATATACA	TCTCGAAAAACCCCTAAAACGAGGGCCGA
Scyliorhinidae	TATCTGGCATA	GGTAAAAACCCCC-TCCCCCTTAATATAYA	TCTCGAAAAACCCAAAAACGAGGGCCGA

Figura 8- Padrões de repetição observados para as espécies que obtiveram resultados no software Tandem Repeat Finders. Formando três blocos agrupando padrões de duplicação diferentes, mas que se assemelham por fatores diversos, como quantidade de nucleotídeos, início e fim dos blocos dentro outras características compartilhadas.

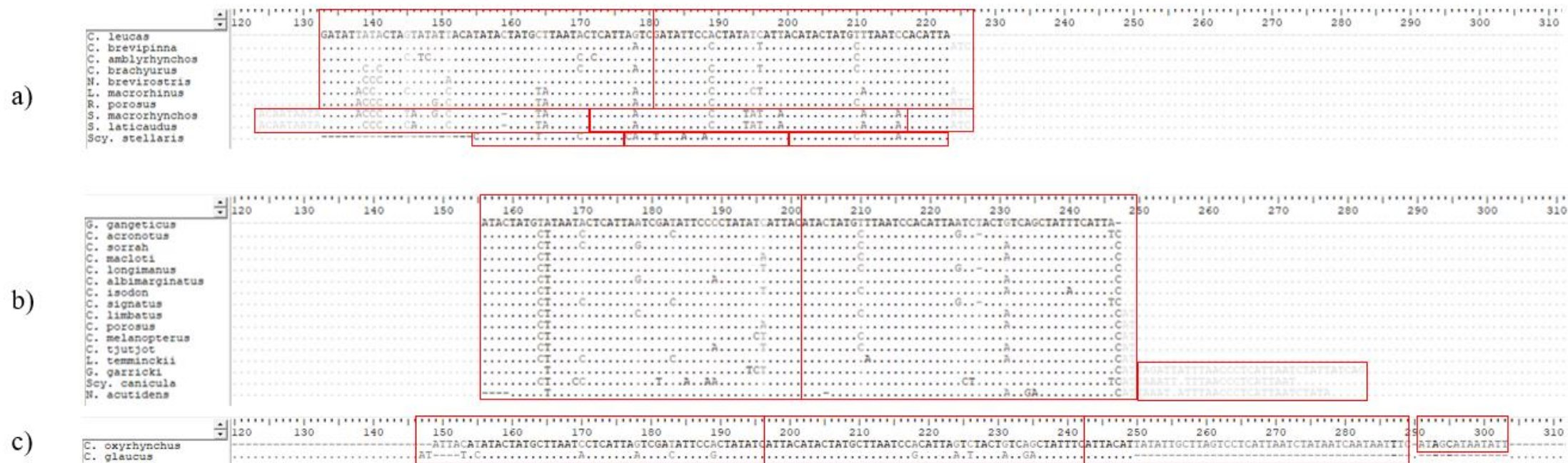


Tabela 4- Descrição da composição nucleotídica de cada repetição encontrada pelo software TRF para todas as espécies do banco de dados, indicando também os parâmetros fornecidos e identificando cada repetição por números sequenciais ligados a espécie correspondente.

Espécies	Repetições	Posição	Pares de base	Tamanho	Composição nucleotídica	% de correspondências	% de indels	score	entropia
<i>C. leucus</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-223	46 43	1,9	GATATTACTAGTAT-ATTACATATCTATGCTTAATACTCATTAGTC GATATCCACATATATCTATCTACTAGTTTAAATCCACATTA	80	8	113	1,76
<i>C. acronotus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCCCATTAATCGACATTCGCCATATCATTAC ATACTATGCTTAATCCACATTAGTACGTGTCAGGTATTTCAATTC	81	0	125	1,8
<i>C. limbatus (limb)</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-249	46 48	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCAATAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTAGCTATTTCAATACAT	81	4	123	1,75
<i>C. porozus (por)</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-249	46 48	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATAAATAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTA-TCAGCTATTTCAATACAT	79	4	116	1,73
<i>C. perzi (per)</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. plumbeus (plu)</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. obscurus</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. sorrah</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCCCATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTA-TCAGCTATTTCAATAC	83	4	130	1,77
<i>C. melanopterus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-249	46 48	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATAC	77	0	111	1,77
<i>C. maclozi</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATAAATAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTA-TCAGCTATTTCAATAC	81	4	123	1,74
<i>C. longimanus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATAC	77	0	111	1,79
<i>C. rjauget</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-249	46 48	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATAAATAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTA-TCAGCTATTTCAATACAT	81	4	123	1,73
<i>C. amboinensis</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. brevigena</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-226	46 46	2	GATATTACTAGTA-TATTACATATACTATGCTTAATACTCATTAAATC GATATCCCATATATTATACATATACTGCTTAATCCACATTAATC	81	8	119	1,74
<i>C. albinarginatus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATAC	79	4	116	1,76
<i>C. amblyrhynchus</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-223	48 43	1,9	GATATTACTACTCTTATTACATATACTAGTCTAAATCCCATTAGTC GATATCCCATATATCATTAC-ATACTAGCTTAAATCCACATTA	84	4	131	1,78
<i>C. amblyrhynchoides</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. brachyurus</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-223	48 43	1,9	GATATTCTCCTAGTATATACATATACTAGTCTAAATCCCATTAATC GATATCCCATAT-TATTATTAC-ATACTATGCTTAAATCCACATTA	86	8	136	1,76
<i>C. galapagensis</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>C. isodon</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATAAATAC ATACTATGCTTAATCCACATTAATCTACTA-TCAGCTATATCATTAC	83	4	118	1,74
<i>C. signatus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-247	46 46	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGCTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATTC	79	0	118	1,8
<i>C. oxyrhynchus</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3 Rep 4	149-196 197-242 243-289 291-303	48 46 47 13	3,3	ATTACAT-ATACTAGCTTAAATCCCATTAAGTCGATATTCACATATATC ATTACATCTA-TGCTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTC ATTACATATATTGGTTAGCTCCTAATTAATCTATAATCAATAATTTTC ATAGCATAATATT	74	4	157	1,78
<i>Trienodon obesus</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>Glyphis foveolatae</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>Glyphis gangeticus</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-246	46 45	2	ATACTATGATAACTCATTAAATCGA-TATCCCATATATCATTAC ATACTATGTTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATTC	77	0	112	1,76
<i>Glyphis garricki</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	156-201 202-247 248-282	46 46 55	2,7	ATACTATGTTTAAATCTACTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGTTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATTC ATTAGATTATTAACCCCTCATTAATCTATTATCAG	76	1	133	1,75
<i>Glyphis glyphis</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>Negaprion acutidens</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	160-204 206-251 252-277	45 46 25	2,6	TATGTTTAAATCTACTAATCGA-TATGCCCTATATCATTACA-TA TATGTTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATTC AAATTTAAACCCCTCATTAATCTATA	80	5	144	1,69
<i>Negaprion brevirostris</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-223	48 43	1,9	GATATTCCCTAGTATATAACATATACTAGTCTAAATCCCATTAATC GATATCCCATAT-TATCATTAC-ATACTATGTTTAAATCCACATTA	82	8	122	1,8
<i>Lamiopsis septrodes</i>	Rep 1 Rep 2	- -	- -						
<i>Lamiopsis temminckii</i>	Rep 1 Rep 2	156-201 202-249	46 48	2	ATACTATGCTTAATCTACTATTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATG-TATAATCCACATTAATCTACTA-TATCAGCTATTTCAATACAT	81	0	125	1,75
<i>Loxodon macrorhinus</i>	Rep 1 Rep 2	133-180 181-224	48 44	2	GATATAACCATGATATAACATATACTAGTCTAAATCCCATTAATC GATATCCCATAT-TACTATTACTACTAGTATAATCCACATTAATC	80	8	115	1,74
<i>Scoliodon laticaudus</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	124-171 172-217 218-226	47 46 9	2,2	ACATAATAGATATTTCCCTCAAGATATCAGCATATATGTTATAAATAC TCATTAATCGA-TATCCCATTAATATAACATA-CTATGTTATAATAC ACATTAATC	83	1	148	1,7
<i>Scoliodon macrorhynchus</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	124-171 172-217 218-226	47 46 9	2,2	ACAATAATAGATATAACCCCTAATGTCACATATATATGTTATAAATAC TCATTAATCGA-TATCCCATTAATATAACATA-CTATGTTATAAATAC ACATTAATC	82	1	141	1,72
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	133-180 181-226 147-196	48 46 46	2	GATATACCCCTAGTATGTCACATATACTAGTATAATCTACTTAAATC GATATCCCATAT-TATCATTACATACTAGCTTAAATCCACATTAATC ATTACATATACTGTTAATCTACTAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATTACATACTAGCTTAAATCCCATTAATTTACTATCGACTATTTTC ATTACAT	77	8	105	1,8
<i>C. glaucus</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3 Rep 4 Rep 5 Rep 6	197-242 243-289 462-514 515-567 568-594	46 47 53 53 25	2,5	CATATAACCTGATTTCGTCAGAAATGATAATCCCTAGCTTTCTTAAAGA CATATAACCTGATTTCGTCAGAAATGCAAATCCTAGCTCCCTTAAATGA CATTTAATCCTGTATCGTCTCAAGA	83	0	178	1,9
<i>Galocercdo curvier</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>Masteluz (nigmani)</i>	Rep 1 Rep 2								
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	155-176 177-200 201-223	22 24 23	3	CATACTAGTTTAAATCTCATTT- CAT-CTATAAATCACTATATCATT CATACTAGCTTAAATCCACATTA	66	14	57	1,69
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Rep 1 Rep 2 Rep 3	156-201 202-247 248-272	46 46 24	2,5	ATACTATGCTTAAACCCCTAATTAATCTATAATCGA-TATGCCCTATATCATTAC ATACTATGTTTAAATCCACATTAATCTACTAGCTGTCAGGTATTTCAATTC AITAAATTTTAAACCCCTCATTAAT	74	0	127	1,7

ANEXO

Hindawi
Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research
Volume 2023, Article ID 4798805, 16 pages
<https://doi.org/10.1155/2023/4798805>



Research Article

Evolutionary History and Taxonomic Reclassification of the Critically Endangered Daggernose Shark, a Species Endemic to the Western Atlantic

Luis Fernando da Silva Rodrigues-Filho ¹, Paula da Costa Nogueira ¹,
Davidson Sodré ², José Rafael da Silva Leal ¹, Jorge Luiz Silva Nunes ³,
Getulio Rincon ⁴, Rosangela Paula Teixeira Lessa ⁵, Iracilda Sampaio ⁶,
Marcelo Vallinoto ⁶, Jonathan S. Ready ⁷ and João Bráullio Luna Sales ⁷

¹Federal Rural University of Amazonia, Research Group for Marine and Coastal Studies in the Amazon (GEMCA), Capanema Campus, 68600-030 Capanema, Pará, Brazil

²Federal Rural University of Amazonia, Capitão Poço Campus, 68650-000 Capitão Poço, Pará, Brazil

³Federal University of Maranhão, Laboratory of Aquatic Organisms, Department of Oceanography and Limnology, Avenida Portuguese, 1958, Bacanga, 65080-805 São Luís, Maranhão, Brazil

⁴Federal University of Maranhão, Campus Pinheiro, 65200-000 Pinheiro, Maranhão, Brazil

⁵Marine Population Dynamics Laboratory (DIMAR), Department of Fisheries and Aquaculture, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

⁶Federal University of Pará, Faculty of Biological Sciences, Alameda Leandro Ribeiro, 68600-000 Bragança, Pará, Brazil

⁷Federal University of Pará, Integrated Biology Research Group, Center for Advanced Biodiversity Studies, Av. Perimetral 01, PCT-Guamá, Terreno 11, CEP: 66075-110 Belém, Pará, Brazil

Correspondence should be addressed to João Bráullio Luna Sales; brullio@ufpa.br

Received 4 July 2022; Revised 16 February 2023; Accepted 17 February 2023; Published 20 March 2023

Academic Editor: Sawel Daniels

Copyright © 2023 Luis Fernando da Silva Rodrigues-Filho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The family Carcharhinidae includes the most typical and recognizable sharks, although its internal classification is the subject of extensive debate. In particular, the type genus, *Carcharhinus* Blainville, 1816, which is also the most speciose, appears to be paraphyletic in relation to a number of morphologically distinct taxa. *Isogomphodon oxyrinchus* (Valenciennes, 1839) (the daggernose shark) is a carcharhinid, which is endemic to a limited area of the Western Atlantic between Trinidad and Tobago and the Gulf of Maranhão in northern Brazil, one of the smallest ranges of any New World elasmobranch species. In recent decades, *I. oxyrinchus* populations have been decimated by anthropogenic impacts, which has led to the classification of the species as critically endangered by the IUCN. However, there is considerable debate on both the validity of the species (*I. oxyrinchus*) and the status of *Isogomphodon* Gill, 1862 as a distinct entity from the genus *Carcharhinus*. The present study is based on a molecular assessment of the genetic validity of the *I. oxyrinchus* that combines mitochondrial and nuclear markers, which were used to identify the biogeographic events responsible for the emergence and dispersal of the species in northern Brazil. The genetic distance analyses and phylogenetic trees confirmed the paraphyly of the genus *Carcharhinus*, recovering a clade comprising *Carcharhinus*+*I. oxyrinchus*+*Prionace glauca* (Linnaeus, 1758). Our results indicate not only that the daggernose shark is actually a member of the genus *Carcharhinus*, but that it is genetically more closely related to *Carcharhinus porosus* (Ranzani, 1839) than it is to the other *Carcharhinus* species analyzed. Given this, *I. oxyrinchus* and *P. glauca* are therefore reclassified and recognized as *Carcharhinus oxyrinchus* and *Carcharhinus glaucus*. The daggernose shark, *Carcharhinus oxyrinchus*, diverged from *C. porosus* during the Miocene, when significant geomorphological processes occurred on the northern coast of South America, in particular in relation to the configuration of the Amazon River. It is closely associated with the area of the Amazon plume, and its distinctive morphological features represent autapomorphic ecological adaptations to this unique habitat and do not reflect systematic distinction from *Carcharhinus*.