

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



Bruno Alexandre de Franco

**Identificação das raias-viola *Rhinobatos horkelii*,
Rhinobatos percellens e *Zapteryx brevirostris*
(Chondrichthyes, Rhinobatidae) na costa central e
sul do Brasil utilizando marcadores moleculares.**

Botucatu – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



Bruno Alexandre de Franco

**Identificação das raias-viola *Rhinobatos horkelii*,
Rhinobatos percellens e *Zapteryx brevirostris*
(Chondrichthyes, Rhinobatidae) na costa central e
sul do Brasil utilizando marcadores moleculares.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu - Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas - Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu – SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria
de Jesus**

Franco, Bruno Alexandre de.

Identificação das raias-viola *Rhinobatos horkelii*, *Rhinobatos percellens* e *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes, Rhinobatidae) na costa central e sul do Brasil utilizando marcadores moleculares.

/ Bruno Alexandre de Franco. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Fausto Foresti

Assunto CAPES: 20200005

1. Peixe - Genética 2. Zoologia 3. Pesca

Palavras-chave: Elasmobrânquios; mtDNA; PCR-Multiplex; PCR-RFLP

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



Agradecimentos

Sei que é difícil agradecer a todos que me acompanharam, incentivaram e apoiaram nessa jornada de dois anos de Pós-Graduação, mas farei aqui um esforço para lembrar os que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Fausto Foresti pela oportunidade de realizar meu Mestrado; pelo incentivo e "empolgação" com o projeto; por todo seu zelo e carinho (não somente como orientador) por seus alunos; pelo exemplo de vida, tanto acadêmica quanto pessoal, e claro, por seus valiosos ensinamentos.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Morfologia e à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo – FAPESP, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Fabio Porto Foresti e Cláudio de Oliveira, pelo companheirismo, apoio e preciosas ajudas.

Aos amigos da Seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências: Sérgio, Luciane e Maria Helena, pela compreensão e paciência.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, Renato, Zé e Ricardo, pela amizade de todos os dias e profissionalismo durante as coletas. E a todos os demais funcionários do Departamento de Morfologia do IBB – UNESP.

Aos amigos companheiros de Pós-Graduação e Iniciação Científica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, pela excelente convivência e companheirismo, e pelas experiências compartilhadas ao longo desse período: Celso, Hernesto, Mauro, Emanuel, Irani, Márcio, Tatiane, Daniela, Andréia Polleto, Cristiane, Ricardo Benini, Carlos, Gleyse, Alex, Cláudia, Ricardo Paiva, Luciana, Lessandra, Marlon, Natalia, Gustavo, Andréia Alves, Kelly, Vanessa, Luiz Henrique, Luis Henrique, Ricardo, Priscila, Gláucia, Tássia, Vivi, José Carlos, Raquel, Aline, Bruno Mello, Bruno, Carol, Britsk, Juzinha, Jéferson, Guilherme, Fábio e "Marmud".

Aos meus grandes amigos Gustavo Camim, Leandro Agati, Eduardo Ledvinka, Ronald Ribeiro, Gustavo S., Felipe Guidolin, Breno, Paulo Vasconcelos, Thiago Buosi, Maíra, André Camargo, Alexssandro e Michele.

Um especial agradecimento ao meu grande amigo Fernando Mendonça, que desde os tempos de graduação se mostra amigo, leal e companheiro, e por ter sido um grande “sócio e co-orientador” nas questões e nos problemas dos últimos dois anos!!!

A toda minha família: Minha mãe Leda Maria (IN MEMORIAN), meu pai José Luiz e a Cláudia, às minhas queridas irmãs Ana Paula e Patrícia, ao meu amigão e também avô Murilo (IN MEMORIAN), minha avó Maria Helena e à minha “tia-avó-madrinha” Olga, à Maria Bernadete, ao meu cunhado Adriano, ao Caio, Tico e família e ao Felipe C.

A minha noiva, namorada, amiga, companheira e maior incentivadora das minhas conquistas: Luciana Bronzi de Souza.

"Agradeço você me fazer sorrir..Agradeço você pelo brilhos de seus olhos..Agradeço você pelo seu sorriso..Por me fazer acreditar que sou capaz! Por me fazer acreditar que existem pessoas e pessoas...obrigado... simplesmente obrigado...que deus te abençoe sempre..." (Fátima)

A todos, muito obrigado!

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”

(artigo 225 da Constituição Federal)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Coleta de amostras.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Padronização dos protocolos para o estudo populacional	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Amplificação por PCR	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Seqüenciamento do gene D-Loop e análises	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 Purificação dos produtos de PCR	Erro! Indicador não definido.
3.2.4 PCR de seqüenciamento.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.5 Purificação dos produtos de PCR de seqüenciamento	Erro! Indicador não definido.
3.3 Identificação genética das espécies <i>R. horkelii</i> , <i>R. percellens</i> e <i>Z. brevisrostris</i> ...	Erro! Indicador não definido.
3.3.1 PCR-multiplex	Erro! Indicador não definido.
3.3.2 PCR-RFLP	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
4.1 Análises Populacionais	Erro! Indicador não definido.
4.2 Marcadores moleculares de identificação de espécies - PCR-Multiplex	31
4.3 PCR-RFLP	33
4.4 Análises Populacionais	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
7. ANEXOS	46
7.1 Anexo 1.....	59
7.2 Anexo 2.....	62

RESUMO

A exploração pesqueira sem controle representa atualmente a maior ameaça às populações de elasmobrânquios e, em escala mundial, o manejo adequado destes recursos é dificultado pela escassez de informações básicas sobre sua dinâmica populacional. A identificação e a conservação de estoques geneticamente diferenciados e adaptados ao seu habitat representam um ponto fundamental para o setor pesqueiro, pela sua relação direta com a produtividade total e o uso sustentável dos recursos. Considerando a crescente exploração pesqueira, principalmente nas regiões sul e central da costa brasileira e devido à similaridade morfológica entre as espécies dos gêneros *Rhinobatos* e *Zapterix*, que frequentemente inviabilizam estatísticas de pesca e exploração, foram desenvolvidos métodos moleculares de identificação simultânea de indivíduos. Utilizando PCR-multiplex a partir do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I e PCR-RFLP, foram analisados indivíduos das espécies *Rhinobatos horkelii*, *Rhinobatos percellens* e *Zapteryx brevirostris*. A validação de tais métodos foi realizada com os 267 indivíduos coletados no período de um ano e meio (entre 2008 e 2010) na costa sul e central do Brasil.

Palavras Chave: Elasmobrânquios, *Rhinobatos*, *Zapterix*, mtDNA, PCR-Multiplex, PCR-RFLP.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Elasmobrânquios

Os tubarões e raias, constituintes da subclasse Elasmobranchii e classe Chondrichthyes, surgiram há pelo menos 450 milhões de anos atrás, no período Carbonífero (Hoenig & Gruber, 1990). Esses peixes se caracterizam principalmente por apresentarem esqueleto cartilaginoso e cinco a sete pares de fendas branquiais. A história de vida dos elasmobrânquios indica que são organismos muito bem sucedidos quanto às suas adaptações ao ambiente durante seu processo evolutivo. São peixes com características que resultam em baixa taxa de crescimento populacional, como alta longevidade, crescimento lento, atingindo grandes tamanhos corporais, maturação sexual tardia e geração de poucos descendentes, particularidades estas que os tornam organismos *K-estrategistas*. Como a população cresce de forma lenta, em comparação a outros peixes, essa estratégia prioriza o sucesso da prole. Para isto é necessário um alto gasto energético durante o período reprodutivo por parte das fêmeas, gerando um baixo número de descendentes bem formados, com grande expectativa de vida, o que compensaria a mortalidade natural da população (Hoenig & Gruber, 1990; Vooren & Klippel, 2005).

A biodiversidade dos elasmobrânquios, de uma forma geral, ainda é pouco conhecida. De acordo com o último levantamento realizado por Ebert & Compagno (2007), o grupo dos tubarões é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies e entre as raias são reconhecidas 5 ordens, 20 famílias e cerca 574 espécies (Compagno, 1999, 2005). Em águas brasileiras são reconhecidas 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias marinhas (Menezes et al., 2003). Na região entre Cabo Frio, no Rio de Janeiro, até a Península de Valdés, na Argentina, são encontradas aproximadamente 61 espécies de tubarões, agrupadas em 6 ordens e 19 famílias (Gadig, 2001) e 43 espécies de raias, agrupadas em 1 ordem e 8 famílias (Menezes et al., 2003).

Em estudos sobre a composição de espécies dos desembarques da frota industrial pesqueira de Itajaí e Navegantes (SC), que opera no Sudeste e Sul do Brasil, Mazzoleni e Schwingel (1999) registraram o desembarque de indivíduos representando 23 famílias de Elasmobrânquios, sendo uma espécie de quimera, 54 espécies de tubarões (29 gêneros) e 31 de raias (16 gêneros). Em estudo mais detalhado sobre as comunidades de peixes demersais na plataforma do Rio Grande do Sul, entre as profundidades de 9 a 200 metros, Vazzoler et al., 1999 registraram a presença de 11 famílias de Elasmobrânquios. Segundo Vooren (1998), 49 espécies de Elasmobrânquios demersais habitam as regiões da plataforma continental até o talude do sul do Brasil, entre 500 metros de profundidade. Dessas

espécies, 34 são de tubarões (3 Squatiniformes, 2 Lamniformes, 8 Squaliformes, 16 Carcharriniformes, 3 Hexanchiformes) e 25 de raias (14 Rajiformes, 7 Miliobatiformes e 4 torpediniformes). O autor caracteriza as espécies acima em quatro grupos, conforme sua distribuição temporal na costa sul brasileira: a) grupo constituído de 12 espécies com presença constante, como aquelas que completam todo ciclo de vida na costa sul do Brasil e que, ao longo do ano, não apresentam variação de abundância; b) grupo composto por 12 espécies identificadas como migrantes de inverno, como as espécies que migram para a plataforma continental brasileira durante o inverno e no verão são encontradas no Uruguai e na Argentina; c) grupo composto por 6 espécies identificadas como migrantes de verão que, com o avanço de massas de água tropical, como espécies de água quente que são, migram para a plataforma Sul Brasileira; d) grupo constituído por cerca de 19 espécies de ocorrência esporádica (Dulvy & Reynolds, 2002).

1.2.1 Pesca

O primeiro relato de extinção local devido à pesca ocorreu no Mar Irlandês, onde a espécie de Rajidae, *Dipturus batis*, tornou-se muito rara, após anos de extrema abundância no início do século XX. Essa raia era capturada acidentalmente por redes de arrasto na pesca do camarão, mas os registros dos dados de captura eram incompletos, não havendo separação por espécies na estatística pesqueira (Brander, 1981). Dulvy et al. (2000)

reportam outro caso de extinção local de duas espécies de raias (*Rastroraja alba* e *Dipturus oxyrinchus*), também no Mar Irlandês. Atualmente, diferentes espécies de peixes, incluindo algumas de tubarões e raias, estão relacionadas pelo IBAMA como espécies em extinção (Tabela 1) e estão merecendo maior atenção por parte dos pesquisadores e das entidades responsáveis pela conservação das espécies e dos ambientes.

A pesca de elasmobrânquios desembarcada nos portos de Santa Catarina, segue o mesmo padrão da pescaria de peixes cartilagosos registrado por Vooren (1995) na costa do Rio Grande do Sul. Este padrão é caracterizado por oscilações na produção, representada por períodos de alta captura, seguidos de períodos de declínio quantitativo. Entretanto, há uma tendência de aumento nas capturas a partir da década de 1970, estabilizando-se em um patamar de cerca de 3700 toneladas a partir de 2001. O incremento verificado neste período seria reflexo de um conjunto de fatores como o aumento do esforço pesqueiro, do direcionamento de algumas pescarias às espécies de Elasmobrânquios devido ao crescente interesse comercial e pela prática do “finning” (retirada das nadadeiras de tubarões para comercialização), além do seu aproveitamento como fauna acompanhante (Perez & Pezzuto, 1998; Figueiredo et al., 2002; Perez et al., 2003). No entanto, a produção para o ano de 2006 mostra uma queda nas capturas de elasmobrânquios (GEP/CTTMar, 2007), o que poderia ser o indicativo de uma tendência para o início da fase de declínio, condizendo

com o padrão de oscilações observado nas capturas de organismos deste grupo.

A pesca industrial de arrasto demersal teve início na década de 1940 nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Nos anos de 1960, com a introdução da rede dupla e a estruturação desta pescaria em Santa Catarina, a frota pesqueira do Sudeste e Sul do Brasil direcionou-se para o camarão-rosa, atuando desde Vitória (ES) até Laguna (SC). Após períodos de capturas elevadas nos anos de 1970, a produção do camarão-rosa declinou em razão do esforço pesqueiro excessivo e da pesca artesanal em criadouros (Valentini et al., 1991; Perez et al., 2003), motivando o interesse por espécies presentes na captura acidental.

Em razão de sua estratégia de vida K, os elasmobrânquios não suportam uma elevada pressão pesqueira, sendo mais suscetíveis à sobreexploração em comparação aos teleósteos devido a sua baixa taxa de reposição populacional. Assim, considera-se que os estudos devem se concentrar na habilidade destes peixes em sustentar sua população sobre um determinado esforço pesqueiro, mesmo que indireto, afim de mudar o paradigma de que estudos e tomadas de decisões para o manejo das pescarias visam apenas a sustentabilidade das espécies-alvo (Walker & Hislop, 1998).

O arrasto de fundo (duplo, simples e parelha) e o emalhe de fundo são as modalidades pesqueiras de maior importância quanto às capturas em peso de peixes demersais nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1).



Figura 1. Barco de arrasto camaroneiro, equipado para realização do arrasto de fundo. Esta modalidade pesqueira, realizada por embarcações de grande e médio porte, se apresenta como uma atividade de importância quanto às capturas em peso de peixes demersais nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.

Sendo assim, muitos recursos explorados por estas artes encontram-se sobrexplotados, como no caso das espécies de elasmobrânquios *Squatina guggenheim*, *S. occulta* e *Rhinobatos horkelii* (Haimovici, 1997;

Haimovici et al., 1998; Vooren 1998; Perez et al., 2001; Vooren & Klippel, 2005). Estas são, juntamente com o *S. argentina*, *Mustellus fasciatus*, *M. Schimitti*, *Atlantiraja cyclofora*, *A. castelnaui*, *Zapteryx brevirostris* e *Rhinoptera brasiliensis*, alguns dos elasmobrânquios demersais da costa Sudeste e Sul do Brasil que integram a lista de espécies ameaçadas de extinção (Tabela 1) da World Conservation Union (IUCN) 2006 (Chiaramonte, 2000a, b; Lessa e Vooren, 2000; Hozbor, et al., 2004, b; Vooren e Lamónaca, 2004; Vooren e Chiaramonte, 2005; Massa et al., 2005, 2006; Vooren et al., 2006)

Como visto, as espécies componentes da captura acidental da pesca de arrasto duplo exercida com intensidade na região norte do litoral catarinense constituem-se principalmente de espécies de peixes teleósteos e de moluscos, sendo que as capturas de Elasmobrânquios são representativas. Segundo Kotas (1998), cerca de 14 gêneros e 21 espécies de peixes cartilagosos fazem parte da captura acidental do camarão-rosa, constituindo 5,8% da captura total. Dentre elas, 17 espécies são aproveitadas comercialmente, principalmente os cações-anjo e raias, com destaque para a espécie da família Rajidae de grande porte, que se constituem o grupo mais importante, seguido dos cações diversos e raias-viola. Cinco espécies são aproveitadas, sendo os espécimes utilizados comercialmente ou rejeitados, dependendo do tamanho, da aceitação no mercado e de problemas de conservação a bordo. O rejeito de

Elasmobrânquios se dá, de modo acentuado, em relação a nove espécies, principalmente as de pequeno porte da família Rajidae.

Um grande desafio ao estudo sobre o comportamento das populações de elasmobrânquios, frente às atividades da pesca comercial, é a falta de precisão da estatística pesqueira em relação às espécies capturadas pelas frotas. Isto ocorre principalmente pela dificuldade de identificação das espécies, uma vez que muitas delas apresentam características morfológicas externas bastante semelhantes. Há uma tendência mundial de identificação das espécies nesta área, onde dados pesqueiros de elasmobrânquios são elaborados para grupos de indivíduos (Dulvy et al., 2000), o que pode mascarar os efeitos da pesca sobre uma determinada espécie.

1.2.2 Pesca de raias-viola

Segundo Compagno (1999), a família Rhinobatidae é representada pelos gêneros *Rhinobatos*, *Zapteryx*, *Trygonorhina* e *Aptychotrema*, sendo no Brasil registrada a ocorrência das espécies *Rhinobatos horkelli* (Müller & Henle, 1841) (Figura 2b), distribuída desde a Bahia (no Brasil) até o Uruguai; *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) (Figura 2c), com ocorrência nas Antilhas, Panamá, Venezuela, Jamaica, Brasil, Uruguai e Argentina; *Rhinobatos lentiginosus* (Garman, 1880), registrada nos Estados Unidos, México, Panamá, Jamaica e Norte e Nordeste do Brasil e *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841) (Figura 2a), com ocorrências

registradas desde o Espírito Santo, no Brasil, até a Argentina (Bigelow & Schroder, 1953; Figueiredo, 1977; Menni & Stehmann, 2000).

Em um levantamento e avaliação das populações capturadas em cinco cruzeiros de pesquisa realizado por Martins (2007) no litoral norte do Estado de Santa Catarina, foram obtidas e analisadas amostras contendo cerca de 1014 indivíduos, constituintes de 13 famílias e 19 espécies. A Família Rajidae foi a mais representativa em número de espécies, tendo sido capturadas cinco espécies distintas. A espécie *Zapteryx brevirostris* foi a mais representativa nas capturas, tanto em biomassa quanto em número de indivíduos.

A espécie *Z. brevirostris* tem sua distribuição limitada ao Atlântico Sul, sendo a única espécie do gênero com ocorrência nesta área. Os maiores exemplares desta espécie têm aproximadamente 66,0 cm e podem pesar cerca de 1,9 kg. É encontrada frequentemente em águas costeiras, mas já foi capturada em profundidades de até 60 m (Figueiredo, 1977).

Ainda de acordo com este autor, as espécies *Z. brevirostris* e *Narcine brasiliensis* apresentaram os menores índices de sustentabilidade e foram identificadas como as menos capazes de sustentar a exploração pesqueira realizada pela frota de arrasto duplo no litoral norte do Estado de Santa Catarina, seguidas pela espécie *Rhinobatos percellens*, dentre outras espécies de Elasmobrânquios que se enquadraram no segundo nível mais sensível de sustentabilidade.

A identificação da raia-viola *Rhinobatos horkelii* se baseia em seu grande tamanho, que chega a atingir 138 cm de comprimento total (Lessa, 1982), comparado ao das demais espécies, além de apresentar coloração característica uniformemente marrom na superfície dorsal do corpo, sem pintas claras nem bandas transversais escuras. Segundo Bigelow e Schroedes (1953), esta era a espécie de raia-viola mais comum, sendo endêmica na zona costeira sudoeste do oceano Atlântico, entre o Rio de Janeiro e Mar Del Plata (Argentina).

A plataforma continental do Rio Grande do Sul está situada no centro de sua distribuição geográfica, onde ocorre sua maior abundância natural. A partir de 1970, a espécie passou a ser alvo de pescarias artesanais costeiras nesse estado, que empregam redes de emalhe e arrasto-de-praia, além de ser capturada como “by-catch” (espécies de peixes capturadas acidentalmente em pescarias), quando o real objetivo da atividade seria a pesca industrial mista e de camarão, ambas com arrastos. No verão, as fêmeas prenhas se concentram nas águas costeiras do Estado do Rio Grande do Sul para a reprodução, sendo que nesta região já foi registrada a presença e permanência de neonatos, constituindo-se num berçário da espécie. As pescarias realizadas nesse berçário capturam tantos as fêmeas prenhas quanto os neonatos, prejudicando o recrutamento da espécie (Lessa 1986).

A captura por Unidade de Esforço (CPUE) anual de *Rhinobatos horkelii* nos arrastos com portas e de parelha pela frota de Rio Grande, evidenciou que sua abundância na plataforma sul declinou cerca de 85% no período entre 1985 e 1997 (Miranda & Vooren, 2003). Dados de CPUE levantados a partir dos arrastos da frota de Rio Grande no período de 1998 a 2002 confirmam o declínio de captura naquela região (Projeto SALVAR, Convênio FURG/CNPq-PROBIO, dados não publicados), ocorrência esta atribuída à sobrepesca do recrutamento. Isto faz com que a espécie conste na lista vermelha da IUCN como “criticamente ameaçada” (Lessa e Vooren, 2000). Por conta da lei nº 10.683 de 28 de Maio de 2003, a espécie *Rhinobatos horkelii*, que se encontra na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (Tabela 1) elaborada pelo IBAMA, teve sua pesca proibida em diferentes estados do Brasil como São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro.

Tabela 1. Relação de espécies de peixes ameaçadas de extinção, copiada a partir do site do IBAMA.

Família	Espécie	Nome comum
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus longimanus</i> (Poey, 1861)	Tubarão-estrangeiro; tubarão-galha-branca-oceânico
	<i>Carcharhinus porosus</i> (Ranzani, 1839)	Tubarão-junteiro, tubarãoazeiteiro
	<i>Carcharhinus signatus</i> (Poey, 1868)	Tubarão - toninha
	<i>Isogomphodon oxyrinchus</i> (Müller & Henle, 1839)	Quati
	<i>Negaprion brevirostris</i> (Poey, 1868)	–
Triakidae (2)	<i>Galeorhinus galeus</i> (Linnaeus, 1758)	Cação-bico-doce
	<i>Mustelus schmitti</i> (Springer, 1939)	Cação-cola-fina, caçonete
Cetorhinidae (1)	<i>Cetorhinus maximus</i> (Gunnerus, 1765)	Tubarão - peregrino
Ginglymostomatidae (1)	<i>Ginglymostoma cirratum</i> (Bonnaterre, 1788)	Cação-lixo, tubarão-lixo, lambaru
Rhincodontidae (1)	<i>Rhincodon typus</i> Smith, 1828	Tubarão - baleia
Pristidae	<i>Pristis perotteti</i> Müller & Henle, 1841	Peixe-serra
	<i>Pristis pectinata</i> Latham, 1794	Peixe-serra
<u>Rhinobatidae (1)</u>	<u><i>Rhinobatus horkelii</i> (Müller & Henle, 1841)</u>	<u>Raia-viola</u>
Squatinae (2)	<i>Squatina guggenheim</i> Marini, 1936	Cação-anjo-espinhoso
	<i>Squatina occulta</i> (Vooren & Silva, 1991)	Cação-anjo-liso
Batrachoididae (1)	<i>Potamobatrachus trispinosus</i> Collette, 1995	Mangangá
Anostomidae (2)	<i>Leporinus thayeri</i> Borodin, 1929	Piau
	<i>Sartor tucuruense</i> Santos & Jégu, 1987	–

Endereço do Link: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/listas-de-especies-ameacadas/2/>

Considerando a grande similaridade morfológica existente entre as espécies de raias dos gêneros *Rhinobatos* e *Zapteryx* que ocorrem no Brasil (Figura 2), sua extensiva exploração pela pesca, além da prática bastante usual da remoção de partes dos animais tais como as nadadeiras e cabeça (Figura 3) antes mesmo dos desembarques, e ainda pelo fato de que a espécie *Rhinobatos horkelii* está relacionada entre aquelas criticamente ameaçada, torna-se urgente e necessário o desenvolvimento de ferramentas práticas de identificação das espécies e sua aplicação nos programas de conservação e manejo.

a



b



c



Figura 2. Similaridade morfológica entre as três espécies de raias-viola **(a)** *Zapteryx brevirostris*, **(b)** *Rhinobatos horkelii* e **(c)** *Rhinobatos percellens* encontradas na costa brasileira.



Figura 3. Retirada de partes interessantes para o comércio de cartilagens de raias antes ou durante o desembarque pesqueiro.

1.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de raias-viola

Levando-se em conta que todos os seres vivos relacionados filogeneticamente guardam muitas características em comum e guardam também muitas particularidades, sendo estas diferenças e similaridades determinadas essencialmente pelo seu material genético, alguns trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos visando a elaboração de ferramentas moleculares que permitam a distinção entre estas espécies, bem como sua correta identificação.

Diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados nos últimos 30 anos, principalmente com propósitos taxonômicos entre os numerosos grupos de seres vivos (Ward et al., 2005). No caso de tubarões, os marcadores moleculares disponíveis para a identificação de espécies desenvolvidos por Pank et al. (2001), Shivji et al. (2002), Chapman et al. (2003), Abercrombie (2004), Nielsen (2004) e Abercrombie et al. (2005), entre outros, utilizaram as diferenças entre as bases nucleotídicas do gene nuclear ribossomal ITS2. Já Blanco et al., (2008) utilizaram sequências do gene Citocromo b, enquanto no trabalho de Pinhal et al. (2008), os marcadores descreveram os padrões de amplificação do gene nuclear ribossomal 5S das espécies.

Tendo em vista a ampla gama de técnicas diferentes que podem ser empregadas na identificação de espécies, explorando regiões genômicas diversas, Hebert et al. (2003) sugeriram que uma única sequência genética

poderia ser suficiente para diferenciar todas, ou pelo menos a maioria das espécies animais e propuseram a utilização da subunidade I (COI) do gene para Citocromo oxidase do DNA mitocondrial, para um sistema mundial de bioidentificação animal onde a sequência de cada espécie seria representada por uma indicação, de modo semelhante a um sistema de ‘barcode’.

Buscando a unificação de um sistema mundial de informações dedicado à identificação taxonômica genética das espécies, o presente estudo também descreve um recurso metodológico para a caracterização de três espécies de raias-viola pertencentes aos gêneros *Rhinobatos* e *Zapteryx*, usualmente exploradas pela pesca comercial ou vítimas do ‘by-catch’, desenvolvido a partir das características exclusivas de cada uma delas e expressas nas seqüências do gene COI.

2. OBJETIVOS

Os estudos que vêm sendo realizados utilizando marcadores genéticos moleculares do DNA mitocondrial, abordam questões acerca da dinâmica das populações de raias marinhas do gênero *Rhinobatos* e *Zapterix* capturadas pelas frotas pesqueiras ao longo da costa Sul e Sudeste brasileira. Considera-se que as informações obtidas a partir da utilização destes marcadores específicos permitirão uma melhor identificação das

espécies e populações existentes e também possibilitarão a identificação e caracterização de áreas prioritárias para a proposição de programas de manejo e conservação destes organismos.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram listados os objetivos específicos:

- identificar as espécies de raias marinhas dos gêneros *Rhinobatos* e *Zapterix* ao longo da costa Sul e Sudeste do Brasil com o uso de marcadores moleculares;
- desenvolver protocolos de aplicação da técnica de identificação genética das espécies *Rhinobatos horkelii*, *Rhinobatos percellens* e *Zapteryx brevirostris* utilizando protocolos de PCR-multiplex e PCR-RFLP.
- relacionar informações que possam subsidiar programas adequados de manejo e exploração sustentável dos estoques pesqueiros das espécies do gênero *Rhinobatos* na costa brasileira.

3 Material e métodos

3.1 Coleta de amostras

A coleta de amostras foi realizada em diferentes localidades ao longo do litoral brasileiro, sendo parte dos fragmentos de tecido obtidos pelo autor diretamente junto aos desembarques e parte (Figura 4) e parte também por doação feitas por laboratórios e pesquisadores colaboradores. A identificação dos espécimes de raia-viola desembarcados inteiros é

realizada em campo, sendo a caracterização das demais amostras realizada em laboratório, utilizando a metodologia de PCR-multiplex e/ou PCR-RFLP. Todos os exemplares inteiros foram registrados e armazenados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, Botucatu, credenciado no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositário de Amostras do Patrimônio Genético, bem como as amostras de tecido. A coleta e acondicionamento de amostras de tecidos foi feita em frascos contendo álcool a 95%, junto aos pescadores e nos locais de desembarque de pescado.

Figura 4. Identificação das espécies e acondicionamento de material biológico coletados na região de Florianópolis - SC.



Figura 5: Exemplo de como é retirada da cabeça dos animais antes do desembarque pesqueiro.



3.2 Purificação dos produtos de PCR

Após checagem em gel de agarose, os produtos de amplificação dos segmentos de interesse foram purificados para a utilização na reação de seqüenciamento. Para purificação do DNA amplificado, foi utilizado o kit “GFX PCR DNA e Gel Band Purification” (Amersham Biosciences), de acordo com os procedimentos relacionados a seguir:

Adicionar 500 µl de Capture Buffer à coluna GFX juntamente com o produto da amplificação.

Centrifugar a 14.000 rpm, 4°C por 30 segundos.

Descartar o material do tubo coletor e voltar o mesmo para a coluna GFX.

Adicionar 500 μ l de Wash Buffer à coluna GFX e centrifugar por 30 segundos (14.000 rpm, 4 °C).

Descartar o tubo coletor e após 5 minutos transferir o produto para um tubo de 1,5 ml.

Aplicar 50 μ l de água ultrapura estéril diretamente no topo da coluna e esperar 2 minutos.

Centrifugar por um minuto (14.000 rpm, 4°C).

Descartar a coluna e guardar o material com DNA purificado numa temperatura abaixo de 0°C.

Obs: o procedimento pode ser checado em gel de agarose 1% e então realizada a quantificação do DNA.

3.3 PCR de Sequenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas a partir do seguinte protocolo: para cada amostra 2 μ l de pré-mix (fornecido no kit - Dye-Terminator), 2 μ l de produto de PCR purificado e 2 μ l de cada primer (10 μ M), em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 2 min, desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 50°C por 30 segundos, extensão de cadeia a 60°C por 2 minutos, com 30 repetições.

3.4 Purificação dos produtos de PCR de sequenciamento

Após o final da reação de sequenciamento é feita a purificação dos produtos da PCR pela remoção dos dideoxynucleotídeos não incorporados no DNA, do modo descrito a seguir:

1) Adicionar às amostras 2µl de acetato de sódio 4.5mM e 80µl de etanol 95% e em seguida centrifugar a 14.000rpm durante 20 minutos a 20oC.

2) Remover o sobrenadante, adicionar 400µl de etanol 70% e centrifugar novamente a 14.000rpm durante 10 minutos.

3) Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37°C por 1 hora, protegido da luz.

4) Ressuspender o produto em solução de formamida e “blue dextran” (Formamide Loading Dye 5:2).

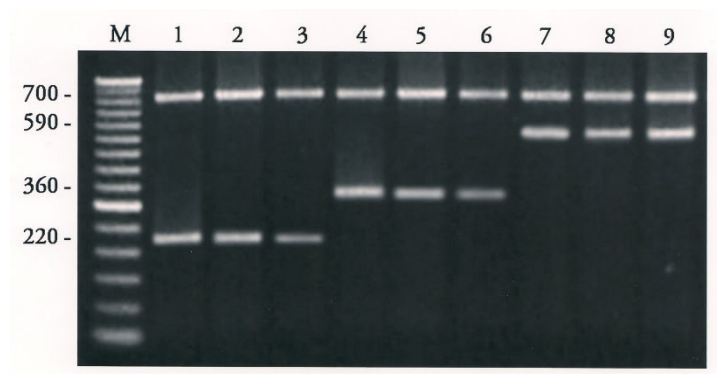
4 Resultados

4.1 Marcadores moleculares de identificação de espécies - PCR-Multiplex

Os *primers* forward espécie-específicos foram posicionados internamente aos *primers* forward e reverse de reconhecimento universal, de forma a gerarem dois fragmentos de tamanhos diferentes em cada reação de PCR. Na amostra da espécie a espécie *R. horkelli* foram caracterizados dois fragmentos, sendo um com cerca de 590bp para o controle interno da reação e um segundo fragmento de aproximadamente 580bp. Nas amostras

de DNA pertencentes a *R. percellens*, o fragmento característico apresentou 370bp e nas de *Z. brevirostris*, 220bp. As bandas observadas após a eletroforese em gel de agarose, com tamanhos distintos, são característicos em cada uma das espécies (Figura 6).

Figura 6. PCR-multiplex contendo primers espécie-específicos e universais para o gene Citocromo Oxidase subunidade I. Bandas de amplificação controle (cerca de 700 bp), fragmentos específicos a partir de fragmentos de diagnóstico de *Zapateryx brevirostris* (pistas 1 a 3 - aproximadamente 220 bp), *R. percellens* (pistas 4 a 6 - aproximadamente 360 bp) e fragmentos específicos de *R.horkelii* (pistas 7 a 9 - aproximadamente 590 bp), são mostrados. M – Marcador de peso molecular de 50 bp.



4.2 PCR-RFLP

Dentre os 512 nucleotídeos do gene COI analisáveis foram encontrados entre as espécies *R. horkelli* e *R. percellens* 33 sítios polimórficos (diversidade nucleotídica P_i : 0,06445) e entre estas duas espécies e a raia *Z. brevirostris* observou-se 127 sítios polimórficos com 133 mutações (diversidade nucleotídica P_i : 0,16927). A divergência nucleotídica entre as 3 espécies de raias-viola possibilitou a determinação de enzimas de restrição que produzissem cortes em posições distintas entre elas, gerando bandas de tamanhos característicos para *R. horkelli*, *R. percellens* e *Z. brevirostris* (Figuras 7,8 e 9). Assim, foram encontradas 12 enzimas de cortes exclusivos em *R. percellens* (BsmFI, HincII, BsaAI, HpyCH4IV, EciI, PflMI, ApoI, DpnI, DpnII, MboI, BfuCI and Sal3AI), 5 enzimas de corte exclusivo em *R. horkelli* (Hpy188II, BspHI, BtgI, BmrI and MsII) e 21 enzimas para corte exclusivo em *Z. brevirostris* (HphI, Tsp45I, BsaI, BsmAI, BstNI, PhoI, HaeIII, Bsp1286I, BaeGI, HinfI, TfiI, AccI, SfcI, SspI, FauI, MspI, HpaII, HincII, BccI, HpaI, MfeI). Foram ainda encontradas 4 enzimas (HpyAV, MboII, Cac8I and MseI) que produzem cortes nas espécies *R. horkelli* e *Z. brevirostris* e mantendo a banda de amplificação da espécie *R. percellens* sem corte, gerando fragmentos distinguíveis entre elas.

Linear Sequence: *R horkelli*

Display: - NEB single cutter restriction enzymes
 - Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs
 GC=44%, AT=56%

Cleavage code	Enzyme name code
blunt end cut	Available from NEB
5' extension	Has other supplier
3' extension	Not commercially available
cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG methylation
	#: cleavage affected by other methylation
	(enz. name): ambiguous site

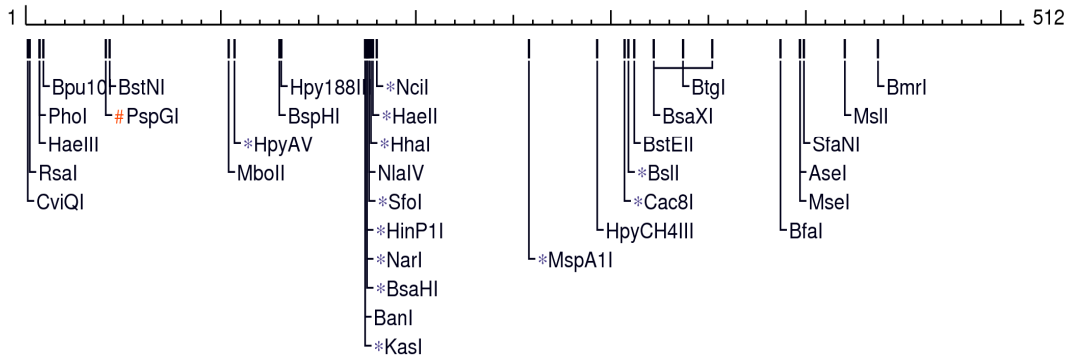


Figura 7. Mapa de restrição completo do gene COI em *R. horkelli*.

Linear Sequence: *R percellens*

Display: - NEB single cutter restriction enzymes
 - Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs
 GC=42%, AT=58%

Cleavage code	Enzyme name code
blunt end cut	Available from NEB
5' extension	Has other supplier
3' extension	Not commercially available
cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG methylation
	#: cleavage affected by other methylation
	(enz. name): ambiguous site

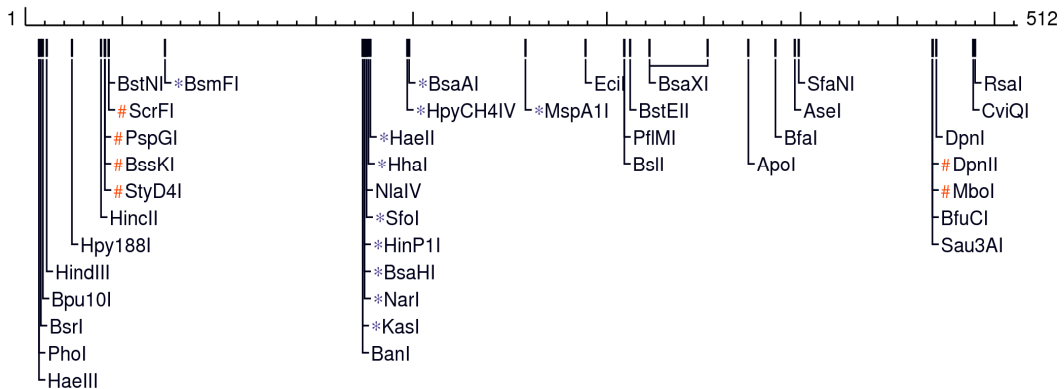


Figura 8. Mapa de restrição completo do gene COI em *R. percellens*.

Linear Sequence: Z brevirostris

Display: - NEB single cutter restriction enzymes
 - Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs
 GC=46%, AT=54%

Cleavage code		Enzyme name code	
⌞	blunt end cut	Available from NEB	
⌞	5' extension	Has other supplier	
⌞	3' extension	Not commercially available	
⌞	cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG methylation	
		#: cleavage affected by other methylation	
		(enz. name): ambiguous site	

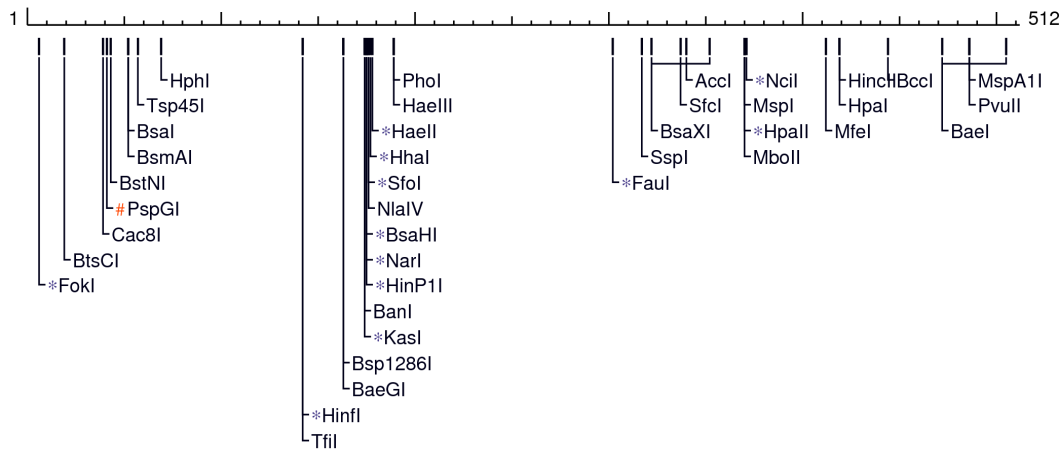


Figura 9. Mapa de restrição do gene COI em *Zapteryx*

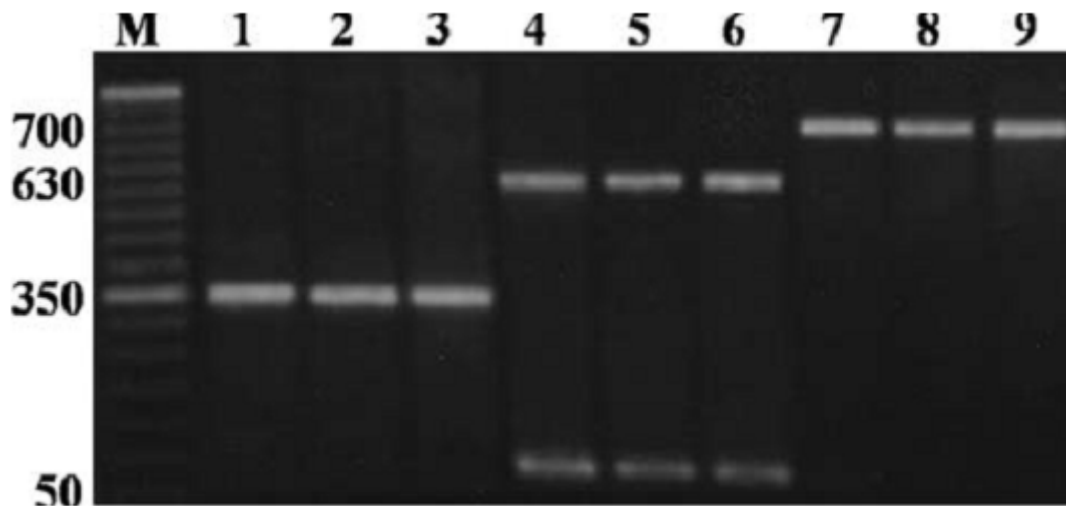


Figura 10. Reação de restrição do gene COI em amostras das espécies *R. horkelii*, *R. percellens* e *Z. brevirostris*, utilizando as enzimas Btg I e BsnF I. (M=Marcador molecular de 50pb; 1 a 3=*Zapteryx brevirostris*; 4 a 6=*R. percellens*; 7 a 9=*R. horkelii*).

4.3 Validação dos primers e estatística pesqueira

Em cada uma das 267 amostras de raias-viola analisadas foi observado a presença de uma banda de 700 bp e uma segunda banda característica para cada espécie conforme descrito por De Franco et al. (2009). A frequência de amplificação utilizando os primers universais (F1 e R1) para o gene COI, assim como os fragmentos amplificados com os primers espécie-específicos (RhoF, RpeF e ZbrF) foi de 100%. Amplificações de bandas de tamanhos desconhecidos, assim como amplificações produzidas com mais de um dos primer espécie-específicos em cada amostra não foram observadas (Figura 6).

Nas análises de identificação genética das espécies realizadas entre todas as amostras de raias-viola coletadas, foi constatada a frequência relativa de *R. horkelli* em 55,8% das amostras (n=142), sendo ainda 25,1% (n=64) da espécie *R. percellens* e 19,1% (n=49) da espécie *Z. brevirostris*. Das amostras coletadas em regiões do Estado da Bahia, todas foram identificadas como *R. percellens* (n=12). Entre as 16 amostras coletadas no Estado do Rio de Janeiro, 12 foram identificadas geneticamente como *R. horkelli* e 4 como *R. percellens*, sem nenhuma caracterização de *Z. brevirostris*. Das 60 amostras obtidas na região de São Paulo 21 foram identificadas como *R. horkelli*, 7 como *R. percellens* e 32 como *Z. brevirostris*. Entre as 45 amostras provindas da região costeira do Estado do Paraná apenas 2 foram identificadas como *R. horkelli* e o restante (43)

como *R. percellens*. As 85 amostras de raias-viola coletadas na região de Santa Catarina foram identificadas geneticamente como *R. horkelli* e entre as 49 amostras do Estado do Rio Grande do Sul, 30 foram identificadas como *R. horkelli* e as outras 19 como *Z. brevirostris* (Tabela 2, Figura 12).

Figura 11. Localização geográfica da área onde é proibida a pesca de *R. horkelli*, área onde foram coletadas as amostras identificadas apenas como raias-viola e região onde foi comprovada a pesca e comercialização de *R. horkelli*.

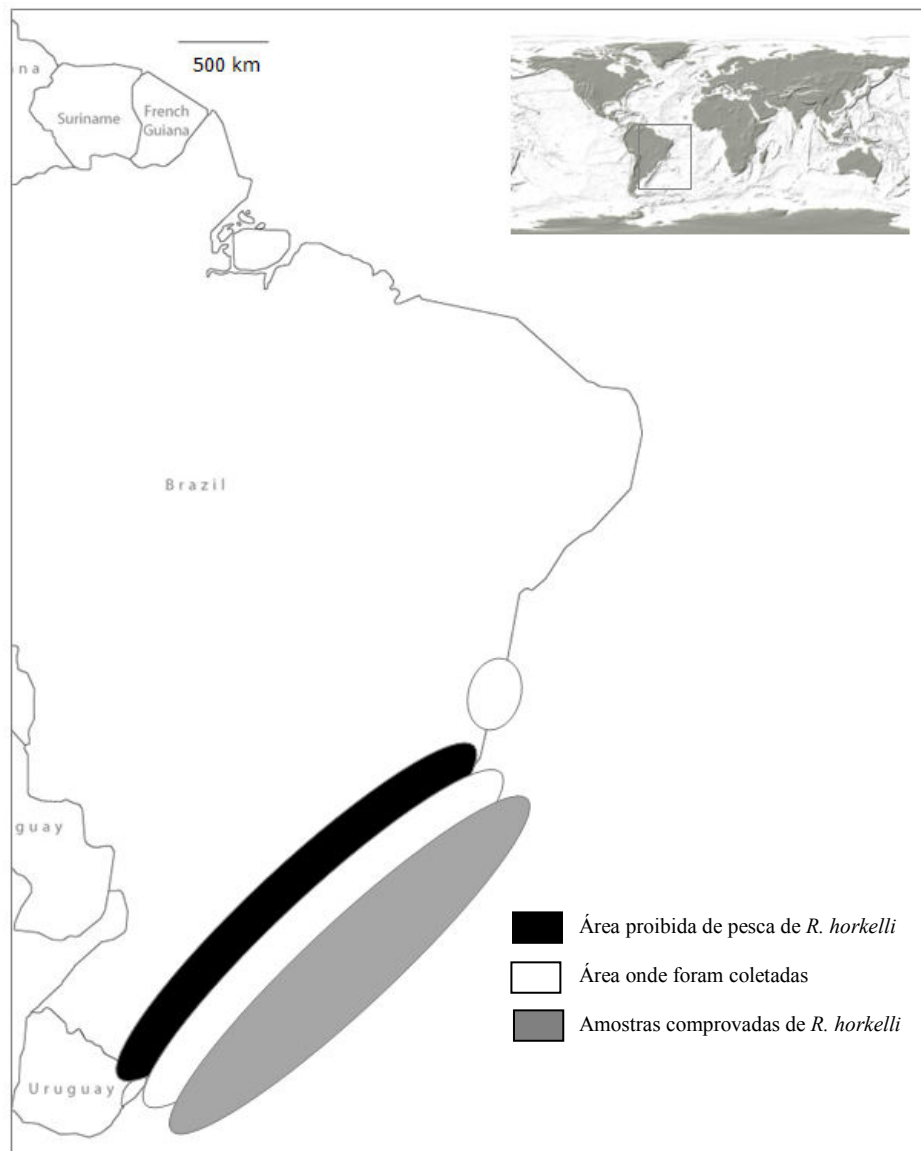
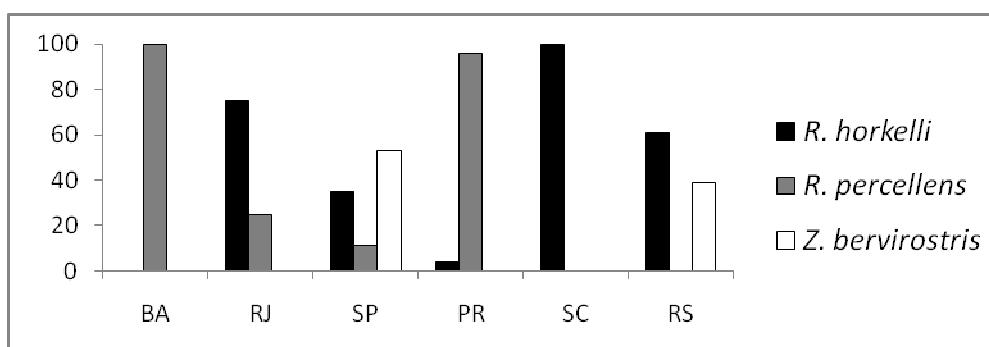


Tabela 2. Frequência relativa das espécies de raias-viola amostradas entre os estados pertencentes à Costa Central e Costa Sul do Brasil. *n*, número de amostras coletadas por região.

Região	Estado	<i>n</i>	<i>R.</i> <i>horkelli</i>	<i>R.</i> <i>percellens</i>	<i>Z.</i> <i>brevirostris</i>
Costa Central	Bahia	12	0.0	1.0	0.0
	Rio de Janeiro	16	0.75	0.25	0.0
Costa Sul	São Paulo	60	0.35	0.11	0.53
	Paraná	45	0.04	0.96	0.0
	Santa Catarina	85	1.0	0.0	0.0
	Rio Grande do Sul	49	0.61	0.0	0.39
Total		267	0.558	0.251	0.191

Figura 12. Frequência relativa das espécies de raias-viola amostradas e identificadas pela PCR-multiplex. Valores em porcentagem.



5 CONCLUSÕES

A crescente captura de elasmobrânquios determinada pela atividade pesqueira intensiva tem determinado a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção. Em tal contexto, com a inexistência de mecanismos apropriados para a fiscalização da pesca e de planos para o manejo sustentável das espécies mais exploradas, torna-se urgente e necessária a formulação de instrumentos que possam colaborar para a reversão deste processo. Neste sentido, o projeto realizado visou o estabelecimento de protocolos viáveis e de baixo custo para a caracterização confiável de algumas espécies de raias marinhas, com a utilização de marcadores genéticos moleculares. Assim, pode ser concluído que :

- o método de PCR-Multiplex utilizado mostrou-se extremamente rápido e eficaz no que diz respeito à identificação das espécies de raia-viola, *Rhinobatos horkelii*, *Rhinobatos percellens* e *Zapterix brevirostris*;
- quando estudadas pelo método de PCR-RFLP, dentre os 512 nucleotídeos do gene COI, estas espécies apresentaram 33 sítios polimórficos em *R. horkelii* e *R. percellens* (diversidade nucleotídica P_i : 0,06445) e entre estas duas espécies e a raia *Z. brevirostris* foram identificados 127 sítios polimórficos, com 133 mutações (diversidade nucleotídica P_i : 0,16927);

- a divergência nucleotídica entre as 3 espécies de raias-viola possibilitou a identificação de enzimas de restrição que produzem cortes exclusivos em posições distintas entre elas, gerando bandas de tamanhos característicos para *R. horkelli*, *R. percellens* e *Z. brevirostris*;
- os marcadores moleculares caracterizados para estas espécies, tanto com o uso de PCR-Multiplex quanto de PCR-RFLP, constituem importantes ferramentas para a identificação destes taxons. De modo efetivo, a aplicação do protocolo da técnica do marcador PCR-Multiplex mostra-se viável e de menor custo que o do PCR-RFLP;
- pôde-se concluir ainda que, com base na amostragem analisada neste estudo, a pesca da espécie *Rhinobatos horkelii*, apesar de proibida por lei, foi a mais representativa dentre as espécies de raias-viola capturadas.

6 Discussão

Para o manejo e gestão eficaz da pesca mundial de elasmobrânquios visando a conservação multiespecífica é necessário o registro de informações biológicas e de pesca das diversas espécies em uma base específica. Essa exigência decorre das diferentes estratégias e características de história de vida individual, resultando na necessidade de medidas individuais para cada espécie com exploração intensiva (Heist and Gold, 1999; Castro et al., 1999). O problema de identificação morfológica

de espécies é agravado pela prática comum da pesca com a retirada da cabeça, cauda e nadadeiras, sendo esta realizada ainda no mar para reduzir o espaço de armazenamento e para uma melhor preservação da carne. Esta prática elimina os principais caracteres morfológicos de identificação.

Nos últimos anos diversas metodologias de identificação taxonômica utilizando marcadores genéticos têm sido desenvolvidas e a partir destas técnicas, a presença de um organismo qualquer pode ser determinada utilizando apenas um pequeno fragmento que contenha o DNA. Devido a tais características estas metodologias têm sido amplamente aplicadas para identificar a comercialização de animais e plantas ameaçadas e sob proteção legal, principalmente quando estão disponíveis apenas vestígios de amostras ou quando os dados morfológicos não são mais acessíveis. Tais métodos, atualmente constituem uma forma prática e barata de fiscalização e quantificação do uso de organismos vivos, podendo ser extremamente útil para a exploração sustentável e conservação dos recursos naturais.

Visando gerar um método de fiscalização da pesca de raias-viola de ocorrência na região sul do litoral da América do Sul, De Franco et al. (2009) desenvolveram um método de identificação simultânea para as espécies *R. horkelli*, *R. percellens* e *Z. brevirostris*. Neste método foram desenhados primers espécie-específicos que aplicados em multiplex-PCR geram bandas de tamanhos distintos para cada uma das espécies após

corrida eletroforética. Outra metodologia, descrita por Mariguela et al. (2009), utiliza as características genéticas particulares de cada espécie de um modo similar. No entanto, ao invés da aplicação de primers, foram usados enzimas de restrição que também promovem a geração de bandas de tamanhos característicos para cada uma das espécies. Em trabalhos prévios estas duas metodologias foram exaustivamente testadas, tendo sido constatado uma eficiência de 100% em ambas as técnicas. No entanto, foi considerado que a metodologia de multiplex-PCR descrita por De Franco et al. (2009) apresentou um menor gasto de tempo nas atividades laboratoriais, sendo esta adotada no presente trabalho.

Entre as 267 amostras de raias-viola coletadas ao longo da Costa Central e Costa Sul do Brasil, a despeito da legislação que proíbe a captura de *R. horkelli*, foi constatado a continua pesca e comercialização desta espécie em praticamente toda a área estudada. A única exceção ocorreu na costa da Bahia, sendo que todas as amostras foram identificadas como *R. percellens*. Em regiões do Rio de Janeiro (Costa Central) e Rio Grande do Sul (Costa Sul) foi observada a frequência de *R. horkelli* acima de 50% e em Santa Catarina (Costa Sul) todos os 85 indivíduos pertenciam a espécie de pesca proibida. No estado de São Paulo (Costa Sul) a maior frequência foi da espécie *Z. brevirostris*, sendo a frequência de *R. horkelli* apenas um pouco menor (35%). Apenas no Paraná (Costa Sul) a frequência de captura para a espécie *R. horkelli* pode ser considerada baixa.

Segundo Miranda & Vooren (2003) as populações de *R. horkelli* da região do Estado do Rio Grande do Sul tiveram um decréscimo de cerca 85%, medidos em Captura Por Unidade de Esforço entre os anos de 1985 e 1997, mas nenhuma menção é feita em relação à *R. percellens* e *Z. brevirostros*. De acordo com Haimovici (1998) a captura anual média de *R. horkelli* na costa Sul do Brasil foi de 1010 toneladas entre os anos de 1975 e 1979 chegando a apenas 460 toneladas entre os anos de 1990 e 1994. Neste mesmo período a pesca de raias, sem identificação quanto à espécie, teve um incremento nas médias de capturas passando de 116 toneladas para 746 toneladas anuais. Nos relatórios de produtividade pesqueira do IBAMA, órgão que regulamenta e fiscaliza as atividades de exploração dos recursos naturais do Brasil, a captura anual média de raias entre os anos de 2001 e 2005 foi de aproximadamente 7.000 toneladas, sendo reportado a captura de apenas 300 toneladas de raias-viola sem identificação das espécies (IBAMA, 2007).

Considerando os dados disponíveis a respeito da pesca de raias-viola na Costa Sul do Brasil, fica evidente que os registros atuais são insuficientes para uma determinação razoável do status populacional das espécies e para o delineamento adequado de medidas de exploração sustentável. Neste estudo, as atividades de coleta não visaram observar variações sazonais de ocorrência e captura das espécies de raias-viola, no ambiente amostrado. Desta forma, as frequências encontradas não devem

ser consideradas como medidas de abundância relativa. No entanto, os resultados encontrados podem ser um indício das frequências atuais, podendo tornar questionável a classificação destas três espécies de raias nas listas vermelhas de ameaça de extinção. Somente estudos com dados mais robustos poderão determinar a possibilidade da exclusão de *R. horkelli* das listas de espécies ameaçadas ou, mais provavelmente, a inclusão das espécies *R. percellens* e *Z. brevirostris* em tais listas.

Durante as atividades de coleta para este estudo, foi observado um certo receio por parte dos pescadores, principalmente nas regiões dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em relação à presença de pesquisadores solicitando a permissão para a retirada de amostras de tecidos das raias-viola durante os desembarques. Nestas ocasiões diversos pescadores afirmaram não possuir exemplares de raias-viola em suas embarcações e negaram a prática de capturas, obviamente temendo os rigores da legislação vigente. No entanto, a franca exposição das raias no comércio local foi sempre constante. Tal fato demonstra que os pescadores reconhecem a proibição da pesca de *R. horkelli*. Contudo, a ineficiência nas fiscalizações torna-se um incentivo às capturas.

Os resultados deste estudo podem sugerir uma certa fragilidade dos modelos atuais de avaliação específica da pesca e de seu controle. Devido aos grandes volumes de elasmobrânquios capturados nos últimos anos em praticamente todo o mundo e com o conhecimento a respeito das

características biológicas de tubarões e raias, torna-se consenso a necessidade de uma avaliação precisa de cada uma das espécies exploradas, com aplicação efetiva de medidas de conservação para as espécies em risco. Ferramentas genéticas tem se mostrado de grande auxílio para tais avaliações e para a efetivação das medidas de controle, fiscalização e conservação de espécies.

7 REFERÊNCIAS

Abercrombie, D. (2004). Efficient PCR-based identification of shark products in global trade: applications for the management and conservation of commercially important mackerel sharks (Family Lamnidae), thresher sharks (Family Alopiidae) and hammerhead sharks (Family Sphyrnidae). M.S. thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.

Abercrombie, D. L., Clarke, S. C., Shivji, M. S. (2005). Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics*, 6: 775-788.

Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

Batista, V.S. (1987). Aspectos quantitativos da fecundidade e do desenvolvimento embrionário as raia *Zapteryx brevirostris* da enseada de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Biol.*, 53(3): 495-501.

Bigelow, H.B. & Schroeder, W.C. (1953). Sawfishes, guitarfishes, skates and rays, in *Fishes of the western North Atlantic*. Mem. Sears. Found. Mar. Res. 1(2):1-514.

Blanco, M., Pérez-Martín, R. I, Sotelo, C. G. (2008). Identification of shark species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J. Agric. Food Chem.* 56: 9868-74.

Brander, K. (1981). Disappearance of common skate *Raia batis* from Irish Sea. *Nature*, 290: 48-49.

Castro JI, Woodley CM, Brudek RL, (1999). A preliminary evaluation of the status of shark species. Fisheries technical paper 380.

Compagno, L. J. V. (1999). Checklist of living elasmobranchs. *In*: HAMLETT, W. C. (ed.) *Sharks, Skates, and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes.* The John Hopkins University Press, Baltimore: 470-498.

Compagno, R. (2005). Geração automática de políticas para detecção de intrusões baseada em evidências de ataque. Dissertação de Mestrado – Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo. Disponível em: <http://www.las.ic.unicamp.br/paulo/teses/Ronaldo.Compagno-temp.pdf>

Chapman, D., D. Abercrombie, C. Douady, E. Pikitch, M. Stanhope, and M. Shivji. (2003). A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 4: 415-425.

Chiaramonte, G.E. (2000^a). *Squatina acculta*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Chiaramonte, G.E. (2000^b). *Squatina guggenheim*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

De-Franco B.A, Mendonça F.F, Hashimoto D.T, Porto-Foresti F., Oliveira C. Foresti F. (2009). Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelli*, *R.percellens* and *Zapteryx brevirostris* using Multiplex-PCR. *Molecular ecology resources*. 10 (1): 197-199.

Dulvy, N., Metcalfe, J.D., Glanville, J., Pawson, M.G., Reynolds, J.D. (2000). Fisher stability, local extinction and shifts in community structure in Skates. *Conservation Biology*, 14: 283-293.

Dulvy, N., Reynolds, J.D. (2002). Predicting extinction vulnerability in skates. *Conservation Biology*, 16: 440-450.

Ebert, D.A. & Compagno, L.J.V. (2007). Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes*, 80: 111-124.

Excoffier, L.G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

FAO (2007). FishStat PC. CD-Rom (Fisheries Information - Data and Statistic Unit, FAO (Fisheries Department). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Ferris, S.D. and Berg, W.J. (1987). The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. In: Population Genetics and Fisheries Management (Ryman, N. and Utter, F., eds.). University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 277-301.

Figueiredo, J.L. (1977). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, raias e quimeras. Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo, 104 p.

Figueiredo, J.L.D.E., A.P. Santos, N. Yamaguti, R.A. Bernardes & L.D.B. Rossi-Wongtschowski. (2002). Peixes da Zona Econômica Exclusiva da Região Sudeste-Sul do Brasil. EDUSP. 242 pp.

Gadig, O. B. F. (2001). Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo.

Gaida I.H. (1997). Population structure of the Pacific angel shark, *Squatina californica* (Squatiniformes: Squatinidae), around the California Channel Islands. Copeia, 4, 738–744.

GEP/CTTMar. Estatística pesqueira. Disponível em:
www.univali.br/gep.

Gruber, S.H. (1990). Life style of sharks. In: Gruber, S.H. (ed.) Discovering sharks. American Litoral Society, Special Publication No 14.

Haimovici, C.M., Castello, J.P., Vooren, C.M. (1998). Pescarias. In: Seelinger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. Os ecossistemas costeiro e Marinho do extremo sul do Brasil. Capítulo 9. Rio Grande: Ed. Ecoscientia, 341p.

Haimovici, M. (1997). Present state and perspectives for the southern Brazil shelf demersal fisheries. Fisheries Management and Ecology, 4:101-113.

Haimovici CM, Castello JP, Vooren CM, (1998). Capítulo 9: Pescarias. In: Seelinger U, Odebrecht C, Castello JP. Os ecossistemas costeiro e Marinho do extremo sul do Brasil. Rio Grande: Ed. Ecoscientia, 341p.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., de Ward, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. B 270, 313-322.

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

Heist, E.J., Graves, J.E., Musick, J.A. (1995). Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. Copeia, 3, 555–562.

Heist, E.J., Musick, J.A., Graves, J.E. (1996). Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Fishery Bulletin*, 94, 664–668.

Hoenig, J.M. & Gruber, S.H. (1990). Life-history patterns in the elasmobranchs: implications for fisheries management. In: H.L. Pratt, Jr., *R. horkelli* du plateau continental du Brésil. These de Doctorat de 3 eme cycle. Univ. Bretagne Occidentale. 250p.

Hozbor, N., Vooren, C.M., Lamónaca, A.F. (2004). *Mustelus fasciatus*. In: IUCN 2006. Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

BAMA (2007) Estatística da Pesca – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília-DF, <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros>.

Keeney, D. B., Heupel, M. R., Hueter, R. E., Heist, E. J. (2005). 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*, 14: 1911–1923.

Keeney, D.B., Heist, E.J. (2006). 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*, 21: 365-294.

Kotas, J. (1998). A fauna acompanhante nas pescarias do camarão em Santa Catarina. Coleção Meio Ambiente. Série estudos da pesca, v.24, IBAMA, Brasília, 75p.

Kotas, J. E.; Rocha-Gama, M.; Conolly, P. C.; Hostim-Silva, M.; Mazzoleni, R. C.; Pereira, J., (1995). Gillnet Activities in Southern Brazil.. Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Sudeste, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Itajaí, Santa Catarina, Brazil. 48 p.

Lessa, R.P. & Vooren, C.M. (2000). *Rhinobatos horkelli*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Lessa, R.P. & Vooren, C.M. (2000). *Rhinobatos horkelli*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Lessa, R.P. (1986). Levantamento faunístico dos elasmobrânquios (Pisces, Chondrichthyes) do litoral ocidental do Estado do Maranhão. Bol. Lab. Hidrobiol., 27-41.

Mariguela, T.C., De Franco, B., Almeida, T.V.V., Mendonça, F.F., Gadig, O.B.F., Foresti, F., Oliveira, C. (2009). Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. Conservation Genetics Resources, 1: 393-396.

Martins, R.M.M. (2007). Avaliação da sustentabilidade dos elasmobrânquios demersais à pesca de arrasto de camarão no litoral norte do estado de Santa Catarina- Dissertação de Mestrado, Univali, Itajaí.

Massa, A., Hozbor, N., Chiaramonte, G.E., Balestra A.D., Vooren, C.M. (2006). *Mustelus schmitti*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2005. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Massa, A., Hozbor, N., Vooren, C.M. (2006). *Atlantoraja cyclophora*. In: IUCN 2006. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Mazzoleni, R.C., Schwingel, P.R. (1999). Elasmobranch species landed in Itajaí harbor, southern Brazil. Notas Técnicas da FACIMAR, Itajaí, 3: 1-34.

Mendonça, F.F., Oliveira, C., Gadig, O.B.F., Foresti, F. (2009). Populations analysis of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mtDNA sequences. Neotropical Ichthyology, 7: 213-216.

Meneses, T. S.; Santos, F. N. & Chaves, L. C. T. (2003). Ocorrência da raia-viola, *Rhinobatos percellens* Walbaum, 1792 (Chondrichthyes; Rhinobatidae) no litoral de Sergipe. Anais da Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju.

Menni, R.C. & Stehmann, M.F.W. (2000). Distribution environment and biology of batoid fishes off Argentina, Uruguay and Brazil. A review. Rev.

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

NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes
Tamas Vincze, Janos Posfai and Richard J. Roberts. New England Biolabs, Inc., 32 Tozer Road, Beverly, MA 01915, USA

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance of a small number of individuals. Genetics, 89:583-590.

Nielsen J. T. (2004). Molecular genetic approaches to species identification and delineation in elasmobranchs. M.S. thesis. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Dania Beach, Florida.

Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. Anu. Ev. Ecol. Syst. 25: 547.

Pank, M., M. Stanhope, L. Natanson, N. Kohler, and M. Shivji (2001). Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. Marine Biotechnology, 3: 231-240.

Perez, J.A.A., Pezzuto, P.R. (1998). Valuable Shellfish species in the by-catch of shrimp fishery in southern Brazil: spatial and temporal patterns. *J. Shellfish Res*, 17(1): 303-309.

Perez, J.A.A., Pezzuto, P.R., Lucato, S.H.B., Vale, W.G. (2003). Frota de arrasto em Santa Catarina. In: Cergole, M.C., Wongtschowski, C.L.B.R. (Coord.). *Dinâmica das frotas pesqueiras*. São Paulo:Evouir, p.117-184.

Perez, J.A.A., Pezzuto, P.R., Rodrigues, L.F., Valentini, H., Vooren C.M. (2001). Relatório da reunião técnica de ordenamento da pesca de arrasto nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Notas Téc. da FACIMAR, Itajaí*, 5:1-34.

Pinhal, D., Gadig, O.B.F., Wasko, A.P., Oliveira, C., Ron, E., Foreti, F., Martins, C. (2008). Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. *Genetics and Molecular Biology*,31: 361-365.

Polzin, T., Daneschmand, S.V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31:12-20.

Rosa, R.S., Menezes, N.A., (1996). Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 13(3):647-667.

Shivji, M., Clarke, S., Pank, M. (2002). Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, 16: 1036-1047.

Smith, P. J., Jamieson, A. & Birley, A. J. (1990). Electrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 47: 231- 328

Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy*. WH Freeman ed. San Francisco, California.

Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios – SBEEEL. (2005). Plano Nacional de Ação para a Conservação e o Manejo dos estoques de Peixes Elasmobrânquios no Brasil. www.sbeel.org.br/downloads/plano.pdf.

Valentini, H., D’Incao, L.F., Rodrigues, J.W., Rebelo-Neto, J.A., Rahn, E. (1991). Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulenses*) nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Atlântica*, Rio Grande, 13(1): 143-157.

Vazzoler, A.E.M., Soares, L.S.H., Cunningham, P.T.M. (1999). Ictiofauna da costa brasileira. In: Lowe-McConnell, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*, São Paulo: Ed. USP, p. 425-259.

Vooren C.M. & Klippel S. (2005). *Ações para conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre: Ed.Igaré, 262p.

Vooren, C.M., Lamónaca, A.F. (2004). *Rhinoptera brasilienses*. In: IUCN 2006. Red List of Threatened Species. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Vooren, C.M. (1995). Análise da pesca de elasmobrânquios pela frota de Rio Grande. In: Peixes demersais. Coleção Meio Ambiente, Série Estudos de Pesca, IBAMA-MMA, 16: 29-34.

Vooren, C.M. (1997). Demersal elasmobranchs, p. 141-146. In: Seelinger, U., Odebrecht, C. & Castello, J.P. (eds.). Subtropical convergence environments. The coast and sea in the Southwestern Atlantic. Springer Publ., Berlin.

Vooren, C.M. (1998). Elasmobrânquios demersais. Capítulo 6.16. In: Seelinger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. Os ecossistemas costeiro e Marinho do extremo sul do Brasil. Rio Grande: Ed. Ecoscientia. p. 157-162.

Vooren, C.M., Chiaramonte, G.E. (2005). *Squatina argentina*. In: IUCN 2006. Red List of Threatened Species. Disponível em: www.iucnredlist.org

Vooren, C.M., Lamónaca, A.F., Massa, A., Hozbor N. (2006). *Zapteryx brevirostris*. In: IUCN 2006. Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: www.iucnredlist.org.

Walker, P.A., Hislop, R.G. (1998). Sensitive skates or resilient rays? Spatial and temporal shifts in ray species composition in the central and north-western North Sea between 1930 and the present day. *ICES Journal of Marine Science*, 55:392-402.

Ward, R.D., Woodswark, M. & Skibinski, D.O.F. (1995). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44: 48-52.

ANEXOS

a. Anexo 1

b. Anexo 2