



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ – BREVES  
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS – FACIN  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS NA  
CONTEMPORANEIDADE

RAYSSA BORGES DIAS ALVES

*Myliobatis freminvillei* (Lesueur, 1824), UM NOVO CASO CRÍPTICO NO  
ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL

BREVES-PARÁ  
2018

RAYSSA BORGES DIAS ALVES

***Myliobatis freminvillei* (Lesueur, 1824), UM NOVO CASO CRÍPTICO NO  
ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Educação em Ciências na Contemporaneidade.

Orientador: Prof.º Dr. João Bráullio de Luna Sales

BREVES-PARÁ  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

A474m      Alves, Rayssa Borges Dias.  
              Myliobatis freminvillei (Lesuer, 1824), um novo caso crítico no Atlântico Sul Ocidental /  
Rayssa Borges Dias Alves, . — 2018.  
              40 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales  
Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - , Campus Universitário de Breves,  
Universidade Federal do Pará, Breves, 2018.

1. Elasmobrânquios;. 2. Myliobatis;. 3. DNA Barcoding;. 4. Espécie críptica. I. Título.

CDD 370

---

RAYSSA BORGES DIAS ALVES

***Myliobatis freminvillei* (Lesueur, 1824), UM NOVO CASO CRÍPTICO NO  
ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Educação em Ciências na Contemporaneidade.

Orientador: Prof.º Dr. João Bráullio de Luna Sales

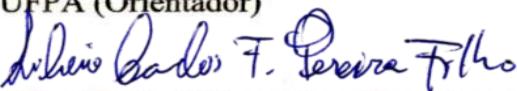
Data de aprovação: 20/06/2018

Conceito: EXCELENTE

**Comissão examinadora:**

  
Prof.º Dr. João Bráullio de Luna Sales

UFPA (Orientador)



Prof.º Dr. Sílvio Carlos Ferreira Pereira Filho

FACIN – CUMB, UFPA (Membro Titular)

  
Prof.º Dr. Jonathan Stuart Ready

UFPA. Cidade Universitária José da Silveira Netto (Membro Titular)

Dedico este trabalho aos meus pais  
Rosivaldo Alves e Raimunda Borges Dias  
pelo amor e carinho que sempre tive para a  
realização dessa etapa da minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida.

Aos meus pais Rosivaldo Alves e Raimunda Borges Dias, pelo apoio e incentivo na nessa etapa.

Ao meu orientador, o Prof.º Dr. João Bráullio de Luna Sales, por me conceder um poucodo seu tempo, compartilhar seu conhecimento e orientar-me nesse trabalho.

Ao meu namorado Romulo Borges do Lago, que também contribui e sempre esteve domeu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo Altemir Soares que esteve comigo na pós-graduação, sempre um apoiando o outro.

As minhas amigas Alriane dos Anjos e Julie Segundo que de alguma forma me apoiaramtambém.

E aos demais amigos e colegas da turma de especialização da Faculdade de Ciências Naturais.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se põe a caminhar”.

Paulo Freire

## RESUMO

A classe dos Chondrichthyes é representada pelos elasmobrânquios (peixes cartilagosos), ao qual divide-se em duas subclasses: Elasmobranchii (Tubarões e Raias) e Holocephalii (Quimeras). O gênero *Myliobatis* é composto por 11 espécies válidas distribuídas ao redor do mundo, destas três são ocorrentes na costa do Brasil, *Myliobatis freminvillei* (Lesueur, 1824), *Myliobatis goodei* (Garman, 1885) e *Myliobatis ridens* (Ruocco, Lucifora, Astarloa, Mabragaña & Delpiani, 2012). A taxonomia das raias da família Myliobatidae permaneceu por muitas décadas inalterada. Contudo, recentemente vários estudos vem redefinindo a validade de famílias, bem como a presença de novas espécies dentro deste grupo. O presente estudo, realizou uma filogenia molecular do gênero *Myliobatis*, testando a eficácia do *DNA barcode* na resolução das espécies do gênero. Indivíduos foram coletados nos estados do Pará e São Paulo, onde os genes COI e RAG1 foram amplificados e comparados com sequências disponíveis no *Genebank*. Os resultados das amostras revelaram que: 1- Das nove espécies utilizadas no presente estudo, sete (7) foram recuperadas de forma monofilética em todas as inferências realizadas. As excessões foram *M. freminvillei* e *M. chilensis*. No caso da primeira, as amostras obtidas do sudeste do Brasil, se mostraram geneticamente distintas em relação as sequências de indivíduos provenientes dos EUA; 2- Em nenhuma das inferências filogenéticas realizadas as espécies sul americanas foram recuperadas como espécies irmãs. As linhagens de *M. freminvillei* foram recuperadas mais proximamente relacionadas a *M. californica*, espécie restrita a região do Oceano Pacífico (México e Califórnia), enquanto *M. goodei* foi recuperada como espécie irmã de *M. chilensis* e finalmente, a última espécie descrito gênero (*M. ridens*) foi recuperada mais próxima a *M. peruvianus*. Adicionalmente, os resultados também indicam a existência de uma nova linhagem genética de *M. freminvillei* no Brasil. Tal presença de uma nova linhagem de *Myliobatis* confirma a necessidade de estudos mais apurados em relação a fauna de elasmobrânquios que ocorrem no Atlântico Sul Ocidental. Uma amostragem mais robusta, bem como inferências sistemáticas irão auxiliar na delimitação de ocorrência desta nova linhagem no litoral brasileiro.

**Palavras-chave:** Elasmobrânquios; *Myliobatis*; *DNA Barcoding*; Espécie críptica.

## ABSTRACT

The class of the Chondrichthyes is represented by the elasmobranch (cartilaginous fishes), which it divides in two subclasses: (sharks and rays) and Holocephalii (Chimeras). The genus *Myliobatis* is composed for 11 valid species distributed around the world, where three are present along the Brazilian Coast: *Myliobatis freminvillei* (Lesueur, 1824), *Myliobatis goodei* (Garman, 1885) and *Myliobatis ridens* (Ruocco, Lucifora, Astarloa, Mabragaña & Delpiani, 2012). The taxonomy of the rays belonging to the Family Myliobatiformes remains unaltered for long time. However, recent study's bringing new insights about the validity of the family as well, the presence of new undescribed species within the genus. The present study performs a molecular phylogeny of the *Myliobatis* genus, testing the efficiency of the DNA Barcoding tool for the resolution of the species within the genus. Individuals from Para and Sao Paulo State where the genes COI and RAG1 was amplified. The Results shows two main finding: 1-From the nine species utilized in the present study, seven was recovered as monophyletic taxa in all phylogenetic procedures; the exceptions were *M. freminvillei* e *M. chilensis*. For the first one, samples from southeastern Brazil are genetically different from sequences from USA; 2- No one of the Brazilian specimens was recovered as sister species where *M. fremenvillei* was recovered more closely related to *M. californica*, a species restricted to the Pacific Ocean (Mexico and California), while *M. goodei* was recovered as sister species of *M. chilensis* and finally, *M. ridens* was recovered more closely to *M. peruvianus*. Additionally, our results indicate the presence of a new genetic lineage of *M. freminvillei* in Brazilian waters. This results show the importance of more accurated studies targeted for fauna of elasmobranch species in Southwestern Atlantic. More sampling efforts as well and a systematic review will be helping to clarify the delimitation of thi snew genetic lineage on the brazilian coast.

**Keywords:** Elasmobranch; *Myliobatis*; DNA Barcoding; Cryptic species.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A e B são representantes da subclasse Elasmobranchii e C é representante da subclasse Holocephalii.....	12
Figura 2 -	Órgão reprodutor dos machos, denominado Clásper.....	13
Figura 3 -	Tubarões e raias comercializados no norte do Brasil.....	18
Figura 4 -	Distribuição global das raias do gênero <i>Myliobatis</i> .....	20
Figura 5 -	a) <i>M. freminvillei</i> ; b) <i>M. ridens</i> ; c) <i>M. chilensis</i> , e d) <i>M. goodei</i> .....	21
Figura 6 -	Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromoc oxidase subunidade I.....	23
Figura 7 -	Locais de amostragem das espécies utilizadas no presente estudo: 1- Bragança, 2- Itanhaém, 3- Praia Grande, 4- São Paulo e 5- São Sebastião.....	25
Figura 8 -	Árvore filogenética contendo valores de suporte para IB e ML respectivamente. Apenas valores acima de 75% de suporte (0.75 de probabilidades <i>a posteriori</i> ) são mostrados. A espécie <i>M. australis</i> atualmente é classificada como <i>M. tenuicaudatus</i> . .....	29
Figura 9 -	Formação de dois clados com espécies de <i>M. freminvillei</i> .....	30
Figura 10 -	Formação de dois clados com espécies de <i>M. chilensis</i> .....	30
Figura 11 -	Árvore filogenética de ML referentes a sequências do gene RAG1 das amostras de <i>Myliobatis</i> .....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação de espécies de elasmobrânquios ameaçados de extinção nas categorias EN-Em Perigo e CR- Criticamente em Perigo.....	16
Tabela 2	Genes utilizados, sequências dos primers, referências e condições de amplificação dos marcadores utilizados no presente estudo.....	26
Tabela 3	Lista de amostras utilizadas no presente estudo contendo código, local de amostragem e referência do GeneBank.....	27

## SUMÁRIO

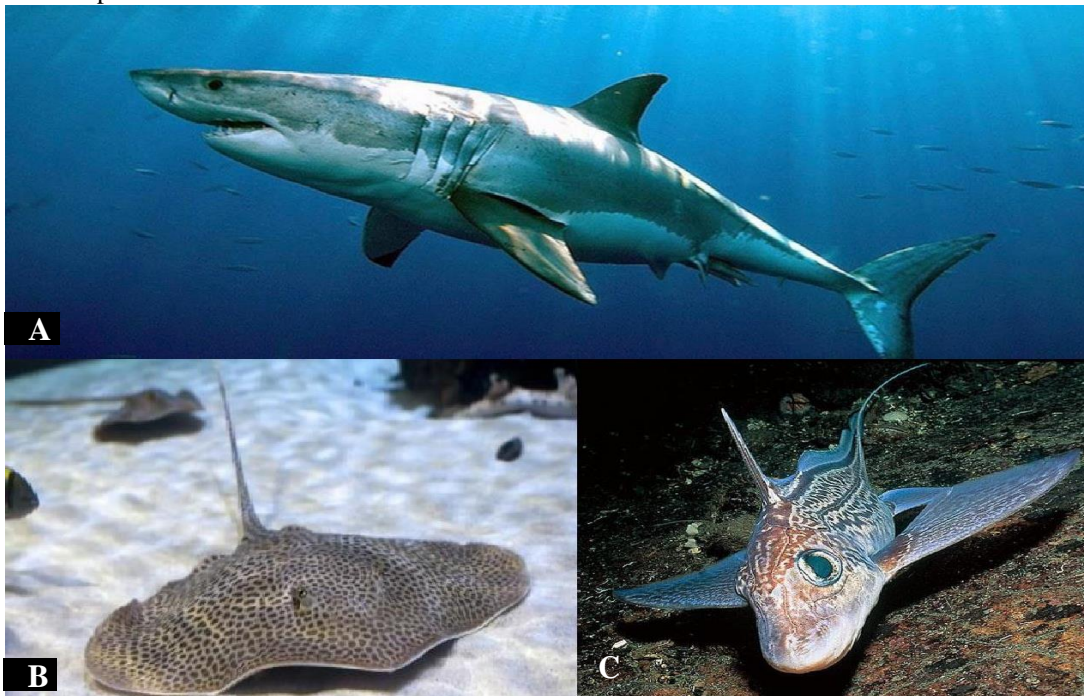
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Características gerais dos Elasmobrânquios.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>Ameaças as populações de Elasmobrânquios.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Raias do gênero Myliobatis Cuvier, 1816.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4</b>	<b>Utilização da ferramenta de DNA Barcoding para estudos de Elasmobrânquios.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Amostragem, extração de DNA e PCR.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Análises moleculares.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais dos Elasmobrânquios

A classe dos Chondrichthyes é representada pelos elasmobrânquios (peixes cartilagosos), ao qual divide-se em duas subclasses: Elasmobranchii (Tubarões e Raias) e Holocephalii (Quimeras) (Figura 1) (Nelson, 1994). As estimativas da diversificação desse grupo com base em sequências de *DNA* são da ordem de 300-460 milhões de anos atrás (Cunha *et al.*, 2017) e a história de vida dos elasmobrânquios indica que são organismos muito bem sucedidos quanto às adaptações ao ambiente no processo evolutivo (Martins, 2007).

Figura 1: *A* e *B* são representantes da subclasse Elasmobranchii e *C* é representante da subclasse Holocephalii.

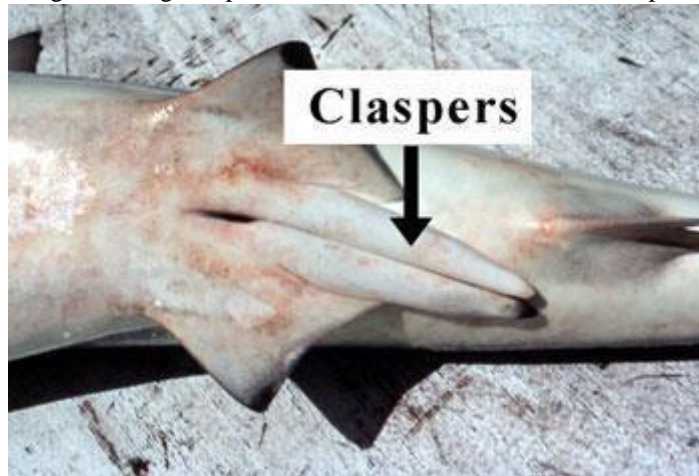


Fonte: <http://www.naturezaeconservacao.eco.br/2015/02/tubaroes-sera-mesmo-que-sao-os.html>;  
[http://www.fishbase.org/images/species/chmon\\_u6.jpg](http://www.fishbase.org/images/species/chmon_u6.jpg);  
<http://29palms.ru/index.php?link=blog&action=showblog&blog=9344>.

Esses peixes caracterizam-se principalmente por terem um esqueleto cartilaginoso e cinco a sete pares de fendas branquiais, e ainda possuem alta longevidade, crescimento lento, podendo atingir grandes tamanhos corporais, a maturação sexual é tardia nesses indivíduos, em virtude disso eles possuem uma baixa taxa de crescimento populacional, e consequentemente priorizam o sucesso da prole, sendo conhecidos como organismos *K estrategistas* (Franco, 2010). Os elasmobrânquios desenvolveram estratégias reprodutivas

diferentes dos peixes teleósteos, esses organismos apresentam fecundação interna, sendo que os machos possuem um apêndice sustentado por cartilagens, denominado cláspes (Figura 2), que se desenvolve na margem interna de cada nadadeira pélvica, e por ocasião da cópula, é introduzido na abertura genital da fêmea, garantindo a passagem do esperma e a fecundação (Figueiredo, 1977).

Figura 2: Órgão reprodutor dos machos, denominado Cláspes.



Fonte: <https://www.floridamuseum.ufl.edu/fish/discover/sharks/biology/>

As espécies deste grupo de organismos estão distribuídas atualmente em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas, associados a ambientes pelágicos, demersais, recifais e até mesmo há exemplares ocorrentes em água doce (Compagno 1990; Gruber, 1990).

Os tubarões, Superordem Selachimorpha, geralmente apresentam corpo alongado e fusiforme, com nadadeiras peitorais destacadas da cabeça e cinco a sete pares de fendas branquiais situados nas laterais da cabeça, são peixes carnívoros e pelágicos, e em sua quase totalidade, são peixes altamente adaptáveis, ocupando diversos nichos ecológicos, habitam águas costeiras e oceânicas, da superfície ao fundo, em praticamente todos os mares (Rodrigues-Filho, 2008). Esses indivíduos podem atingir tamanhos que variam de 0,16 m (tubarão vagalume – *Etmopterus perryi* Springer & Burgess, 1985) a 18 m de comprimento (tubarão baleia – *Rhincodon typus* Smith, 1828) (Benson *et al.*, 2001; Szpilman, 2004).

As raias, Superordem Batoidea, são caracterizadas pelo corpo achatado dorsoventralmente, com olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça (Compagno 1977, 1999). Apresentam boca e fendas braquiais dispostas na região ventral, nadadeiras dorsais e caudais normalmente são reduzidas ou ausentes e nadadeira anal inexistente

(Bigelow & Schroeder, 1953; Nelson, 1994). Diferentemente das espécies de tubarões, a grande maioria das espécies de arraias apresentam hábito bentônico e sedentário, sendo encontradas associadas a fundos marinhos e oceânicos onde, na presença de areia, podem se enterrar, comportamento esse, que auxilia na captura de presas (Gadig, 2001). Algumas espécies também apresentam hábitos pelágicos, ou seja, mais ativos, utilizando a boca aberta durante a natação para entrada de grande quantidade de água que passa pelas brânquias (Szpilman, 2004).

Estudos sobre a biodiversidade desses indivíduos, ainda são escassos (Chapman *et al.*, 2005; Carraro & Gladstone, 2006; Robbins *et al.*, 2006; Heupel *et al.*, 2010; Wiegand *et al.*, 2011; Knip *et al.*, 2012). Em último levantamento realizado por Bornatowisk e Abilhoa (2012), no mundo inteiro são conhecidas cerca de 500 espécies de tubarões e 570 espécies de raias, e destacam que esses números podem variar, tanto local quanto mundialmente. Várias revisões tem sido realizadas nos últimos anos tanto por meio de descoberta e descrição de novas espécies, separação de um grupo em duas ou mais espécies ou até mesmo pela invalidação de outras (Pinhal *et al.*, 2012; Last *et al.*, 2016; White & Naylor, 2016). Em águas brasileiras estima-se que existam aproximadamente 81 espécies de tubarões e 55 espécies de raias (Menezes *et al.*, 2003), entretanto, nos últimos anos, este número tem aumentado (Pinhal *et al.*, 2012). Ecologicamente, os elasmobrânquios integram um grupo importante para a compreensão dos mecanismos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos, uma vez que ocupam o topo da cadeia trófica, participando de maneira acentuada no intercâmbio de energia no ambiente em que vivem (Tomás *et al.*, 2010).

## **1.2 Ameaças as populações de Elasmobrânquios**

A crescente captura de elasmobrânquios decorrente da atividade pesqueira intensiva tem determinado a contínua inclusão de novas espécies nas listas de risco de extinção. Segundo Cahmi *et al.* (1998), a maior ameaça aos elasmobrânquios advém da ação antrópica, seja pela degradação dos ambientes costeiros, como pela pesca excessiva. Rosa e Gagid (2014) reforçam essa visão ao dizer que as capturas em áreas de berçários e até mesmo em áreas protegidas, juntamente com a degradação das zonas costeiras, pela sua ocupação desordenada, poluição, assoreamento, destruição de manguezais, entre outras ações do homem tem impactado diretamente as espécies de Chondrichthyes. Aliado a esses fatores, também, a inexistência de mecanismos fiscalizadores da pesca e de planos para

manejo sustentável das espécies mais exploradas, portanto, torna-se urgente e necessária a formulação de instrumentos que possam colaborar para a reversão desse processo (Franco, 2010).

A redução da disponibilidade de outros recursos pesqueiros também levou a um aumento no consumo de elasmobrânquios (Rodrigues-Filho & Sales, 2017). Contudo, com a redução dos estoques pesqueiros das espécies mais tradicionais, o consumo deste tipo de carne passou a ser também difundido e apreciado. Outro fator de grande incentivo à pesca das espécies deste grupo é o consumo de nadadeiras de tubarões pelas populações da região asiática e, aos preços praticados no comércio internacional, tem promovido a captura de tubarões em praticamente todos os mares (Mendonça, 2010).

Devido ao fato das espécies serem *K* estrategistas, os elasmobrânquios são mais suscetíveis à pressão pesqueira, bem como à sobreexploração em comparação a espécie de teleósteos. Atualmente, diferentes espécies de peixes, incluindo algumas de tubarões e raias, estão relacionadas pelo IBAMA como espécies em extinção e estão merecendo maior atenção por parte dos pesquisadores e das entidades responsáveis pela conservação das espécies e dos ambientes (Franco, 2010).

Diante desse cenário, o ministério do meio ambiente, por meio da Portaria nº 445/2014 teve como objetivo reconhecer as espécies de peixes e invertebrados aquáticos que estão ameaçados de extinção, incluindo uma série de espécies de elasmobrânquios (Tabela 1), proibindo a captura, transporte, armazenamento, guarda, manejo, beneficiamento e comercialização das espécies listadas nas categorias EW (Extinta na Natureza), CR (Criticamente em Perigo) e EN (Em Perigo).

Tabela 1: Relação de espécies de elasmobrânquios ameaçados de extinção nas categorias EN-Em Perigo e CR-Criticamente em Perigo.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	NOME COMUM	CATEGORIA
<b>Carcharhinidae</b>	<i>Carcharhinus galapagensis</i> (Snodgrass & Heller, 1905)	tubarão-das-galápagos	CR
	<i>Carcharhinus obscurus</i> (Lesueur, 1818)	Cação-fidalgo	EN
	<i>Carcharhinus plumbeus</i> (Nardo, 1827)	tubarão-galhudo	CR
	<i>Carcharhinus porosus</i> (Ranzani, 1839)	Cação-azeiteiro	CR
	<i>Isogomphodon oxyrhynchus</i> (Müller & Henle, 1839)	Cação-quati	CR
<b>Sphyrnidae</b>	<i>Sphyrna lewini</i> (Griffith & Smith, 1834)	tubarão-martelo	CR
	<i>Sphyrna media</i> (Springer, 1940)	tubarão-martelo-de-aba-curta	CR
	<i>Sphyrna mokarran</i> (Rüppell, 1837)	tubarão-martelo-grande	EN
	<i>Sphyrna tiburo</i> (Linnaeus, 1758)	tubarão-martelo	CR
	<i>Sphyrna tudes</i> (Valenciennes, 1822)	tubarão-martelo	CR
	<i>Sphyrna zygaena</i> (Linnaeus, 1758)	tubarão-martelo-liso	CR
<b>Triakidae</b>	<i>Galeorhinus galeus</i> (Linnaeus, 1758)	Cação-bico-doce	CR
	<i>Mustelus canis</i> (Mitchill, 1815)	Boca-de-velha	EN
	<i>Mustelus fasciatus</i> (Garman, 1913)	Cação-listrado	CR
	<i>Mustelus schmitti</i> (Springer, 1939)	tubarão-bico-doce-pintado	CR
<b>Hexanchidae</b>	<i>Notorynchus cepedianus</i> (Péron, 1807)	Cação-bruxa	CR
<b>Cetorhinidae</b>	<i>Cetorhinus maximus</i> (Gunnerus, 1765)	tubarão-peregrino	CR
<b>Lamnidae</b>	<i>Carcharias taurus</i> (Rafinesque, 1810)	Cação-mangona	CR
<b>Ginglymostomatidae</b>	<i>Ginglymostoma cirratum</i> (Bonnaterre, 1788)	cação-lixia	CR
<b>Rhincodontidae</b>	<i>Rhincodon typus</i> (Smith, 1828)	Tubarão-baleia	CR
<b>Arhynchobatidae</b>	<i>Atlantoraja castelnaui</i> (Miranda Ribeiro, 1907)	Raia-chita	EN
	<i>Rioraja agassizii</i> (Müller & Henle, 1841)	Raia-santa	EN
	<i>Sympterygia acuta</i> (Garman, 1877)	Raia-emplastro	EN
	<i>Sympterygia bonapartii</i> (Müller & Henle, 1841)	Emplastro-amarelo	EN
<b>Dasyatidae</b>	<i>Bathytoshia centroura</i> (Mitchill, 1815)	Raia-prego-de-cauda-áspera	CR
<b>Gymnuridae</b>	<i>Gymnura altavela</i> (Linnaeus, 1758)	Raia-manteiga	CR
<b>Myliobatidae</b>	<i>Myliobatis freminvillei</i> (Lesueur, 1824)	Raia-amarela	EN
	<i>Myliobatis goodei</i> (Garman, 1885)	Raia-sapo	CR
	<i>Myliobatis ridens</i> (Ruocco, Lucifora, Astarloa, Mabragaña & Delpiani, 2012)	Raia-manteiga	CR
	<i>Rhinoptera brasiliensis</i> (Müller, 1836)	Raia-beiço-de-boi	CR
<b>Potamotrygonidae</b>	<i>Paratrygon aiereba</i> (Müller & Henle, 1841)	Arraia-aramaçá	CR
<b>Pristidae</b>	<i>Pristis pectinata</i> (Latham, 1794)	Peixe-serra	CR
	<i>Pristis pristis</i> (Linnaeus, 1758)	Peixe-serra	CR
<b>Rhinobatidae</b>	<i>Rhinobatos horkelii</i> (Müller & Henle, 1841)	Raia-viola	CR
<b>Squalidae</b>	<i>Squalus acanthias</i> (Linnaeus, 1758)	Cação-bagre	CR
<b>Squatinaidae</b>	<i>Squatina argentina</i> (Marini, 1930)	Cação-anjo-de-asa-longa	CR
	<i>Squatina guggenheim</i> (Marini, 1936)	Cação-anjo-espinhudo	CR
	<i>Squatina occulta</i> (Vooren & Silva, 1991)	Cação-anjo-de-asa-curta	CR

Fonte: Adaptado de Portaria n° 445/2014, MMA.

Em estudo recente sobre o desembarque de tubarões na costa norte do Brasil Feitosa *et al.*, (2018) detectaram nove espécies desses indivíduos (*Carcharhinus porosus*; *Sphyrna mokarran*; *Sphyrna lewini*; *Ginglymostoma cirratum*; *Isogomphodon oxyrhynchus*; *Sphyrna tudes*; *Mustelus canis*; *Sphyrna tiburo*; *Galeocerdo cuvier*), das 17 espécies de tubarão identificadas através da ferramenta de *DNA barcoding*, que estão listadas sob alguma categoria de ameaça de extinção de acordo com a lei brasileira (Potaria 445/2014 do MMA) e autoridades internacionais (IUCN; CITES - Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres). A maioria das espécies de Tubarões-martelo estão sob ameaça em todo o mundo e compuseram 18,7% de amostras, com *Sphyrna mokarran* sendo a quarta espécie mais comum entre as amostras encontradas (Feitosa *et al.*, 2018).

Um dos grandes desafios ao estudo sobre o comportamento das populações de elasmobrânquios, frente às atividades de pesca comercial, é a falta de precisão da estatística pesqueira em relação às espécies capturadas pelas frotas. Isso ocorre principalmente pela dificuldade de identificação das espécies, uma vez que muitas delas apresentam características morfológicas externas bastante semelhantes. Por exemplo, as espécies de raias *Pseudobatos horkelli* (Müller & Henle, 1841), *Pseudobatos percellens* (Walbaum, 1792) e *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841), todas da família Rhinobatidae, apresentando morfologia bastante conservada (Franco, 2010). O mesmo para espécies do (agora) gênero *Hypanus*, (*H. guttatus* (Bloch & Schneider, 1801), *H. americanus* (Hildebrand & Schroeder, 1928)) que ainda aparecem listadas em desembarques na região norte apenas como “arraias” (Gemaque *et al.*, 2017). Estes problemas de identificação muitas vezes impedem um correto conhecimento de quais espécies estão sendo mais exploradas do que outras (Figura 3).

Figura 3: Tubarões e raias comercializados no norte do Brasil.



Fonte: Adaptado de Gemaque, (2017).

Este problema é acentuado para com relação as espécies de tubarões, onde o crescente interesse na sua exploração comercial, principalmente para remoção de barbatanas vem reduzindo sistematicamente seus estoques, promovendo um desbalanceamento do equilíbrio natural no meio marinho (Tomaz *et al.*, 2010). Os efeitos induzidos pela remoção desses predadores da rede de alimentos oceânicos permanecem imprevisíveis. No Brasil, os tubarões são capturados de forma intensiva, principalmente para a comercialização de barbatanas e, secundariamente, para consumo da carne (Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Feitosa *et al.*, 2018). Notadamente a sobrepesca desses indivíduos causa a redução de suas populações podendo desencadear efeitos de cascata trófica, desequilibrando todo o ecossistema (Myers *et al.*, 2007).

Para populações de diferentes espécies de tubarões costeiros do noroeste do Atlântico foram estimados declínios de 40 a 89%, onde se constatou que populações de oito espécies de tubarões nesta região tiveram um declínio de 50% nos últimos 15 anos, sendo de 89% de redução nas populações de tubarão-martelo (*Sphyrna sp.*), 79% para o tubarão-branco (*Carcharodon carcharias* Linneus, 1758) e 65% para as populações do tubarão-tintureiro (*Galeocerdo cuvier* Péron & Lesueur, 1822) (Baum *et al.*, 2003).

Diferentemente dos tubarões, não existe pescarias direcionadas à espécies de arraias. Entretanto, algumas espécies são alvo de pesca esportiva, ou vítimas de redes de arrasto de fundo para pesca de camarão, sendo considerada fauna acompanhante e descartadas depois de já estarem mortas nas redes (Lessa, 1986; Nunes *et al.*, 2005). Nesta vertente, algumas espécies de raias marinhas estão criticamente ameaçadas de extinção,

como o peixe-serra ou espadarte (*Pristis pristis* Linneus, 1758), ao qual ocupa o ranking de umas das espécies de elasmobrânquios mais ameaçadas devido a captura acidental e perda de hábitat, assim como o cação-anjo (*Squatina guggenheim*) espécie que foi muito capturada nos anos 70 e 80 no sul do Brasil (Voorren & Klippel, 2005).

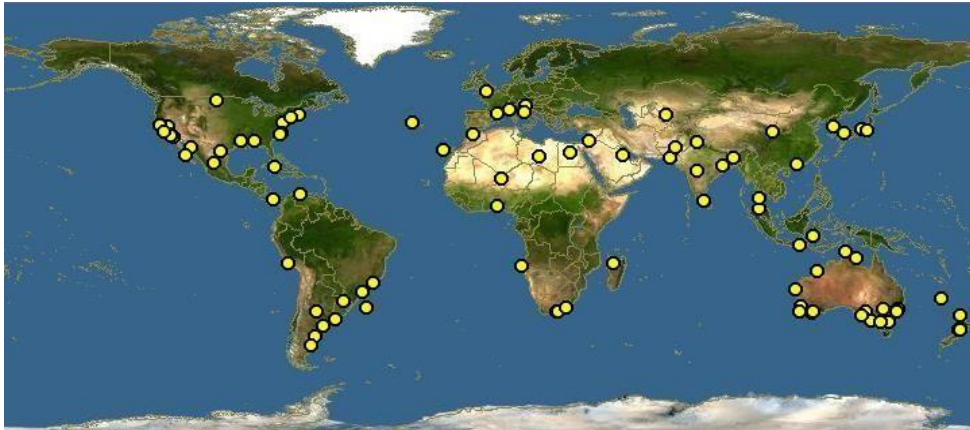
Segundo a FAO, o Brasil é responsável pela captura de cerca de 12.000 toneladas anuais de tubarões e 5.000 toneladas de raias (FAO, 2009) e, a partir do ano 2000, passou a ser considerado pela IUCN como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “Major Shark fishing State” (Lack & Sant, 2006).

Posto isto, o desenvolvimento de ações de conservação, através da implementação de um Plano de Ação Nacional para a conservação de Tubarões e Raias Marinhas ameaçadas de extinção (PAN Tubarões), ao qual tem como objetivo geral “Mitigar os impactos sobre os elasmobrânquios marinhos ameaçados de extinção no Brasil e de seus ambientes, para fins de conservação em curto prazo”, é a perspectiva de reverter a prevalente situação de ameaça que paira sobre as espécies brasileiras de Chondrichthyes (Rosa & Gagid, 2014).

### **1.3 Raias do gênero *Myliobatis* Cuvier, 1816**

O gênero *Myliobatis* é composto por 11 espécies válidas distribuídas ao redor do mundo, a saber: *Myliobatis tenuicaudatus* Hector, 1877; *Myliobatis hamlyni* Ogilby, 1911; *Myliobatis tobijei* Bleeker, 1854; *Myliobatis longirostris* Applegate & Fitch, 1964; *Myliobatis peruvianus* Garman, 1913; *Myliobatis aquila* Linneus, 1758; *Myliobatis californicus* Gill, 1865; *Myliobatis chilensis* Philippi, 1892; *Myliobatis freminvillei* Lesueur, 1824; *Myliobatis goodei* Garman, 1885; *Myliobatis ridens* Ruocco, Lucifora, Astarloa, Mabragna & Delpiani, 2012 onde estas 3 últimas ocorrem na costa do Brasil (Figura 4) (White, 2014; Araújo, Marangoni & Velasco, 2017).

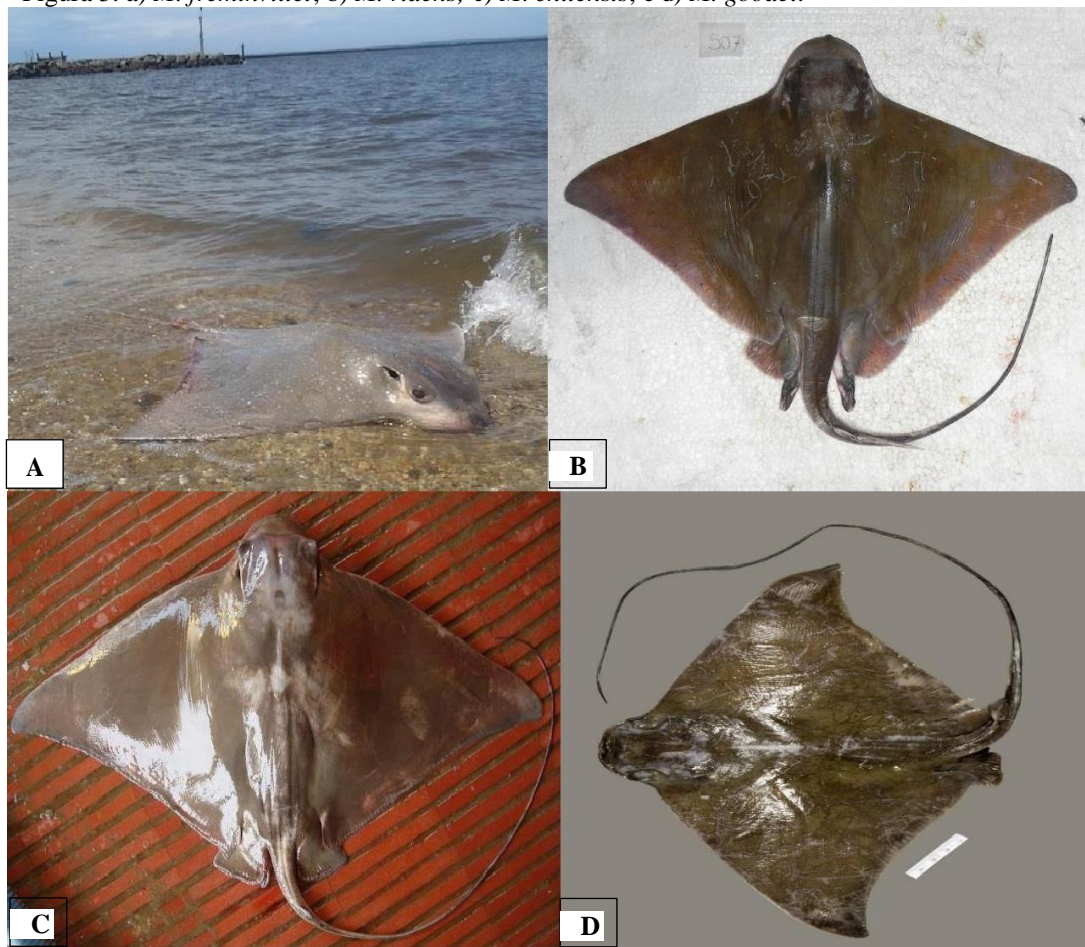
Figura 4: Distribuição global das raias do gênero *Myliobatis*.



Fonte: Discover life ([www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org))

As raias do gênero *Myliobatis* são vivíparas placentárias, vivem em águas costeiras em regiões tropicais. Possuem um corpo em forma de losango e tem uma projeção semelhante a de um focinho na região da cabeça (Figura 5), indivíduos adultos podem atingir até 3 m de largura, apresentam cauda filiforme e alongada semelhante a um chicote, de base estreita, muito mais longa que o disco, com a presença de aguilhão serrilhado, sendo peçonhentas (White & Naylor, 2016). Os olhos encontram-se na porção lateral da cabeça, a boca é pequena com dentes em formato de placas adaptados para a alimentação de crustáceos, moluscos e outros invertebrados (Bigelow & Schroeder, 1953; Bond, 1996; Hamlett, 1999; McEachran & Carvalho, 2002).

Figura 5: a) *M. freminvillei*; b) *M. ridens*; c) *M. chilensis*, e d) *M. goodei*.



Fonte: Naturalista ([www.naturalista.mx/photos](http://www.naturalista.mx/photos))

A taxonomia das raias da família Myliobatidae permaneceu por muitas décadas inalterada. Contudo, recentemente vários estudos vem redefinindo a validade de famílias, bemcomo a presença de novas espécies dentro deste grupo (White *et al.*, 2010, 2013, 2016; Ruocco *et al.*, 2012; White & Moore, 2013). Uma vez que os indivíduos desse gênero possuem uma morfologia muito semelhante entre si, a separação de algumas espécies, principalmente as de ocorrência simpátrica, se torna um desafio para as pessoas menos experientes. Para o Continente Americano, a última revisão realizada por Ruocco *et al.* (2012), culminou na descrição de mais uma espécie do gênero (*M. ridens*), distribuída do sul do Brasil, até a Argentina, onde esta espécie apresenta morfologia bastante similar a *M. freminvillei* entretanto, apresentando olhos menores, bem como barbatana dorsal menor, coloração diferente de dorso e morfologia da cartilagem do cláspes distintos além de ter uma distância genética maior a 6% em relação as outras espécies do gênero (Ruocco *et al.*, 2012). Até o presente estudo, nenhuma inferência morfológica ou molecular foi realizada com indivíduos das outras regiões do Brasil, ou dentro das espécies *M. freminvillei* e *M.*

*goodei* fato que pode mascarar a presença de espécies não descritas e novas linhagens genéticas dentro do gênero.

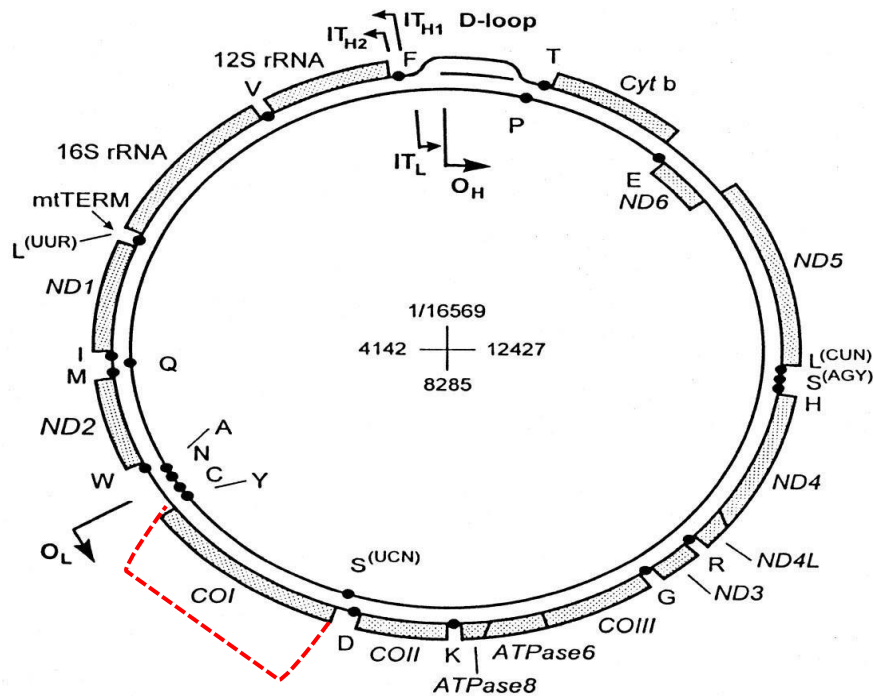
#### **1.4 Utilização da ferramenta de DNA *Barcoding* para estudos de Elasmobrânquios**

Nos últimos anos, o avanço da técnica de identificação a nível molecular das espécies, vêm auxiliando a taxonomia de grupos problemáticos, permitindo a identificação e discriminação de espécies novas de elasmobrânquios (Pinhal *et al.*, 2012; Ruocco *et al.*, 2012; Arlyza *et al* 2013; White *et al* 2013, 2015; Last *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos a descrição e a identificação das espécies são feitas com base em traços morfológicos e são restritas a uma pequena parcela de pesquisadores, os taxonomistas, os quais muitas vezes não estão presentes em número suficiente dada a grande diversidade de espécies, bem como para regiões mega-diversas como o Atlântico Sul Ocidental (Palmeira *et al.*, 2013). No entanto, apenas a abordagem morfológica muitas vezes não consegue chegar a uma descrição precisa de determinada espécie, e por haverem certas limitações que ocultam a real posição sistemática das espécies, basicamente porque alguns grupos de animais conservam características morfológicas muito similares entre si, o que limita a ação dos taxonomos (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2007). Adicionalmente a esta problemática, as chaves de identificação geralmente não tratam todos os estágios de vida de uma espécie/grupo, tornando o sistema fortemente dependente de especialistas (Hebert *et al.*, 2003).

Mais recentemente, os métodos baseados em *DNA* ganharam popularidade, uma vez que este é relativamente estável, e pode ser acessado de todas as etapas da vida usando pequenas quantidades de tecido, bem como o fato das sequências de *DNA* serem altamente reproduzíveis (Ward *et al.*, 2009). O *DNA Barcoding* é um sistema inovador projetado para fornecer identificações rápidas, precisas e automáticas de espécies usando regiões de genes curtas e padronizadas (Hebert & Gregory, 2005). Essa pequena região é retirada do genoma mitocondrial, onde a região padrão selecionada normalmente é o gene da subunidade I do Citocromo *C* oxidase (COI), com um par de iniciadores universais para reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificando aproximadamente 650 pares de base (bp) (Figura 6).

Figura 6: Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromoc oxidase subunidade I.



Fonte: Modificado de Taanman, (1999).

A ferramenta de código de barras de DNA tem auxiliado o ritmo da descoberta de espécies, variando desde peixes (Pereira *et al.* 2010b, 2013; Nwani *et al.* 2011; Roucco *et al.*, 2012), aves (Hebert *et al.*, 2004a), borboletas (Hebert *et al.*, 2004b; Dasmahapatra *et al.* 2010), mamíferos (Agrizzi *et al.*, 2012) e répteis (Martin *et al.*, 2013). É importante frisar que o código de barras de DNA não substitui a importância dos sistemátas, apenas indica quais grupos/espécies merecem uma importância de revisão sistemática mais urgente do que outras espécies, o que desta forma faz com que os sistemátas concentrem esforços em determinados taxóns reduzindo assim o tempo investido em grupos que não necessitam a priori de investigações mais profundas (Ebach & Holdrege, 2005).

O DNA mitocondrial dos animais possuem vantagens, como herança predominantemente materna, baixo polimorfismo, ausência de recombinações gênicas e baixa taxa de mutação, daí a sua eficácia nos estudos taxonômicos, filogenéticos e de genética de populações (Hebert, 2003a; Ward *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Witt *et al.*, 2006; Silva, 2013). A partir da sequência obtida de uma determinada espécie, seus dados são armazenados em um banco de vida online, o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (Hebert *et al.*, 2003a) ou na plataforma do *GeneBank*, disponível no endereço eletrônico ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Com esse banco de dados é possível comparar a sequência da espécie atual que está sendo investigada com a sua biblioteca, se caso a sequência tiver uma

similaridade considerável podemos dizer que a espécie foi identificada, caso contrário podemos ter uma nova espécie. A introdução do código de barras de *DNA* é uma adição natural para a era pós-genômica, em que o genoma completo forneceu uma grande quantidade de informações de sequência de um número limitado de espécies (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Estudos com a utilização da ferramenta de *DNA Barcoding* em elasmobrânquios tem demonstrado fortes evidências de que muitas espécies desse grupo de organismos possuem um risco alto de extinção futura (Garcia *et al.*, 2008). Pesquisas recentes revelaram que a pesca de espécies de elasmobrânquios ameaçados de extinção ainda ocorrem de forma acentuada (Feitosa *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2013; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009). Também utilizam-se dados moleculares para a identificação de espécies de tubarões e raias comercializados, como em forma de filés (Palmeira *et al.*, 2013; Lago, Vieites & Espiñeira, 2012; Barbuto *et al.*, 2010; Marko *et al.*, 2004). Nestes casos, análises de *DNA* representam uma ferramenta útil para rastrear e verificar a autenticidade de produtos derivados de elasmobrânquios (carne e barbatanas) comercializados em determinadas regiões ou exportados para outros países e eventualmente identificar espécies ameaçadas (Palmeira *et al.*, 2013).

O uso do código de barras de *DNA* utilizado nos condrictes é um potencial aliado dos sistematas na elucidação de espécies crípticas, ajudando a resolver a nomenclatura do grupo/espécie em questão (White *et al.*, 2010 *a*; White & Moore, 2013; White, Furumitsu & Yamaguchi, 2013; White & Naylor, 2016; Ball *et al.*, 2016; Silveira, 2017). Bem como na descoberta de novas espécies (Bickford *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2009; Pinhal *et al.*, 2012; Roucco *et al.*, 2012; White *et al.*, 2015).

Com a reorganização taxonômica de várias espécies de elasmobrânquios, incluindo espécies de raias do gênero *Myliobatis*, o presente estudo, através da ferramenta de *DNA barcoding*, pretende testar a utilização da mesma na identificação de quais espécies do gênero *Myliobatis* ocorrem em outras regiões do litoral brasileiro, permitindo assim, a detecção de possíveis espécies ainda não descritas, bem como ter indícios de quais são as espécies mais capturadas e comercializadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar uma filogenia molecular do gênero *Myliobatis*, testando a eficiência do *DNA barcode* na resolução do posicionamento filogenético das espécies do gênero.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar a eficácia do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I, como ferramenta de Identificação molecular para identificação de raias do genero *Myliobatis*;
- ✓ Testar a possível presença de espécies crípticas do gênero *Myliobatis* no Atlântico Sul Ocidental.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostragem, extração de DNA e PCR

Para o presente estudo, foram coletados 5 indivíduos previamente identificados como *Myliobatis freminvillei* nas cidades de Bragança, no estado do Pará, São Paulo, São Sebastião, Praia Grande e Itanhaém no estado de São Paulo (Figura 7).

Figura 7: Locais de amostragem das espécies utilizadas no presente estudo: 1-Bragança, 2-Itanhaém, 3-Praia Grande, 4-São Paulo, 5- São Sebastião.



Fonte: Elaborado pelo autor (a)

De cada indivíduo amostrado, um pequeno pedaço de tecido muscular foi retirado e acondicionado em tubo eppendorf de 1,5ml contendo etanol absoluto. Os indivíduos voucher, foram depositados na coleção zoológica da Universidade Santa Cecília em Santos. Os tecidos musculares foram acondicionados em freezer a -4°C até o momento da extração de DNA.

O DNA genômico total foi obtido utilizando-se o Kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo Mouse Tail. Para as reações em cadeia da polimerase, os PCR's foram realizados com uma concentração final de 25 µl contendo: 0.5 µl de cada primer, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 4 µl de dNTP (1.25mM), 5.0 µl de 5x buffer, 0.2 µl de Taq polimerase (5U/µl) e o restante completado com água ultra pura. Inicialmente, o gene COI foi amplificado com o par de marcadores Fish F1 e R1 (Ward *et al.*, 2005). Adicionalmente, a amostra proveniente de Bragança não conseguiu ser amplificada com os primers de COI, então utilizamos um par do gene nuclear RAG1 (Aschliman *et al.*, 2012) (Tabela 2).

Tabela 2: Genes utilizados, seqüências dos primers, referências e condições de amplificação dos marcadores utilizados no presente estudo.

GENE	INICIADORES	REFERÊNCIA	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO
<b>COI</b>	Fish F1: 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC- 3' Fish R1: 5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA -3'	Ward <i>et al.</i> , (2005)	Desnaturação inicial a 94°C por 1', 35 ciclos a 94°C por 40'' (desnaturação), 52°C por 40'' (hibridização) e 72°C por 1', e extensão final a 72°C por 10'
<b>RAG1</b>	RAGFOR61: 5'- CAGYTATGACATGAARTACCCAGTC- 3' RAG1REV12: 5'- CTGGCTTCAGCCCTGATCCATG-3'	Aschliman <i>et al.</i> , (2012)	Desnaturação inicial a 94°C por 3', 35 ciclos a 94°C por 40'' (desnaturação), 60°C por 1'30'' (hibridização) e 72°C por 2', e extensão final a 72°C por 5'

Fonte: Elaborado pelo Autor (a).

Para o sequenciamento dos fragmentos obtidos, as PCR's serão previamente purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (Applied Biosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

### 3.2 Análises moleculares

As sequências obtidas foram alinhadas através da ferramenta de alinhamento automático CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) implementada no programa BioEdit v. 7.0.4 (Hall, 1999). Com o intuito de verificar e comparar as sequências obtidas no presente estudo, sequências de indivíduos do gênero *Myliobatis* disponíveis dos dois marcadores utilizados no presente estudo foram baixadas no site Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e implementadas no nosso banco de dados. Sequências de *Rhinoptera bonasus*, *Aetobatus narinari* e *Manta birostris* foram utilizados como grupo externo para ajudar no direcionamento das espécies do gênero *Myliobatis* nas análises filogenéticas do presente estudo. Desta forma, dois bancos de dados finais foram montados para o presente estudo: 1-Banco do gene COI, contendo praticamente todas as espécies válidas do gênero; 2-Banco do gene RAG1, contendo a sequência de Bragança do presente estudo e mais alguns indivíduos disponíveis (Tabela 3).

Tabela 3: Lista de amostras utilizadas no presente estudo contendo código, local de amostragem e referência do Genbank.

Espécie	Código	Local	Origem
<i>Myliobatis freminvillei</i>	100	Intanhaém-SP	Presente estudo
<i>Myliobatis freminvillei</i>	84	Praia Grande-SP	Presente estudo
<i>Myliobatis freminvillei</i>	79	São Sebastião-SP	Presente estudo
<i>Myliobatis freminvillei</i>	48	São Paulo	Presente estudo
<i>Myliobatis freminvillei</i>	2	Bragança-PA	Presente estudo
<i>Myliobatis freminvillei</i>	1	USA	KT075326
<i>Myliobatis freminvillei</i>	2	Oceano Atlântico	KF930155
<i>Myliobatis ridens</i>	528	Argentina	JQ305821
<i>Myliobatis ridens</i>	514	Argentina	JQ305824
<i>Myliobatis ridens</i>	513	Argentina	JQ305825
<i>Myliobatis ridens</i>	516	Argentina	JQ305822
<i>Myliobatis peruvianus</i>	3	Chile	KU737878
<i>Myliobatis peruvianus</i>	1	Chile	KU737877
<i>Myliobatis peruvianus</i>	29	Chile	KU737880
<i>Myliobatis peruvianus</i>	27	Chile	KU737879
<i>Myliobatis goodei</i>	1	Argentina	JQ305803
<i>Myliobatis goodei</i>	2	Argentina	JQ305809
<i>Myliobatis goodei</i>	3	Argentina	JQ305808
<i>Myliobatis goodei</i>	4	Argentina	JQ305807
<i>Myliobatis chilensis</i>	17	Chile	KU737864
<i>Myliobatis chilensis</i>	10	Chile	KU737859
<i>Myliobatis chilensis</i>	7	Chile	KU737876
<i>Myliobatis chilensis</i>	5	Chile	KU737875
<i>Myliobatis chilensis</i>	4	Chile	KU737874
<i>Myliobatis chilensis</i>	26	Chile	KU737873
<i>Myliobatis aquila</i>	8	África do Sul	JF493930
<i>Myliobatis aquila</i>	7	África do Sul	JF493929

<i>Myliobatis aquila</i>	9	África do Sul	JF493928
<i>Myliobatis aquila</i>	10	África do Sul	JF493927
<i>Myliobatis tobijei</i>	256	China	KP267630
<i>Myliobatis tobijei</i>	2	Indonésia	EU398924
<i>Myliobatis californica</i>	1	Califórnia	EU489721
<i>Myliobatis californica</i>	2	México (Pacífico)	KM364885
<i>Myliobatis californica</i>	3	USA	KF317725
<i>Myliobatis australis</i>	35	Austrália	EU398923
<i>Myliobatis australis</i>	36	Australia	EU398922
<i>Myliobatis australis</i>	37	Austrália	EU398921
<i>Myliobatis australis</i>	38	Austrália	EU398920
<i>Aetobatus narinari</i>	693	Bragança	Presente estudo
<i>Rhinoptera bonasus</i>	910	Bragança	Presente estudo
<i>Manta birostris</i>		África do Sul	JF493866

Fonte: Elaborado pelo Autor (a).

Inferência bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV), foram estimados nos programas Mr. Bayes v.3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) e PhyML v.3.0 (Guidon *et al.*, 2010) respectivamente. Para estas duas metodologias filogenéticas diferentes, os bancos de dados foram analisados com um único modelo de substituição (não particionado), e particionado por posição de codon (os modelos de substituição foram selecionados para cada uma das três posições). Os modelos evolutivos mais adequados para cada banco de dados foram estimados no programa jModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012).

Para as análises de MV, o índice de confiabilidade dos ramos foi estimado através de 1000 réplicas de *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein, 1985). No caso das Inferências Bayesianas, foram baseadas em amostragens de MCMC in quatro corridas simultâneas, cada uma consistindo de quatro cadeias (uma quente e três aquecidas) com uma corrida total de 10 milhões de gerações. Probabilidades bayesianas foram selecionadas com um consenso de 60%. Conservativamente, 25% das árvores iniciais foram descartadas como *burn-in*. Os scores de log-likelihood foram plotados no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2009) para confirmar a validade do período inicial de *burn-in* usado no Mr. Bayes. As amostras pós *Burn in* foram usados para construir as árvores utilizadas no presente estudo.

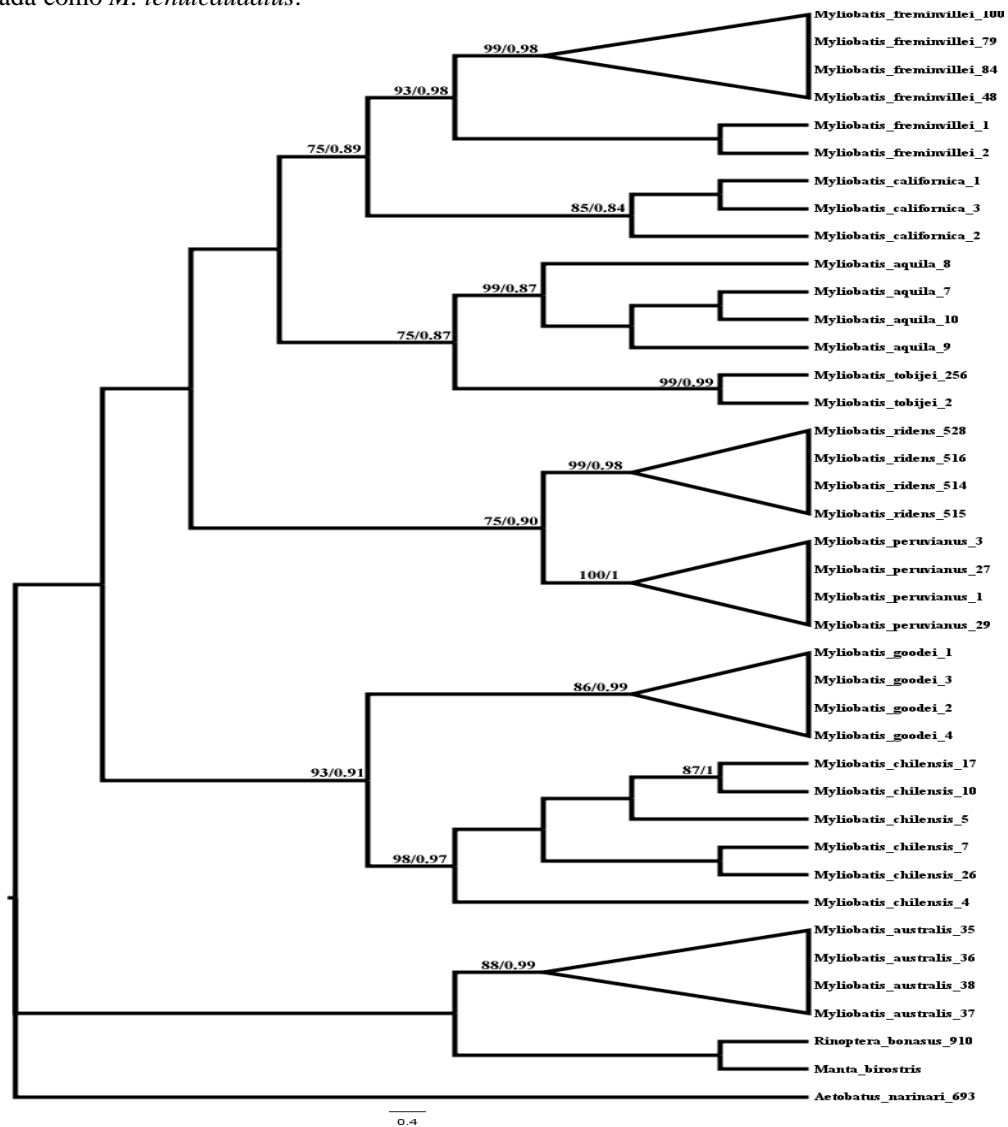
#### 4 RESULTADOS

Todas as inferências genéticas realizadas com o banco de dados do presente estudo, revelam resultados interessantes sobre o posicionamento filogenético das espécies do gênero *Myliobatis*. Tanto as árvores de Inferência Bayesiana quanto Máxima

Verossimilhança demonstraram basicamente as mesmas topologias, principalmente em relação ao posicionamento filogenético das amostras do presente estudo, e desta forma, apenas a árvore de Inferência Bayesiana é mostrada, contendo os valores de suporte dos mesmos ramos da árvore de Máxima verossimilhança.

Para o presente estudo, o banco de dados do gene COI das 11 espécies válidas do gênero, o nosso estudo utilizou sequências de 9 dessas espécies, desta forma, realizando a filogenia molecular do gênero *Myliobatis* mais completa até o momento. Destas nove espécies, sete (7) foram recuperadas de forma monofilética em todas as inferências realizadas (Figura 8). As exceções foram *M. freminvillei* e *M. chilensis*.

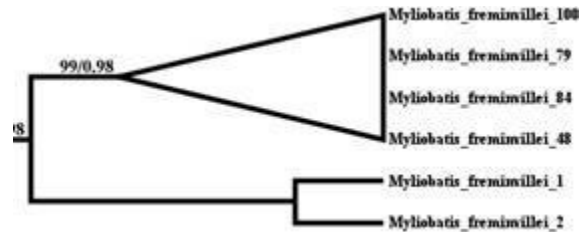
Figura 8: Árvore filogenética contendo valores de suporte para IB e ML respectivamente. Apenas valores acima de 75% de suporte (0.75 de probabilidades *a posteriori*) são mostrados. A espécie *M. australis* atualmente é classificada como *M. tenuicaudatus*.



Fonte: Autoria própria.

No caso da primeira (*M. freminvillei*), as amostras obtidas do sudeste do Brasil, se mostraram geneticamente distintas em relação as sequências de indivíduos provenientes dos EUA, formando um clado com altos valores de suporte (99% e 0.98 para MV e IB respectivamente) (Figura 9).

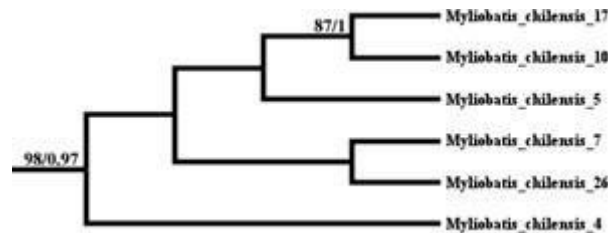
Figura 9: Formação de dois clados com espécies de *M. freminvillei*.



Fonte: Autoria Própria.

Para o caso de *M. chilensis*, dois clados foram formados: O primeiro contendo as sequências de código 10 e 17 (87% e 1 para ML e IB respectivamente), o segundo formado pelas outras sequências (98% e 0.97 para ML e IB respectivamente) (Figura 10).

Figura 10: Formação de dois clados com espécies de *M. chilensis*.

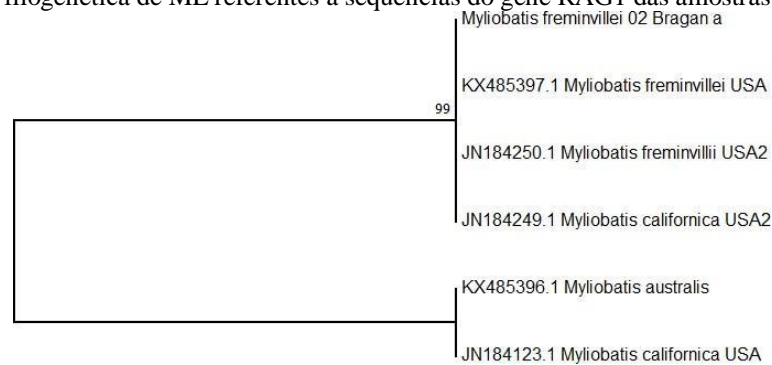


Fonte: Autoria própria.

Outro resultado interessante com relação as espécies sul americanas é o fato de que em nenhuma das inferências filogenéticas realizadas, estas foram recuperadas como espécies irmãs. As linhagens de *M. freminvillei* foram recuperadas mais proximamente relacionadas a *M. californicus*, espécie restrita a região do Oceano Pacífico (México e Califórnia), enquanto *M. goodei* foi recuperada como espécie irmã de *M. chilensis* e finalmente, a última espécie descrita do gênero (*M. ridens*) foi recuperada mais próxima a *M. peruvianus*.

A árvore filogenética do gene nuclear RAG1, contendo as amostras provenientes de Bragança-PA do presente estudo agrupou esta com sequências de *M. freminvillei* dos EUA e uma sequência de *M. californica* com suporte elevado de *bootstrap* (99% para ML) (Figura 11). Houve a formação de um segundo clado contendo uma sequência de *M. tenuicaudatus* e outra sequência de *M. californica* dos EUA.

Figura 11: Árvore filogenética de ML referentes a sequências do gene RAG1 das amostras de *Myliobatis*.



Fonte: Autoria própria.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a realizar inferências filogenéticas em raias do gênero *Myliobatis* contendo indivíduos do Brasil. Os dados combinados do sequenciamento do gene mitocondrial COI, revelaram a existência de uma nova linhagem genética de *M. freminvillei* no Brasil para o gene COI. Roucco *et al.*, (2012) através de uma análise morfológica e genética descreveram uma espécie nova (*M. ridens*) na região sudoeste do Oceano Atlântico. A análise de sequências COI desse estudo mostraram uma divergência de sequência congênita maior que 6%, apoiando a diferenciação de espécies, uma vez que esses indivíduos apresentam similaridade morfológica com as outras espécies do gênero, principalmente com *M. goodei*, ao qual já havia sido nomeada por Cruz, (1983) como sendo *Myliobatis goodei* tipo 2.

Nos resultados do presente estudo para o gene nuclear RAG1 foi possível observar que a amostra de *M. freminvillei* proveniente da Costa Norte (Bragança-PA), se mostrou geneticamente similar a amostras provenientes dos EUA. Este resultado pode indicar 2 caminhos distintos: 1-A divergência genética encontrada para o gene COI dos indivíduos da Costa Sudeste é devido a taxa de mutação maior do marcador mitocondrial; 2-Existe ao longo da Costa Nordeste/Sudeste uma barreira física que impede o fluxo gênico entre os indivíduos desta região, e os da Costa Norte/Atlântico Norte. Para a verificação destas duas hipóteses, mais indivíduos devem ser coletados e sequenciados para a verificação de um possível ponto de quebra de distribuição de *M. freminvillei* (Borges et al. em preparação).

Entretanto, devido ao histórico recente de linhagens crípticas dentro de espécies de elasmobrânquios, provavelmente a segunda hipótese pode ser a mais precisa. Silveira,

(2017) em um estudo molecular, utilizando tanto o gene COI quanto o gene RAG1, com as raias do gênero *Gymnura* constatou a existência de uma espécie geneticamente distinta de *Gymnura micrura* (Bloch & Shneider, 1801) provenientes da região do Caribe Mexicano, além da possível presença de uma população simpátrica ao longo do Atlântico Sul Ocidental. Adicionalmente, em todas as simulações realizadas, *Aetoplatea zonura* não foi recuperada como uma espécie pertencendo a um gênero válido, sendo sempre recuperado próximo a espécies do gênero *Gymnura* do Pacífico, apontando *Aetoplatea* como sendo um gênero não válido.

A existência de linhagem críptica em condrictes é relatada no trabalho de Pinhal *et al* (2012), cuja pesquisa que utilizou sequências de DNA nuclear e mitocondrial revelaram que a espécie *Sphyrna* sp. (simpátrica de *Sphyrna lewini*) também ocorre no Atlântico Sul, esses indivíduos tiveram uma divergência de 1,6 (ITS2) e 5,8% em relação a *S. lewini*, assim como, com cada uma das oito espécies de tubarões-martelo taxonomicamente descritos variaram da linhagem *Sphyrna* sp. entre 1,6 a 6,9%. O referido estudo também gerou uma estimativa de divergência de »4,5 milhões de anos entre *S. lewini* e a linhagem críptica.

White e Last, (2012) afirmam que espécies consideradas com distribuição circunglobal devem ser cuidadosamente reavaliadas com base nas descobertas recentes de complexos de espécies para um número de grupos. É o caso do complexo de espécies de *Aetobatus narinari* (Euphrasen, 1790), Richards *et al.*, (2009) usaram técnicas moleculares para mostrar que o cosmopolita *A. narinari* é um complexo de espécies, com um clado do Pacífico Indo- Oeste/Central e um clado do Atlântico Ocidental. Posteriormente, White *et al.*, (2010) utilizaram dados morfológicos, parasitológicos e moleculares para ressuscitar *A. ocellatus* (Kuhl, 1823) como espécies do Pacífico Indo-Oeste e Central neste complexo. White e Moore,(2013) redescreveram *A. flagellum* (Bloch & Schneider, 1801) e afirmaram que as populações do Noroeste do Pacífico, anteriormente referidas como esta espécie, são na verdade uma espécie não descrita. Sendo esta formalmente chamado e descrito como *A. narutobiei* por White, Furumitsu & Yamaguchi, (2013).

White, (2014) em um estudo sobre as raias da família Myliobatidae apresentou as seguintes definições: O gênero *Pteromylaeus* (Garman, 1913) foi designado como sendo sinônimo de *Aetomylaeus* (Garman, 1908), restando apenas três gêneros válidos para essa família, *Aetobatus*, *Aetomylaeus* e *Myliobatis*. Contudo, as divergências existentes nessa família foram relatadas recentemente por White e Naylor, (2016) que apoiados à dados moleculares realocaram as raias pelágicas do gênero *Aetobatus* para uma própria família,

denominada Aetobatidae, restando à família Myliobatidae apenas os gêneros *Aetomylaeus* e *Myliobatis*.

O fato adicional de nenhuma das espécies do gênero *Myliobatis* presentes no Atlântico Sul Oriental não terem sido recuperadas como espécies irmãs também merece uma atenção diferenciada. Possivelmente, pelo padrão filogenético obtido para o posicionamento das espécies do gênero *Myliobatis*, há indicativo de uma origem Asiática com posterior diversificação ao continente Americano, via Pacífico, o que justificaria uma maior diversidade de espécies presentes nesta região em detrimento ao Atlântico. Para espécies de raias, este resultado vem sendo obtido em estudos realizados nos últimos anos para o gênero *Aetobatus* (Richards *et al.*, 2009; White *et al.*, 2010; White *et al.*, 2013) e *Gymnura* (Silveira, 2017) onde o surgimento do Istmo do Panamá está ligado a uma maior proximidade entre espécies do Pacífico-Atlântico ao menos para espécies do gênero *Aetobatus* (Sales *et al.* em preparação). A inclusão de mais marcadores, bem como ampliação do número de espécimes de mais localidades, podem revelar mais dados a respeito da importância e ação de eventos geológicos na especiação do gênero *Myliobatis* ao longo do seu gradiente de ocorrência.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirma a eficácia da ferramenta de DNA *barcode* em discriminar espécies morfologicamente similares e desta forma demonstra mais um provável caso de espécie não descrita dentro de um grupo de elasmobrânquios no Litoral Brasileiro. A presença de uma nova linhagem de *Myliobatis* confirma a necessidade de estudos mais apurados em relação a fauna de elasmobrânquios que ocorrem no Atlântico Sul Ocidental. Uma amostragem mais robusta, bem como inferências sistemáticas irão auxiliar na delimitação de ocorrência desta nova linhagem no Litoral Brasileiro.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. R. V.; MARANGONI, J. C.; VELASCO, G.. Incidental capture of *Myliobatis goodei* and *Myliobatis ridens* in artisanal fishing in southern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 2017.

ARLYZA, I.S.; SHEN, K-N.; SOLIHIN, D.D.; SOEDHARMA, D.; BERREBI, P. & BORSA, P. Species boundaries in the *Himantura uarnak* species complex (Myliobatiformes:Dasyatidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.66, 429-435, 2013.

ASCHLIMAN, N. C.; NISHIDA, M.; MIYA, M.; INOUE, J. G.; ROSANA, K. M.; NAYLOR, G. J. P. Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes:Batoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.63, 28-42, 2012.

BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; LABRA, M.; MALANDRA, R.; GALLI, P., *et al.* DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: the Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). **Food Research International**, v.43(1), 376-381, 2010.

BAUM, J. K.; MYERS, R. A.; KEHLER, D. G.; WORM, B.; HARLEY, S. J. & DOHERTY, P. A. Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. **Science**, 389–392, 2003.

BIGELOW, H.B. & SCHROEDER, W.C. Sawfishes, guitarfishes, skates, rays and chimaeroids. In Tee-Van J., Breder C.M., Parr A.E., Schroeder W.C. and Schultz L.P. (eds). **Fishes of the western North Atlantic**, part 2. New Haven, CT: Memoirs of the Sears Foundation for Marine Research, pp. 1–514, (1953).

BOND, C.E. **Biology of fishes**. Orlando, FL: Saunders College Publishing, 1996.

BORNATOWSKI, H. & ABILHOA, V. Tubarões e raias capturados pela pesca artesanal no Paraná: guia de identificação. Curitiba, Hori Consultoria Ambiental. **Hori Cadernos Técnicos**, 4:124, 2012.

BRASIL. MMA (Ministério do Meio Ambiente). Portaria N° 445, de 17 de Dezembro de 2014: Anexo I – Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União** – seção 1 N° 245, 18 de dezembro de 2014.

CAMHI, M.; FOWLER, S.; MUSICK, J. & BRÄUTIGAN, F.S. Sharks and their relatives. Ecology and Conservation. Occas. **Paper of the IUCN Species Survival Commission**, 20: 39. 1998.

CAMPAGNO, L. J. V. & LAST, S. FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. **FAO Fish.Synop**, (125), v.4, Pt.2: 251-655, 1999.

COMPAGNO, L. J. V. Phyletic relationships of living sharks and rays. **Ann. Zool.**, 17: 303-322, 1977.

COMPAGNO, L. J. V. Checklist of living elasmobranchs. In Hamlett W.C. (ed.) Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. Baltimore, MD: **Johns Hopkins University Press**, pp. 471–498, 1999.

CAMPAGNO, L.J.V. Checklist of Living Chondrichthtes. *In*: Hamlett, W. **Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, skates and rays**. Ed. p. 503-548, 2005.

CARRARO, R. & GLADSTONE, W. Habitat preferences and site fidelity of the ornate wobbegong shark (*Orectolobus ornatus*) on rocky reefs of New South Wales. **Pacific Science**, 60(2), 207-223, 2006.

CHAPMAN, D. D.; PIKITCH, E. K.; BABCOCK, E. & SHIVJI, M. S. Marine reserve design and evaluation using automated acoustic telemetry: a case-study involving coral reef-associated sharks in the Mesoamerican Caribbean. **Marine Technology Society Journal**, 39(1), 42-55, 2005.

CUNHA, D. B.; RODRIGUES-FILHO, L. F. S. & SALES, J. B. L. A review of the Mitogenomic Phylogeny of the Chondrichthyes. **Chondrichthyes - Multidisciplinary Approach**, INTECH. Chapter 6. 113-126, 2017.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, 9, 772. 2012.

EBACH, M. C. & HOLDREGE, C. More Taxonomy, Not DNA barcoding. **BioScience**, 55, 1-10, 2005.

FEITOSA, L. M.; MARTINS, A. P. B.; GIARRIZZO, T.; MACEDO, W.; MONTEIRO, I. L.; GEMAQUE, R.; NUNES, J. L. S.; GOMES, F.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; SOUZA, R.; SALES, J. B.; RODRIGUES-FILHO, L. F.; TCHAICKA, L. & CARVALHO-COSTA, L. F. DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific Reports**, 8:1-11, 2018.

FELDHEIM, K.A.; CHAPMAN, D.D.; SIMPFENDORFER, C.A.; RICHARDS, V.P.; SHIVJI, M.S.; WILEY, T.R.; POULAKIS, G.R.; CARLSON, J.K.; ENG, R. & SAGARESE, S. Genetic tools to support the conservation of the endangered smalltooth sawfish, *Pristis pectinata*. **Conservation Genetics Resources**, 2, 105–113. 302, 2010.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791, 1985.

FIGUEIREDO, J.L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil: I. Introdução. Cações, raias e quimeras.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1977. 104 p.

FRANCO, B. A. **Identificação das raias-viola *Rhinobatus horkelli*, *Rhinobatus percellens* e *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes, Rhinobatidae) a costa central e sul do Brasil utilizando marcadores moleculares.** 2010. Tese de doutorado. Botucatu Obispo: Universidade Estadual Julio de Paulista, UNESP, São Paulo, 2010. 62 p.

GADIG, O. **Tubarões da Costa Brasileira.** 2001. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, São Paulo, 2001. 377 p.

GARCIA, V. B.; LUCIFORA, L. O. & MYERS, R. A. The importance of habitat and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimaeras. **Proceedings of the Royal Society B**, 275, 83–89, 2008.

GEMAQUE, R.; MONTEIRO, I. L. P.; GOMES, F.; SODRÉ, D.; SAMPAIO, I.; SALES, J. B.L. & RODRIGUES-FILHO, L. F. S. Why implement measures to conserve the diversity of Elasmobranchs? The case of the northern coast of Brazil: Conservation of Elasmobranchs off the northern coast of Brazil. **Revista da Biologia**, v. 17(2):1-7, 2017.

GUIDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDJIK, W. & GASCUEL, O. “New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0”. **Systematic Biology**, 59 (3), 307, 2010.

HAJIBABAEI, M. *et al.* **DNA barcoding:** how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. v.23, n.4, 2007.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment edit and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98, 1999.

HAMLETT, W.C. **Sharks, skates and rays:** the biology of elasmobranch fishes. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press, 1999.

HEBERT, P. D. N & GREGORY, T. R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54(5):852–859, 2005.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. Biological identification through DNA barcodes. Proceedinh of the Royal Society of London, Series B. **Biological Sciences**, 270: 313-321, 2003.

HEUPEL, M. R.; SIMPFENDORFER, C. A. & FITZPATRICK, R. Large-scale movement and reef fidelity of grey reef sharks. **PloS one**, 5(3), e9650, 2010.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120, 1980.

KNIP, D. M.; HEUPEL, M. R. & SIMPFENDORFER, C. A. Evaluating marine protected areas for the conservation of tropical coastal sharks. **Biological Conservation**, 148(1), 722- 733, 2012.

LACK, M & SANT, G. **World Shark Catch, Production and Trade 1990-2003**. paper to the Technical Workshop on the Conservation and Management of Sharks, Intersessional SharkWorking Group of the CITES Animals Committee. Australian Department of the Environment and Heritage and TRAFFIC Oceania, 2006.

LAGO, F. C.; VIEITES, J. M. & ESPINEIRA, M. Development of a FINS-based method for the identification of skates species of commercial interest. **Food Control**, 24(1), 38-43, 2012.

LAST, P. R., NAYLOR, G. J. P., MANJAJI-MATSUMOTO, M. A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. **Zootaxa**, 4139(3), 345-368, 2016.

LESSA, R.P.T. Levantamento faunístico dos elasmobrânquios (Piscis, Chondrichthyes) do litoral ocidental do Estado do Maranhão. **Bol. Lab. Hidrobiol**, 7: 27-41, 1986.

MARKO, P. B.; LEE, S. C.; RICE, A. M.; GRAMLING, J. M.; FITZHENRY, T. M.; MCALISTER, J. S., *et al.* Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. **Nature**, 430 (6997), 309-310, 2004.

MARTINS, R. R. **Avaliação da sustentabilidade dos elasmobrânquios demersais à pesca de arrasto de camarão no Litoral Norte do Estado de Santa Catarina**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2007. 80 p.

MYERS, R. A.; BAUM, J. K.; SHEPHERD, T. D.; POWERS S. P. & PETERSON, C. H. Cascading Effects Of The Loss Of Apex Predatory Sharks From A Coastal Ocean. **Science**, 315:1846-1850, 2007.

MCEACHRAN, J. D. & CARVALHO, M. R. Batoid Fishes. *In*: Carpenter, K. E. The living marine resources of the western Central Atlantic. Introduction, mollusk's, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras. FAO Species Identification Guide for Fisheries **Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, Special Publication, 5: 508-530, 2002.

MENEZES, N.A.; BUCKUP, P.A. ; FIGUEIREDO, J. L. & MOURA, R. L. **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2003.

MENDONÇA, F. F. **Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial**. 2010. Tese de doutorado. Botucatu Obispo: Universidade Estadual Julio de Paula, UNESP. São Paulo, 2010. 162 p.

NELSON, J.S. **Fishes of the World. Third Edition**. John Wiley & Sons Inc. 1994. 600p.

NUNES, J. L. S.; ALMEIDA, Z. S. & PIORSKI, N. M. Raias Capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil. **Arquivo Científico Marinhos de Fortaleza**, 38:49-54, 2005.

PALMEIRA, C. A. M., RODRIGUES-FILHO, L. F. S., SALES, J. B. L., VALLINOTO, M., SCHNEIDER, H., & SAMPAIO, I. 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.

PINHAL, D., SHIVJI, M.S., VALLINOTO, M., CHAPMAN, D.D., GADIG, O.B.F., MARTINS, C. Cryptic hammerhead shark lineage occurrence in the Western South Atlantic revealed by DNA analysis. **Marine Biology**, 159, 829-836, 2012.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A. J. **Tracer v.1.5**. 2009. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner> . Acesso em: 17 mai., 2018.

RICHARDS, V.P.; HENNING, M.; WITZEL, W. & SHIVJI, M. Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (*Aetobatus narinari*). **Journal of Heredity**, 100: 273-283, 2009.

ROBBINS, W. D.; HISANO, M.; CONNOLLY, S. R. & CHOAT, J. H. Ongoing collapse of coral-reef shark populations. **Current Biology**, 16(23), 2314-2319, 2006.

RODRIGUES-FILHO, L. F. S.; ROCHA, T. C.; RÊGO, P. S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. & VALLINOTO, M. Identification and phylogenetic inferences on stocks of sharks affected by the fishing industry off the Northern coast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 32(2):405-413, 2009.

RODRIGUES-FILHO, L. F. S. & SALES, J. B. L. Introductory Chapter: The Elasmobranchs as a Fishery Resource. **Chondrichthyes - Multidisciplinary Approach**. INTECH. Chapter 1. p. 3-14, 2017.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A. & HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large modelspace. **Systematic Biology**, 22, 539-542, 2012.

ROSA, R. S. & GADIG, O. B. F. Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. **Arquivos de Zoologia: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 45 (esp.):89-104, 2014.

RUOCCO, N.L.; LUCIFORA, L.O.; DÍAZ de ASTARLOA, J.M.; MABRAGAÑA, E. & DELPIANI, S.M. Morphology and DNA barcoding reveal a new species of eagle ray from the southwestern Atlantic: *Myliobatis ridens* sp. nov. (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Myliobatidae). **Zoological Studies**, 51 (6), 862–873, (2012).

SILVA, T.F.S. **Aplicação do Sistema de Código de Barras de DNA para avaliar a biodiversidade amazônica: uma análise com peixes da ordem Gymnotiformes**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, Campus Bragança, Bragança, 2013. 37p.

SILVEIRA, L. S. **Filogenia mitonuclear do gênero *Gymnura* Van Hasselt, 1823 revela especiação críptica no Atlântico Sul Ocidental**. 2017. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 2017. 53 p.

SZPILMAN, M. **Tubarões no Brasil: guia prático de identificação**. Rio de Janeiro: Aqualittera e Manual Editora, 2004.160 p.

TAANMAN, J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and Replication. **Biochemical Biophys Acta**, 1410: 103-123, 1999.

TAMURA, K.;PETERSON, D.;PETERSON, N.;STECHE, G.;NEI, M & KUMAR, S. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Molecular Biology and Evolution, 2011.

TAVARES, W.; RODRIGUES-FILHO, L.F.S.; SODRÉ, D.; SOUZA, R. F. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; VALLINOTO, M. Multiple substitutions and reduced genetic variability in sharks. **Biochemical Systematics and Ecology**, 49. 21-29, 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Research**, 24: 4876-4882, 1997.

TOMÁS, A. R. G.; GOMES, U. L. & FERREIRA, B. P. Distribuição temporal dos elasmobrânquios na pesca de pequena escala de barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Bol.Inst. Pesca**, São Paulo. v. 36(4):317 – 324, 2010.

VOOREN, C.V. e KLIPPEL, S. (eds.). **Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil**. Porto Alegre: Igaré, 2005. 262 p.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R. & HEBERT, P.D. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological Sciences*, 360: 1847-1857, 2005.

WARD, R. D.; HOLMES, B. H.; WHITE, W. T. & LAST, P. R. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. **Marine & Freshwater Research**, 59, 57–71, 2008.

WIEGAND, J.; HUNTER, E. & DULVY, N. K. Are spatial closures better than size limits for halting the decline of the North Sea thornback ray, *Raja clavata*?. **Marine and Freshwater Research**, 62, 2011.

WHITE, W.T. A revised generic arrangement for the eagle ray family Myliobatidae, with definitions for the valid genera. **Zootaxa**, 3860 (2), 149–166, 2014.

WHITE, W.T.; FURUMITSU, K. & YAMAGUCHI, A. A new species of eagle ray *Aetobatus narutobiei* from the Northwest Pacific: an example of the critical role taxonomy plays in fisheries and ecological sciences. **PLOS One**, 8 (12), 1–11, 2013.

WHITE, W.T. & MOORE, A.B.M. Redescription of *Aetobatus flagellum* (Bloch & Schneider), an endangered eagle ray (Myliobatoidea: Myliobatidae) from the Indo–West Pacific. **Zootaxa**, 3752 (1), 199–213, 2013.

WHITE, T. W. & G. J. P. NAYLOR. Resurrection of the family Aetobatidae (Myliobatiformes) for the pelagic eagle rays, genus *Aetobatus*. **Zootaxa**, 4139 (3): 435–438, 2016.

WHITE, W. T.; LAST, P. R.; NAYLOR, G. J. P.; JENSEN, K. & CAIRA, J.N. Clarification of *Aetobatus ocellatus* (Kuhl, 1823) as a valid species, and a comparison with *Aetobatus narinari* (Euphrasen, 1790) (Rajiformes: Myliobatidae). *In*: Last, P.R., White, W.T. & Pogonoski, J.J. (Eds.), **Descriptions of new sharks and rays from Borneo**. CSIRO Marine and Atm. 2010.