



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANDRÉIA DOS SANTOS CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CAÇÕES-FRANGO (*Rhizoprionodon*)
CAPTURADOS POR UMA PESCA ARTESANAL DE PERNAMBUCO**

FORTALEZA-CE

2019

ANDRÉIA DOS SANTOS CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CAÇÕES-FRANGO (*Rhizoprionodon*)
CAPTURADOS POR UMA PESCA ARTESANAL DE PERNAMBUCO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Vicente Vieira Faria
Coorientador: Dr. João Eduardo Pereira de Freitas

FORTALEZA-CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C21i Campos, Andréia dos Santos.
Identificação molecular de cações-frango (*Rhizoprionodon*) capturados por uma pesca artesanal de Pernambuco / Andréia dos Santos Campos. – 2019.
26 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Vicente Vieira Faria.
Coorientação: Prof. Dr. Dr. João Eduardo Pereira de Freitas.
1. Elasmobranchii. 2. Carcharhinidae. 3. DNA mitocondrial. 4. filogenética. I. Título.
- CDD 570
-

ANDRÉIA DOS SANTOS CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CAÇÕES-FRANGO (*Rhizoprionodon*)
CAPTURADOS POR UMA PESCA ARTESANAL DE PERNAMBUCO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Vicente Vieira Faria (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. João Eduardo Pereira de Freitas (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Yan Torres Timbó Pinto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Vicente Vieira Faria, pela oportunidade de pesquisarmos juntos sobre tubarões e genética. Agradeço pela orientação nesse e em diversos trabalhos realizados na graduação, pela paciência e pelos ensinamentos diários.

Ao Dr. João Eduardo Pereira de Freitas, por ser acessível em todos os momentos e por sempre me dar conselhos valiosos que foram de grande ajuda na minha vida acadêmica. Agradeço-lhe por todos os ensinamentos tanto nas atividades de bancada no laboratório de biologia molecular, quanto nas análises de dados.

Ao Dr. Rodrigo Maggioni e ao Me. Yan Torres, por terem aceitado o convite de participar como membros da banca examinadora deste trabalho.

À Dra. Patricia do Nascimento Bordallo, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindustrial Tropical para a realização da parte experimental do presente estudo.

Ao Dr. Kaio Lopes de Lima (UEMA) e a Dra. Rosângela Paula Teixeira Lessa (UFRPE), por compartilharem parte das amostras de tecido de tubarões que foram utilizadas na presente pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Evolução e Conservação de Vertebrados Marinhos - Evolve, por todo apoio, incentivo e companheirismo. Em especial, agradeço à bióloga e mestrandia Lilian Glória Xavier de Souza, por todos os ensinamentos e estímulos para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Alberto Campos e Vânia Campos por todos os desafios que vocês enfrentaram para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade. Agradeço também às minhas irmãs, Ana Campos e Adriana Campos, por serem tão pacientes comigo.

À minha tia Vângela dos Santos e minha prima Jacquelyne dos Santos, por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao Lucas Araújo, por me encorajar em mais um ano de graduação e por não me deixar desistir dos meus sonhos, sempre estando do meu lado nos momentos mais difíceis.

Às amigas Bianca Vasconcelos, Caroliny Soares, Gabriela Valentim, Jennifer Bruna e Renata Carvalho, por toda a paciência comigo e por termos vivido juntas esse desafio que é sobreviver à universidade.

Às amigas de ensino médio Brenda Barros, Lara Tabosa, Mariana Azevedo, Mariana Machado, Natália Diniz e Nayara Sales, por estarem tão presentes nesse momento e durante todos esses anos de amizade.

A autora possuiu bolsa PIBIC – UFC, sendo grata a manutenção da mesma no período de dois anos e meio.

Parte dos recursos utilizados nesta pesquisa foram provenientes da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Ministério da Educação.

RESUMO

Os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* que ocorrem no Brasil, *Rhizoprionodon porosus* e *Rhizoprionodon lalandii*, são espécie bastante capturadas pela pesca artesanal. Estas também são simpátricas e morfologicamente semelhantes, o que dificulta a sua correta identificação. Um trabalho realizado em Pernambuco sobre distribuição temporal de elasmobrânquios (capturados pela pesca de emalhe de fundo) obteve dados de 113 espécimes que foram identificados como *R. porosus*. Um modo de conferir a correta identidade de diversos seres vivos atualmente é pela identificação molecular, através do uso de marcadores moleculares. Um dos marcadores utilizados para identificação de tubarões e raias é o sequenciamento do gene mitocondrial NADH-2. Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi o de identificar molecularmente indivíduos dessa pescaria para confirmar ou não sua identidade. Para isso, duas amostras vindas de Pernambuco foram obtidas de tecido muscular e cartilaginoso e mais cinco utilizadas como sequencias comparativas do Nordeste (quatro do Ceará e uma do Maranhão). Estas foram amplificadas via PCR e sequenciadas para o gene NADH-2, obtendo-se sequências de 1.045 pb. As sequências obtidas foram editadas usando-se o software Geneious e checadas utilizando o algoritmo BLAST. Para a caracterização das sequências utilizou-se o software MEGA, sendo possível visualizar cinco haplótipos presentes nessas sequências com sete sítios polimórficos. Três tipos de substituições de bases e duas modificações de aminoácidos forma confirmadas durante a caracterização. Os resultados do BLAST foram maiores que 99% de similaridade com *R. porosus* já depositado no GenBank, confirmando a identificação das duas amostras de Pernambuco. Em uma análise filogenética baseada no método Neighbor-Joining (NJ), *R. porosus* apresentou maior similaridade com *R. terraenovae*, pois ambos são considerados espécies irmãs e são extremamente semelhantes, com exceção do número de vértebras, permanecendo mais longe de *R. lalandii*. As duas amostras são suficientes para sustentar as identificações morfológicas já realizadas, visto que os mesmos parâmetros de identificação foram aplicados para todos os exemplares.

Palavras-chave: Elasmobranchii; Carcharhinidae; DNA mitocondrial; filogenética.

ABSTRACT

The sharks of the genus *Rhizoprionodon* that occur in Brazil, *Rhizoprionodon porosus* and *Rhizoprionodon lalandii*, are species very caught by artisanal fishing. These are also sympatric and morphologically similar, which makes their correct identification difficult. A study carried out in Pernambuco on temporal distribution of elasmobranchs (caught by bottom-set gillnets) obtained data from 113 specimens that were identified as *R. porosus*. One way to check the correct identity of many living beings today is by molecular identification, through the use of molecular markers. One of the markers used for identification of sharks and rays is the sequencing of the mitochondrial NADH-2 gene. Within this context, the objective of the present study was to molecularly identify individuals from this fishery to confirm or not their identity. For this, two samples from Pernambuco were obtained from muscle and cartilaginous tissue and five more used as comparative sequences from the Northeast (four from Ceará and one from Maranhão). These were amplified via PCR and sequenced for the NADH-2 gene, yielding 1.045 bp sequences. The sequences obtained were edited using the Geneious software and checked using the BLAST algorithm. For the characterization of the sequences, the MEGA software was used, and it was possible to visualize five haplotypes present in these sequences with seven polymorphic sites. Three types of base substitutions and two amino acid modifications were confirmed during characterization. BLAST results were greater than 99% similarity with *R. porosus* already deposited in GenBank, confirming the identification of the two Pernambuco samples. In a phylogenetic analysis based on the Neighbor-Joining (NJ) method, *R. porosus* showed greater similarity with *R. terraenovae*, as both are considered sister species and are extremely similar, except for the number of vertebrae, remaining farther from *R. lalandii*. Both samples are sufficient to support the morphological identifications already made, since the same identification parameters were applied to all specimens.

Keywords: Elasmobranchii; Carcharhinidae; mitochondrial DNA; phylogenetic .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. METODOLOGIA.....	11
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

Os tubarões do gênero *Rhizoprionodon* (Carcharhinidae) são representados por sete espécies que se distribuem nas regiões costeiras dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (SPRINGER, 1964). As espécies desse gênero se diferenciam de outros da família Carcharhinidae através da presença de sulcos labiais bem desenvolvidos posicionados nos cantos da boca e pela presença de cristas pré-anais visíveis em adultos (GADIG, 2001).

Outras características gerais do gênero incluem tamanho corporal de pequeno ou médio porte (chegando no máximo a 150 cm de comprimento total, CT), alimentação baseada em moluscos, crustáceos e pequenos peixes e o fato de conseguirem habitar águas costeiras, estuarinas e salobras (COMPAGNO, 1984).

Três espécies se distribuem na costa do oceano Atlântico oeste: *Rhizoprionodon terraenovae* (Richardson, 1836), *R. porosus* (Poey, 1861) e *R. lalandii* (Müller & Henle, 1839), as duas últimas estão presentes na costa brasileira. *R. lalandii* se distribui desde o Panamá até o sul do Brasil ao passo que *R. porosus* se distribui do Mar do Caribe até a Argentina (COMPAGNO, DANDO & FOWLER, 2005). Dessa forma, nota-se que estas possuem distribuição simpátrica ao longo da costa do Brasil.

Embora sejam espécies distintas, as diferenças morfológicas entre *R. lalandii* e *R. porosus* são sutis (GADIG, 2001), o que pode levar a erros na sua identificação. Esse fato é agravado por distribuição simpátrica destas espécies. Isto é preocupante visto que uma correta identificação é um ponto importante para a formulação de uma adequada metodologia de gestão e conservação de diversas espécies (SHIVJI *et al.*, 2002), sendo poucos os dados sobre essas espécies na IUNC, em que *R. porosus* é considerado pouco preocupante e *R. lalandii* é deficientes de dados.

As chaves de identificação de elasmobrânquios são utilizadas de modo a tentar identificar morfológicamente esses animais em locais de desembarque e em laboratório. Algumas características utilizadas são de comparação da morfologia entre *R. porosus* e *R. lalandii* que ocorrem no Brasil, desse modo, sendo necessário o conhecimento de ambas para confirmar qual a espécie pertence o indivíduo coletado (APÊNDICE A).

Quando a identificação morfológica não é bem definida ou apresenta incertezas, são utilizados, como potenciais estratégias, técnicas de identificação molecular (MENDONÇA *et al.*, 2010). Esse tipo de identificação também pode ser utilizado para

sustentar as identificações realizadas através da morfologia de diversos seres vivos (FEITOSA *et al*, 2018).

Estudos com *R. porosus* e *R. lalandii*, já foram realizados para atender as mais variadas problemáticas relacionadas a identificação desses tubarões (WONG, SHIVJI & HANNER, 2009; PINHAL, GADIG & MARTINS, 2009; MENDONÇA *et al*, 2011c; PINHAL *et al.*, 2012; NAYLOR *et al.*, 2012; PINHAL *et al.*, 2012; FERRETE *et al.*, 2019). Outros aspectos também já foram verificados utilizando evidências moleculares desses peixes, como delimitação geográfica (MENDONÇA *et al*, 2011a) e genética populacional (MENDONÇA *et al*, 2011b ; MENDONÇA, GADIG & FORESTI, 2013), utilizando-se das mais variadas estruturas do DNA, como o citocromo oxidase I (COI) e o displacement loop (D-loop).

Para se obter o resultados de separação entre espécies que conferindo a correta identificação dos espécimes, as estratégias moleculares exigem a necessidade de se utilizar um ou mais genes. Com relação à identificação de tubarões, o marcador molecular NADH desidrogenase subunidade 2 (gene mitocondrial conhecido como NADH-2 ou ND2), já foi utilizado em trabalho realizado por Naylor e colaboradores (2012). Este é um gene codificador que tem como característica uma rápida evolução, acaba por fornecer uma separação entre espécies próximas (NAYLOR *et al*, 2012) sendo um dos componente da membrana interna mitocondrial e tem sua função relacionada a cadeia respiratória, transferindo elétrons para a ubiquinona (NELSON, 2014). Os genes mitocondriais têm uma boa resolução para caracterizações em nível de espécies (HERBET *et al.*, 2003), permitindo assim a devida identificação dos espécimes.

Coletas de dados de espécimes do gênero *Rhizoprionodon*, foram realizadas ao largo de Pernambuco, em que todos os indivíduos foram identificados morfologicamente como sendo pertencentes à espécie de *Rhizoprionodon porosus*.

Desse modo, para confirmar a identidade desses espécimes é necessário que haja uma contribuição de dados de identificação molecular, que possam indicar que os resultados de identificação morfológica obtido, foram corretos ou não. Assim, o atual estudo teve como objetivo identificar molecularmente alguns exemplares capturados nessa pescaria de Pernambuco.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta das amostras e atividades laboratoriais

Duas amostras de cações *Rhizoprionodon* capturados em Pernambuco utilizadas no presente estudo foram coletadas através de uma pesquisa já realizada pelo Dr. Kaio Lopes de Lima e a Dra. Rosângela Paula Teixeira Lessa da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que tem o intuito de saber a distribuição temporal de elasmobrânquios no estado. Os espécimes foram registrados em pontos de desembarque de peixes, capturados pela pesca de emalhe de fundo. Essa pesca foi realizada entre 2010 - 2015, registrando a ocorrência de 113 espécimes pertencentes ao gênero *Rhizoprionodon* fazendo parte da tese intitulada “Distribuição temporal, vulnerabilidade e uso de habitats de duas espécies de tubarão Carcharhiniformes na costa de Pernambuco” defendida ainda no ano de 2019 (LIMA, 2019).

As amostras foram retiradas de tecidos cartilaginoso próximos ao condocrânio dos tubarões e que foram preservadas em etanol a 96%. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Evolução e Conservação de Vertebrados Marinhos (EvoVe), localizado no Departamento de Biologia - Bloco 909 na Universidade Federal do Ceará, para verificar a identidade dos espécimes através do sequenciamento de DNA. Todos os 113 espécimes da pesquisa foram identificados, por Lima (2019), através da sua morfologia, por chaves de identificação, como sendo pertencentes à espécie de *Rhizoprionodon porosus*.

Amostras comparativas coletadas em outros dois estados da região Nordeste foram obtidas e sequenciadas. Todas foram coletadas pela pesca artesanal da sua localidade com um total de quatro amostras de tecido muscular do Ceará (CE19, CE34, CE68 e CE85) e uma do Maranhão (MA01). A amostra do Maranhão, foi enviada junto com as amostras de Pernambuco, sendo também de tecido cartilaginoso retirado próximo ao condocrânio e as do Ceará já estavam depositadas no banco de tecidos do Laboratório EvoVe, que são amostras retiradas do tecido muscular, de espécimes de desembarque do Porto do Mucuripe, Fortaleza-CE. Todos esses espécimes do Ceará e Maranhão foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizoprionodon*.

Todas as amostras foram levadas a EMBRAPA, local no qual foi realizado as etapas laboratoriais, da extração do DNA até a obtenção da imagem das bandas de DNA em gel de agarose na Eletroforese. A extração de DNA total foi realizada utilizando o

DNeasy Blood & Tissue Kit, seguindo as instruções do fabricante (QIAGEN Inc, Valencia, CA, EUA). Após a extração, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 2000 para avaliar a qualidade do DNA extraído das amostras.

Posteriormente, as extrações do DNA das amostras passaram para a etapa de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 2. Os primers utilizados para as reações da PCR foram: IlemMustelus 5' AAGGACCACTTTGATAGAGT 3' e Asn-Mustelus 5' AACGCTTAGCTGTTAATTAA 3' (NAYLOR *et al*, 2012), utilizando um volume total de 25 µl, contendo 50 ng DNA, 1XAmpliTaq Gold 360 Master Mix e 0,5 µM *primers*. Os ciclos da PCR foram realizados no Termociclador Veriti e seguiram esta ordem, separada por estágios:

- Estágio 1: Desnaturação inicial de 94 ° C por 2 minutos;
- Estágio 2: 39 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 30 segundos, anelamento dos primers a 48 ° C por 30 segundos e extensão a 72 ° C por 90 segundos;
- Estágio 3: com extensão final 72 ° C por 7 minutos.

Os resultados da amplificação dos produtos da PCR foram verificados através de eletroforese, utilizando o Gel de Agarose a 1,3%. Para a composição desse gel, foi utilizado um composto tampão TBE (Tris-borato) e o material foi corado com brometo de etídio. Para a calibração dos resultados da eletroforese, foi utilizado um marcador de peso molecular com um total de 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs). O gel foi fotografado, visualizado por um transiluminador UV (Loccus, Cotia, São Paulo), para que fosse possível visualizar a intensidade das bandas e realizar as etapas subseqüentes de purificação dos produtos, utilizando o purificador da ExoSAP-IT, seguindo todas as instruções do fabricante.

Após essas etapas, os produtos dessa PCR foram enviados a Seul, na Coréia do Sul, para serem sequenciados através da técnica de Sanger pela empresa MacroGen Inc. Junto a esses produtos também foram enviados os iniciadores direto e reverso, já descritos anteriormente, com a adição do primer interno ND2-batoids-IFA 5' CACTTYTGACTWCCAGAAGT -3' (NAYLOR *et al*. 2012).

2.2 Análise de Dados

As sequências obtidas foram editadas através do software Geneious 7.1.5 e alinhadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), utilizando o ClustalW. Neste último, foi realizado a caracterização do gene NADH desidrogenase 2, com o intuito de visualizar a quantidade de haplótipos e seus sítios polimórficos, as modificações de bases do DNA e se as mutações são ou não silenciosas. Estudos realizados de acordo com esses resultados foram feitos para caracterizar os tipos substituições de base que ocorreram ao longo do gene.

Para a identificação molecular dos espécimes sequenciados, suas sequências foram submetidas a análises pelo algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Essa análise possibilita visualizar o percentual de similaridade da sequência pesquisada com as sequências já depositadas no banco de dados de sequências do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Por fim, foi realizado no software Geneious uma análise filogenética baseada no método de Neighbor-Joining (NJ) e Tamura-Nei como modelo de distância genética, utilizando bootstrap de 1,000. Além das sequências obtidas no presente estudo, as análises foram realizadas incluindo dois grupos de sequências obtidas no GenBank: (1) sequências referência: *R. lalandii* (JQ518646), *R. porosus* (JQ518648) e *R. terraenovae* (JQ5118651) e (2) grupo externo: *Carcharhinus acronotus* (JQ518620.1), *Carcharhinus leiodon* (JQ400110.1), *Carcharhinus leucas* (JQ518623.1), *Carcharhinus plumbeus* (JQ518632.1), *Carcharhinus porosus* (JQ518614.1).

3. RESULTADOS

No total foram obtidas sete sequências resultantes das capturas realizadas no Nordeste, compostas por espécimes do gênero *Rhizoprionodon*, duas coletadas em Pernambuco (PE03 e PE04), quatro no Ceará (CE19, CE34, CE68 e CE85) e uma no Maranhão (MA01). Desse sequenciamento, foi possível obter a sequência completa do gene ND2 total, com 1.044 pb, sendo possível realizar as etapas de caracterização desse gene e obter a identidade desses espécimes.

A proporção entre as bases nitrogenadas das sequências geradas se mostrou muito estável (TABELA 1). O número de adeninas variou de 31,6% a 31,8% do total de bases, já a timina foi contabilizada em 37,3% do total do gene e em apenas uma sequência (CE19) esta base teve um percentual de 27,4%. Houve variação de 32% a 32,2% do total de citosina encontradas e por fim, o percentual de bases de guanina nas sequências quase não variou, sendo que apenas uma (PE03) obteve 8,81% de guaninas, enquanto que as demais obtiveram 8,9% bases.

Tabela 1: Percentual do número de bases de adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), que foram contabilizadas ao longo das sequências obtidas no presente estudo.

Espécimes	Quantidade de Bases			
	A	T	C	G
CE19	31,70%	27,40%	32,00%	8,90%
CE34	31,70%	27,30%	32,10%	8,90%
CE68	31,70%	27,30%	32,10%	8,90%
CE85	31,70%	27,30%	32,10%	8,90%
MA01	31,60%	27,30%	32,20%	8,90%
PE03	31,80%	27,30%	32,09%	8,81%
PE04	31,70%	27,30%	32,10%	8,90%

Ainda quanto à caracterização do gene NADH desidrogenase 2, foram encontrados cinco haplótipos, com a presença de sete sítios polimórficos nas sequências estudadas (TABELA 2). O haplótipo H2 foi o mais comum, pois esteve representado em três das sete sequências obtidas (em 42,8% dos tubarões), duas sequências do Ceará (CE34 e CE68) e uma de Pernambuco (PE04).

Já nos haplótipos H1, H3, H4 e H5, foram menos frequentes, encontrados em apenas uma sequência cada, correspondendo a 14,3% dos tubarões. O haplótipo H1 é representando por uma sequência do Ceará (CE19), bem como o H3 (CE85). Já o haplótipo H4 é referente à única sequência do Maranhão (MA01) e o H5 da segunda sequência de Pernambuco (PE03).

Tabela 2: Posições de nucleotídeos polimórficos para haplótipos das sete sequências do gene NADH-2 (mtDNA) obtidas de *Rhizoprionodon porosus* capturados pela pesca artesanal ao largo da região Nordeste do Brasil.

Haplótipos	Posições dos Nucleotídeos						
	147	183	527	723	742	798	1039
H1	T	T	G	T	T	C	A
H2	C	.	.
H3	.	C	.	.	C	T	.
H4	C	.	.	C	.	.	T
H5	.	C	A	.	C	.	.

O haplótipo H4, chama atenção pelo fato de apresentar três modificações de bases dentre os sete sítios polimórficos (nas posições 147, 723 e 1039) sendo exclusivas da sequência pertencente ao Maranhão.

Ao todo, foram encontradas três tipos de substituições de bases, nesses sete sítios polimórficos, as modificações do tipo: citosina/timina, adenina/guanina e adenina/timina (TABELA 3), em que as duas primeiras são substituições do tipo transição e a última do tipo transversão (NELSON, 2014). Na substituição do tipo citosina/timina, houve uma modificação na primeira posição do códon (posição 742) e outras quatro encontradas na terceira posição do códon (posições 147, 183 e 723), sendo todas silenciosas. Na substituição adenina/guanina (posição 527), houve modificação não silenciosa na segunda posição do códon, modificando aminoácidos do tipo arginina/glutamina. Por fim, na substituição do tipo adenina/timina (posição 1039), houve modificação não silenciosa no 1º códon que gerou a modificação de aminoácidos do tipo treonina/serina (APÊNDICE B).

Tabela 4: Caracterização das sequências do gene NADH-2 quanto às modificações de bases e de aminoácidos.

Tipos de substituições de bases	Posições do Códon	Tipos de Mutações	Tipo de modificação do aminoácido
Citosina / Timina (transição)	Primeira (1) Terceira (4)	Silenciosa	-
Adenina / Guanina (transição)	Segunda (1)	Não Silenciosa	Arginina / Glutamina
Adenina / Timina (transversão)	Primeira (1)	Não Silenciosa	Treonina / Serina

Com relação à confirmação de identidade das amostras, através da análise realizada no BLAST, foi possível obter os percentuais de similaridades com as amostras já depositadas no Genbank (TABELA 5). A análise indicou que existe similaridade com a espécie *Rhizoprionodon porosus* (99,5 – 99,9% de similaridade). Também foi possível visualizar a proximidade com sequências de outras espécies depositadas, como o *R. terraenovae* (valores acima de 98% de similaridade) e o *R. lalandii* (valores acima de 95% de similaridade).

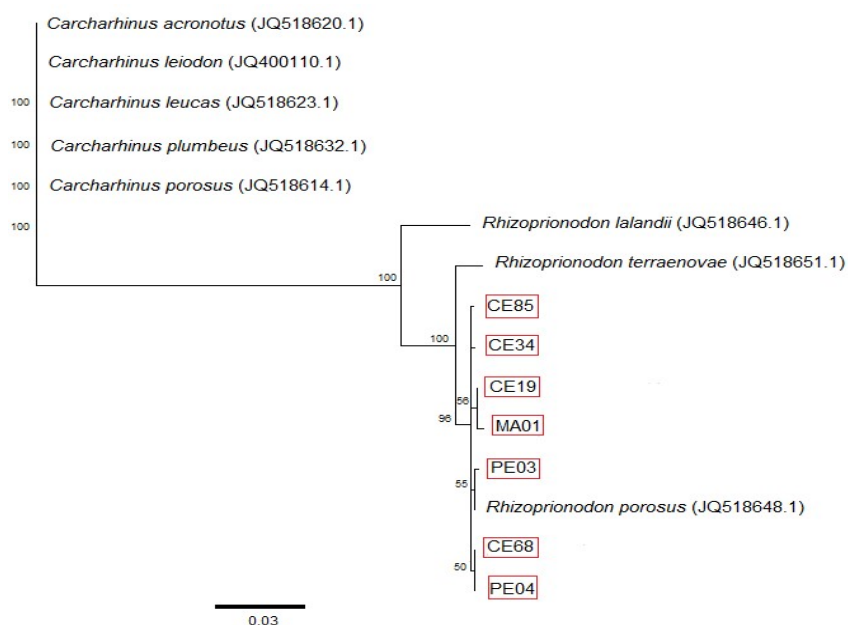
Tabela 5: Resultado do percentual de similaridade das amostras do presente estudo com as de *Rhizoprionodon porosus* já depositadas no GenBank, através da análise BLAST.

Amostras	Percentual de similaridade das sequencias em análise BLAST		
	<i>Rhizoprionodon porosus</i>	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>
PE03	99,90%	98,47%	95,59%
PE04	99,90%	98,47%	95,40%

CE19	99,81%	98,37%	95,49%
CE34	99,90%	98,47%	95,59%
CE68	99,90%	98,47%	95,59%
CE85	99,90%	98,66%	95,59%
MA01	99,52%	98,28%	95,40%

O resultado obtido no BLAST corrobora com os resultados da análise filogenética, indicando desse modo a identificação dos espécimes. As duas amostras de Pernambuco se posicionaram agrupados à sequência referência de *Rhizoprionodon porosus* (JQ518648) do GenBank, assim como as sequências comparativas do Ceará e Maranhão, confirmando que todos os espécimes capturados pertencem a esta espécie. A sequência da espécie *R. terraenovae* (JQ518651) encontra-se mais próxima das de *R. porosus*, ficando a sequência de *R. lalandii* (JQ518646) em uma posição basal.

Figura 1: Análise Filogenética com as sequências obtidas no presente estudo (destacadas) e as demais obtidas no GenBank como os respectivos valores de bootstrap.



4. DISCUSSÃO

Foram poucas as divergências de bases presentes em cada uma das sequências e consequentemente, foram poucos os sítios polimórficos encontrados ao longo dos 1.044 pb obtidos. A maioria das substituições encontradas foi do tipo transição, sendo a maioria vista na posição do terceiro códon, essa caracterização já foi indicada por Naylor e colaboradores (2012) e constatadas no presente estudo.

Uma das duas modificações de bases encontradas foi a do tipo treonina / serina. Esses dois aminoácidos fazem parte do mesmo grupo (R polares, não carregados), e contêm suas funções relacionadas, a treonina é capaz de regular as proporções de serina produzidas (NELSON, 2014). Já a arginina/glutamina são de grupos diferentes, a arginina sendo caracterizada como um aminoácido básico e a glutamina como ácido.

Desse modo as modificações resultante não chegam a ser tão discrepante, pois em uma delas (treonina/serina) se encontram em aminoácidos que molecularmente tem as mesmas propriedades (APÊNICE B).

Dos haplótipos encontrados, o H4 (representado pela sequencia do Maranhão) obteve três sítios polimórficos exclusivos. Lucena e Lessa (2019), realizaram comparações morfométricas de condocrânios de indivíduos de *R. porosus* (adultos e juvenis) e tiveram como resultado a diferença entre os exemplares coletados na costa Norte e na costa Leste do Nordeste do Brasil. Esse resultado é um indicativo de que existe algum grau de divergência populacional ao largo da região Nordeste, desse modo é interessante avaliar se existem divergências genéticas sólidas através do estudo utilizando mais sequencias desse local em comparação com as demais regiões do Nordeste.

A identidade dos espécimes capturados em Pernambuco e também dos comparativos do Ceará e Maranhão foi confirmada, como pertencentes à espécie de *Rhizoprionodon porosus*. O percentual de similaridade obtido no BLAST (maior que 99%), já foi utilizado como base para a comprovação de identidade, no nível de espécie, como no trabalho de Falcão e colaboradores (2017). Percentuais de similaridade abaixo do percentual encontrado (até 98%) também já foram aceitos em outros trabalhos de identificação realizados no BLAST (ARMANI *et al*, 2015; MUTTAQIN *et al*, 2019; PAZARTZI *et al*, 2019).

Ainda com relação aos resultados do BLAST, as sequências analisadas obtiveram mais 98% de similaridade com a espécie de *R. terraenovae*. Essa espécie ocorre no Atlântico Norte Ocidental (GADIG, 2001) e é considerada espécie irmão de *R. porosus*. Suas morfologias são idênticas, divergindo apenas na quantidade de vértebras encontradas em cada uma (SPRINGER, 1964; GADIG, 2001) e da sua distribuição geográfica distinta. Desse modo, são espécies geneticamente próximas, sendo natural o resultado obtido, e por isso *R. lalandii* apresentou um percentual de similaridade mais distante de *R. porosus*. Esses resultados de aproximação genética de *R. porosus* com *R. terraenovae* e o distanciamento dessas duas do *R. lalandii* já foi demonstrado em trabalhos como o de Mendonça e colaboradores (2011a).

A árvore filogenética confirma os resultados de similaridade obtidos através da análise realizada no BLAST. As sequências do presente estudo encontram-se agrupadas a sequência de *R. porosus* obtida no GenBank. Ligado a este grupamento está a espécie *R. terraenovae*, seguida de *R. lalandii* e das espécies do grupo externo do gênero *Carcharhinus*.

Os dois espécimes coletados em Pernambuco e identificados através de análise molecular indicam que houve a correta identificação desses espécimes coletados. Desse modo a utilização das chaves de identificação utilizando as características inseridas no Apêndice A, são eficazes para um bom parâmetro de indicação correta em nível de espécies do gênero *Rhizoprionodon* sustentam a identificação morfológica realizada para os outros 113 espécimes. Estudos com esses tubarões, com mais de 100 indivíduos de *Rhizoprionodon porosus* coletados (SILVA & ALMEIDA, 2001; MALAFAIA *et al*, 2018), são publicados apenas com as relações de caracterização morfológica, sem a contribuição da identificação molecular. Dessa forma, apesar do n amostral de apenas dois para Pernambuco, ainda assim os resultados obtidos ajudam a consolidar a identificação morfológica realizada em Pernambuco.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a grande ocorrência de *R. porosus* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, enquanto que *R. lalandii* é mais comum nas regiões Sudeste e Sul do país (GADIG, 2001; BORNATOWSKI & ABILHOA, 2012). Desse modo, é mais provável a captura de *R. porosus* na costa de Pernambuco do que de *R. lalandii*, com encontrado no presente trabalho..

5. CONCLUSÃO

Os exemplares de cação-frango capturados por pesca de emalhe de fundo ao largo de Pernambuco pertencem à espécie *Rhizoprionodon porosus*, confirmando a identificação morfológica previamente realizada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que ocorra a formulação de uma adequada metodologia de gestão e conservação das espécies de tubarões, como as do gênero *Rhizoprionodon*, é necessária a correta identificação dos exemplares capturados pela pesca. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a utilidade de marcadores moleculares como apoio à identificação destas espécies.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215:403-410, 1990.

ARMANI, A.; TINACCI, L.; XIONG, X.; CASTIGLIEGO, L.; GIANFALDONI, D.; GUIDI, A. Fish species identification in canned pet food by BLAST and Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16s ribosomal RNA gene (16S rRNA). **Food control**, 50, 821-830, 2015.

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

COMPAGNO L. J. V. FAO Species Catalogue. **Sharks of the World**. Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes. FAO Fish Synop; 4 (125): 251-655, 1984.

COMPAGNO, L. J. V.; DANDO, M.; FOWLER, S. **Sharks of the world**. Princeton Field Guides, 368 pp. 2005.

FALCÃO, L. H. O., CAMPOS, A. S., FREITAS, J. E. P., FURTADO-NETO, M. A. A.; FARIA, V. V. Molecular identification of cetaceans from the West Atlantic using the E3-I5 region of COI. **Genetics and Molecular Research: GMR**, 16(2), 2017.

FEITOSA, L. M., MARTINS, A. P. B., GIARRIZZO, T., MACEDO, W., MONTEIRO, I. L., GEMAQUE, R.; SOUZA, R. DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific Reports** , 8(1), 3347, 2018.

FERRETTE, B. L. S.; DOMINGUES, R. R.; USSAMI, L. H. F.; MORAIS, L.; MAGALHÃES, C. O.; AORIM, A. F.; MENDONÇA, F. F. DNA-based species identification of shark finning seizures in Southwest Atlantic: implications for wildlife trade surveillance and law enforcement. **Biodiversity and Conservation**, 1-19. 2019.

GADIG, O. B. F. **Tubarões da costa brasileira**. Tese. Instituto de Biociências de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista, 2001.

KUMAR, S.; STCHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; & TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549, 2018.

LIMA K. L., **Distribuição temporal, vulnerabilidade e uso de habitats de duas espécies de tubarão Carcharhiniformes na costa de Pernambuco**. Tese. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.

LUCENA, L. R. R.; LESSA, R. P. T. Shape and cluster analysis for different detector patterns of *Rhizoprionodon porosus* in Northeast coast of Brazil. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(2), 258-271, 2019.

MALAFAIA, P.; MOLINA, A.; MADALOSSO, S.; GROTH, V.; GALENO, S. Caracterização de uma pescaria em um bairro urbano de Salvador, Bahia. *Arquivos de Ciências do Mar*, 51(2), 98-115, 2018.

MENDONÇA, F.F.; OLIVEIRA, C.; BURGESS, G.; COELHO, R., C.; PIERCY, A.; GADIG, O. B, F., FORESTI, F.; Species delimitation in sharpnose sharks (genus *Rhioprionodon*) in the western Atlantic Ocean using mitochondrial DNA. **Conservation Genetics**. 2011. a

MENDONÇA, F.F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O. B, F., FORESTI, F.; Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2011. b

MENDONÇA, F.F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O. B, F., FORESTI, F.; Population analysis of the Brazilian Sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: interferences from mtDNA sequences. **Neotropical Ichthyology**. 2009.

MENDONÇA, F.F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O. B, F., FORESTI, F.; Diversity and

genetic population structure of the Brazilian Sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii*. **Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems**. 2013.

MENDONÇA, F.F.; HASHIMOTO, D. T.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O. B, F., Identification of shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. **Molecular Ecology Resources**, 9(3), 771-773, 2011. c

MUTTAQIN, E.; ABDULLAH, A.; NURILMALA, M.; ICHSAN, M.; SIMONE, B. M.; YULIANTO, I.; BOOTH, H. DNA-barcoding as molecular marker for seafood forensics: Species identification of locally consumed shark fish products in the world's largest shark fishery. **Conference Series: Earth and Environmental Science** (Vol. 278, No. 1, p. 012049), 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. Ed. Poto Alegre: Artmed, 2014.

NAYLOR, G. J. P.; CAIRA, J.; JENSEN, K.; ROSANA, K. A.; WHITE, W.; LAST, P. A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. **Bulletin of The American Museum of Natural History**, v. 367, p. 262, 2012.

PAZARTZI, T.; SIAPERPOULOU, S.; GUBILI, C.; MARADIDOU, S.; LOUKOVITIS, D.; CHATZISPYROU, A.; IMSIRIDOU, A. High levels of mislabeling in shark meat—Investigating patterns of species utilization with DNA barcoding in Greek retailers. **Food control**, 98, 179-186, 2019.

PINHAL, D.; GADIG, O. B.; MARTINS, C. Genetic identification of the sharks *Rhizoprionodon porosus* and *R. lalandii* by PCR-RFLP and nucleotide sequence analyses of 5S rDNA. **Conservation Genetics Resources**, 1(1), 35, 2009.

PINHAL, D.; SHIVJI, M. S.; NACHTIGALL, P. G.; CHAPMAN, D. D.; MARTINS C. A streamlined DNA tool for global identification of heavily exploited coastal shark species (genus *Rhizoprionodon*). **PloS one**, 7(4), e34797, 2012.

SHIVJI, M. S.; CLARKE, S.; PANK, M.; NATANSON, L.; KOHLER, N.; STANHOPE, M. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. **Conserv Biol** 16:1036-1047, 2002.

SILVA, C. M. L.; ALMEIDA, Z. D. S. Alimentação de *Rhizoprionodon porosus* (Elasmobranchii: Carcharhinidae) da costa do Maranhão, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 27(2), 201-207, 2018.

SPRINGER, V.G. A revision of the Carcharhinidae shark genera *Scoliodon*, *Loxodon*, and *Rhizoprionodon*. Proceedings of the United States National Museum, 115 (3493): 559–632, 1964.

WONG, E. H. K.; SHIVJI, M. S.; HANNER, R. H. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. **Molecular Ecology Resources**, 9, 243-156, 2009.

APÊNDICE A

Quadro 1: Características de identificação morfológica das espécies do gênero *Rhizoprionodon* que ocorrem no Brasil, compiladas das mais diversas chaves de identificações de peixes.

Espécies	Características morfológicas	Fontes
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	Sulco labial maior e corpo mais robusto que do <i>R. lalandii</i> ; tamanho máximo de 100 cm CT e médio de 89 cm CT; focinho arredondado; coloração cinza clara ou escura, sem tonalidades metálicas; as vezes apresenta pintas brancas nos flancos; margem posterior da segunda nadadeira dorsal enegrecida; possui nadadeiras peitorais proporcionalmente maiores e quando disposta lateralmente chegam ou passam a vertical da metade da base a 1ª dorsal.	Compagno, Dando e Fowler, 2005; Bornatowski e Abilhoa, 2012; Gadig, 2001.
<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	Sulco labial menor e corpo mais esguio que de <i>R. porosus</i> ; tamanho máximo de 85 cm CT e médio de 58 cm CT; possui dentes pequenos e levemente curvados; focinho afiado; região dorsal escura, com tonalidade metálica; apresenta nadadeiras peitorais mais curtas, que nunca vão atingir a metade da base da 1ª dorsal.	

APÊNDICE B

Substituições do tipo Citosina/Timina:

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
1. Rhizoprionodon_M01MA_ND2	C	C	C	A	C	G	A	G	C	A
2. Rhizoprionodon_M03Ita_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A
3. Rhizoprionodon_M04Ita_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A
4. Rhizoprionodon_FAR19_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A
5. Rhizoprionodon_FAR34_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A
6. Rhizoprionodon_FAR68_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A
7. Rhizoprionodon_FAR85_ND2	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A

Substituições do tipo Adenina/Guanina:

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*
1. Rhizoprionodon_M01MA_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C
2. Rhizoprionodon_M03Ita_ND2	A	A	A	A	A	A	T	C
3. Rhizoprionodon_M04Ita_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C
4. Rhizoprionodon_FAR19_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C
5. Rhizoprionodon_FAR34_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C
6. Rhizoprionodon_FAR68_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C
7. Rhizoprionodon_FAR85_ND2	G	A	A	A	A	A	T	C

Modificações de aminoácidos do tipo Arginina/Glutamina:

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*
1. Rhizoprionodon_M01MA_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S
2. Rhizoprionodon_M03Ita_ND2	Q	K	I	L	A	Y	S	S
3. Rhizoprionodon_M04Ita_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S
4. Rhizoprionodon_FAR19_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S
5. Rhizoprionodon_FAR34_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S
6. Rhizoprionodon_FAR68_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S
7. Rhizoprionodon_FAR85_ND2	R	K	I	L	A	Y	S	S

Substituições do tipo Timina/Adenina:

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*
1. Rhizoprionodon_M01MA_ND2	C	T	A	T	C	C	T	C
2. Rhizoprionodon_M03Ita_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C
3. Rhizoprionodon_M04Ita_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C
4. Rhizoprionodon_FAR19_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C
5. Rhizoprionodon_FAR34_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C
6. Rhizoprionodon_FAR68_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C
7. Rhizoprionodon_FAR85_ND2	C	T	A	A	C	C	T	C

Modificações de aminoácidos do tipo Treonina/Serina:

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*
1. Rhizoprionodon_M01MA_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
2. Rhizoprionodon_M03Ita_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
3. Rhizoprionodon_M04Ita_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
4. Rhizoprionodon_FAR19_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
5. Rhizoprionodon_FAR34_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
6. Rhizoprionodon_FAR68_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S
7. Rhizoprionodon_FAR85_ND2	T	P	A	I	L	T	L	S

