

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)

BRUNO DE CAMPOS SOUZA

**COMPOSIÇÃO GENÉTICA DA RAIA VIOLA *PSEUDOBATOS PERCELLENS*
(ELASMOBRANCHII: RHINOBATIDAE) UTILIZANDO SNPs**

Botucatu - SP
2021

[Type here]

BRUNO DE CAMPOS SOUZA

**COMPOSIÇÃO GENÉTICA DA RAIA VIOLA *PSEUDOBATOS PERCELLENS*
(ELASMOBRANCHII: RHINOBRANCHIIDAE) UTILIZANDO SNPs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Coorientadora: Dra. Vanessa Paes da Cruz

Botucatu – SP

2021

[Type here]

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Bruno de Campos.

Composição genética da raia *viola pseudobatos percellens* (elasmobranchii: rhinobatidae) utilizando SNPs / Bruno de Campos Souza. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Vanessa Paes da Cruz

Capes: 20406010

1. Elasmobrânquios. 2. Biodiversidade marinha - Conservação. 3. Variação genética. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único.

Palavras-chave: Conservação; Elasmobrânquios; *Pseudobatos percellens*; SNPs.

*A todos aqueles que, de alguma forma, fizeram despertar
em mim o olhar científico e foram fundamentais para eu
chegar até aqui.*

Dedico

[Type here]

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo acolhimento, pelas discussões, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por me orientar ao longo desses seis anos.

À Dra. Vanessa Paes da Cruz, pela orientação, pelas discussões, confiança e por sempre estar disposta a me ajudar, e pelo auxílio na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira, pelo apoio e pela infraestrutura cedida para que eu pudesse realizar este trabalho

À Coordenação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 2018/25429-3).

Aos inúmeros colaboradores que concederam as amostras biológicas de *Pseudobatos percellens* para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos meus colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, pelas discussões, confiança e por sempre estarem dispostos a me ajudarem na realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e seus funcionários, pelo auxílio na realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zoologia e Morfologia, por toda colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

Ao Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC), em especial aos Prof. Dr. Paulo Ribolla, Dr. Diego Alonso e Dr. Bruno Rossini, por toda colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

À Dra. Camila Mazzoni, pelas discussões, por toda colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

[Type here]

À Nadayca Mateussi, por todo o carinho, presença e apoio em todos os momentos.

À família Montefusco, por todo carinho e apoio nesses anos estando em Botucatu.

Aos meus amigos Pablo, Giovana, May, Vini, Beto, Ana, Vinícius, Beatriz e Nájila por toda amizade, carinho, apoio e ajuda nos procedimentos deste trabalho.

Aos meus colegas da turma XLIX de Ciências Biológicas noturno, que fizeram e fazem parte dessa minha história.

Aos meus sobrinhos Maria Eduarda, Anna e Miguel que me inspiram e enchem meu coração de amor e alegria.

A toda minha família, pelo amor, apoio e incentivo. Muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos, valores familiares e pelo exemplo de honestidade e trabalho.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

[Type here]

RESUMO

A biodiversidade marinha está exposta à uma ameaça crescente diante de inúmeras transformações ambientais. Compreender como os organismos respondem a tais mudanças é uma grande preocupação para os cientistas, principalmente envolvendo estudos de diversidade genética que podem ser melhor respondidos com o desenvolvimento recente de tecnologias em genômica. O sequenciamento de nova geração transformou o campo da genômica funcional, permitindo identificar polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em todo o genoma. Um modelo interessante de aplicação desta metodologia é representado pela espécie de raia marinha *Pseudobatos percellens*, popularmente conhecida como raia viola, uma vez que a falta de estudos envolvendo as populações desta espécie abordando principalmente questões de estruturação e diversidade genética. Este trabalho visou caracterizar geneticamente as populações de *P. percellens* que ocorrem na costa brasileira, em investigações que envolveram a identificação de possível ocorrência de estruturação genética na espécie utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs, além de identificar conexões, diferenças e similaridades entre as populações a partir da aplicação de análises estatísticas utilizadas em genética de populações. Foi utilizadas 52 amostras de *P. percellens* obtidas em localidades da região litorânea dos estados do Amapá, Pará, Pernambuco, São Paulo e Paraná. A filtragem dos SNPs resultou em um conjunto final de 3.329 marcadores deste tipo. Em todas as localidades a heterozigosidade observada (H_o) apresentou um valor superior ao da heterozigosidade esperada (H_e) e os valores para o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (F_{is}) foram negativos para todas as localidades amostradas, indicando não haver endogamia nesses grupos, confirmando um excesso de heterozigotos. Os resultados indicam uma estrutura populacional com F_{st} significativo e as estatísticas F (estimativas Φ_{ST}) geradas pela AMOVA revelaram a existência de heterogeneidade genética significativa. As análises Bayesiana e de DAPC revelaram pelo menos dois agrupamentos genéticos distintos de *P. percellens*. As taxas de migração calculadas com base nas estimativas de número de migrantes, detectou alta conectividade entre as regiões Norte (Amapá e Pará) e Nordeste (Pernambuco) pela existência de fluxo gênico entre os indivíduos dessas regiões. Da mesma forma, foi observada uma alta conectividade entre as regiões Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná). Entretanto, os valores de fluxo gênico entre esses dois grupos (Norte/Nordeste vs Sudeste/Sul) foram baixos. Considera-se, pois, que o comportamento de mobilidade de *P. percellens* poderia ter influência nos padrões de diversidade genética encontrados com a aplicação dos marcadores SNPs analisados. A evidência de novos estoques genéticos é crítica para reforçar as políticas de conservação neste grupo de organismos que se apresenta com um grande número de espécies ameaçadas.

[Type here]

ABSTRACT

Marine biodiversity is a growing threat in the face of countless environmental changes. Understanding how organisms respond to such changes is a major concern for scientists, especially involving studies of genetic diversity that can be better elucidated to with the recent development of technologies in genomics. Next-generation sequencing has transformed the field of functional genomics, enabling the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) throughout the genome. An interesting model for the application of this methodology is represented by the guitarfish species *Pseudobatos percellens*, popularly known as “guitarfish”, since the lack of studies involving populations of this species addressing mainly issues of structuring and genetic diversity. This work aimed to genetically characterize the populations of *P. percellens* that occur on the Brazilian coast, in investigations that involved the identification of possible occurrence of genetic structuring in the is species using molecular markers such as SNPs, in addition to identifying connections, differences and similarities between populations with the application of statistical analyzes used in population genetics. Fifty-two samples of *P. percellens* obtained from localities in the coastal region of the states of Amapá, Pará, Pernambuco, São Paulo and Paraná were used. Filtering the SNPs resulted in a final set of 3,329 markers of this type. For all localities the observed heterozygosity (H_o) had a higher value than the expected heterozygosity (H_e) and the values for the fixation index or coefficient of inbreeding (F_{is}) were negative for all sampled localities, indicating that there was no inbreeding in these groups and an excess of heterozygotes. The results indicate a population structure with significant F_{st} and the F statistics (Φ_{ST} estimates) generated by AMOVA revealed the existence of significant genetic heterogeneity, with a partition of genetic variation. Bayesian and DAPC analysis revealed at least two distinct genetic groupings of *P. percellens*. The migration rates calculated through migrant’s number estimated returned high connectivity between North (Amapá e Pará) and Northeast regions by the existence of gene flow among the individuals of these regions. In the same way, high connectivity between Southeast (São Paulo) e South (Paraná) areas was observed. However, the values of genetic flow between these two groups (Norte/Nordeste vs. Sudeste/Sul) were low. Therefore, it is considered that the mobility behavior of *P. percellens* could be an influential factor in the genetic diversity found with the application of the analyzed SNPs markers. Evidence of new genetic stocks is critical to strengthen conservation policies in this group of organisms that has a large number of threatened species.

[Type here]

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
SUMÁRIO.....	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 MUDANÇAS AMBIENTAIS E BIODIVERSIDADE.....	8
1.2 ELASMOBRÂNQUIOS	9
1.3 AS RAIAS VIOLA	9
1.4 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E OS AVANÇOS DA GENÔMICA.....	14
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 AMOSTRAGEM	15
3.2 OBTENÇÃO DE DNA E ELABORAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE SNPs.....	16
3.2.1 Extração do DNA genômico	16
3.2.2 Elaboração das bibliotecas reduzidas	17
3.2.3 Análises de bioinformática.....	19
4 RESULTADOS	21
4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	23
5 DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICES	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mudanças ambientais e biodiversidade

O planeta enfrenta profundas transformações ambientais, determinadas principalmente por um ciclo que engloba variáveis como a ação antrópica espaço-ambiente (De Paula & De Mello, 2019). Essas transformações afetam a biodiversidade marinha que fica sujeita a uma ameaça crescente, principalmente como consequência de impactos diretos e indiretos da poluição, super exploração dos estoques e mudanças climáticas (Field *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2018). A combinação de fatores consequentes destas transformações promovem degradação dos habitats, afeta potencialmente todos os níveis tróficos e exerce fortes pressões seletivas nas populações (Alter *et al.*, 2020).

Os peixes são o grupo de organismos que mais sofre com essas alterações, apresentando quedas constantes dos estoques naturais (Arlinghaus *et al.*, 2016; Jorde *et al.*, 2018; Tu *et al.*, 2018; Lewin *et al.*, 2019; Hannesson, 2020), com redução da riqueza e abundância de espécies (Haggarty *et al.*, 2016; Pieraccini *et al.*, 2017; Murawski *et al.*, 2018; Harasti *et al.*, 2019). A resiliência de comunidades biológicas inteiras é colocada em perigo pela ação desses fatores, o que pode levar a mudanças drásticas nas populações e espécies de peixes, incluindo colapsos e declínios (Stein, 2018; Verba *et al.*, 2020). Compreender como os organismos respondem a tais mudanças ambientais é uma grande preocupação para os cientistas e chama a atenção para estudos envolvendo a complexidade das populações e a diversidade genética (Fargeot *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2021). No entanto, apesar da escala dos problemas, ainda há muito a ser feito para entender como as espécies podem se adaptar às modificações ambientais e em que condições isso pode ocorrer (Hansen *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2021).

Estudos apontam que existem três condições pelas quais os organismos podem responder a um ambiente em mudança. A primeira considera que em um curto período eles podem adaptar-se a mudanças nas condições ambientais via fenótipos, com a apresentação de alta plasticidade, isto é, expressando fenótipos adaptativos particulares em resposta às condições ambientais, persistindo assim, em ambientes desafiadores (Brennan *et al.*, 2015). No entanto, os fenótipos induzidos pelas mudanças ambientais podem não ser persistentes nem adequados (Price *et al.*, 2003; West-Eberhard, 2003; Frank, 2011; Radersma *et al.*, 2020). Uma outra condição ocorre a longo prazo e, dependendo da história de vida de um organismo, a distribuição de uma espécie pode mudar para locais mais favoráveis à sua fisiologia e ecologia (Rose, 2005; McMahon & Hays, 2006). Por último, a resposta final à alteração global é adaptar-

se às condições ambientais prevalentes, o que implicaria em mudanças evolutivas como resposta às novas pressões seletivas (Reid *et al.*, 2016; Alter *et al.*, 2020).

Desta forma, o conhecimento da adaptação local não é importante apenas para melhorar a compreensão básica do processo evolutivo, mas também para definir unidades de gestão e estabelecer prioridades para a conservação das espécies (Allendorf *et al.*, 1997; Fraser & Bernatchez, 2001), principalmente com relação aos elasmobrânquios.

1.2 Elasmobrânquios

Tubarões e raias pertencem à classe Elasmobranchii e englobam 1.231 espécies válidas, sendo 553 de tubarões e 678 de raias (Fricke *et al.*, 2021). Eles constituem um grupo de animais com muitos indivíduos sendo amplamente migradores e distribuídos circunglobalmente (Gomes *et al.*, 2019). Ao longo da história, os componentes deste grupo conseguiram colonizar e habitar uma gama enorme de nichos, desde água doce, salobra, ambientes rasos, costeiros e alto mar (Aschliman *et al.*, 2012; Last *et al.*, 2016). Essa ampla distribuição é reflexo das inúmeras adaptações desses animais em seus ambientes (Gomes *et al.*, 2019).

Embora a história de vida desses organismos mostre imensa resiliência, com adaptações a diversas condições em todo o mundo, a recuperação às pressões antropogênicas são realmente baixas (Simões, 2020), pelo fato de apresentarem alta sensibilidade à perda de habitat (Heupel *et al.*, 2007). Estudos apontam que os riscos de extinção em elasmobrânquios podem ser duas vezes maiores quando comparados aos dos peixes teleósteos (Frisk *et al.*, 2001; Myers & Worm, 2005) e isto se deve a um conjunto de características biológicas exibidas pela maioria dos tubarões e raias, como baixa taxa de crescimento e fecundidade, maturidade sexual tardia, entre outras (Myers & Worm, 2005; Dulvy *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que, diferentemente de outros organismos aquáticos, os elasmobrânquios requerem abordagens específicas, diferentes daquelas comumente adotadas (Dulvy *et al.*, 2017; Stein, 2018), bem como mais estudos voltados para ações de conservação (Domingues *et al.*, 2018). Deste modo, com uma grande diversidade de estratégias de história de vida, as raias constituem modelos interessantes para estudos da variabilidade e das relações genéticas e evolutivas entre os organismos (Frisk, 2010).

1.3 As raias viola

As raias viola, também conhecidas como guitarfishes, pertencem à família Rhinobatidae,

composta por aproximadamente 35 espécies distribuídas em três gêneros, *Acroteriobatus* Giltay 1928, *Rhinobatos* Linck 1790 e *Pseudobatos* Last, Séret & Naylor 2016 (Fricke *et al.* 2021). Os membros de Rhinobatidae apresentam diversificada distribuição em oceanos temperados, tropicais e subtropicais, geralmente vivem em águas costeiras e estuarinas, associadas ao substrato arenoso ou lamoso (Séret *et al.*, 2016). As Rhinobatidae são reconhecidos pela morfologia típica do corpo, apresentando discos achatados em forma de “pá” com o corpo deprimido, focinho geralmente alongado, mas podendo ser arredondado ou pontudo, com ausência de cortina nasal; e o comprimento total do corpo pode variar de 50 centímetros a 1,7 metros (Séret *et al.*, 2016). No Brasil, ocorrem duas espécies de raias-violas, *Pseudobatos horkelii* (Müller & Henle 1841) e *P. percellens* (Walbaum 1792) (Gomes *et al.*, 2019), que têm sua distribuição ao longo de quase toda a costa brasileira, motivando muitas indagações a respeito da composição genética e associações que possam estar interligadas à adaptações ambientais.

Pseudobatos percellens caracteriza-se por apresentar coloração da superfície dorsal castanho-clara ou castanho-escura uniforme, com a presença de mais de 70 tubérculos que podem se apresentar em volta das órbitas e atrás dos espiráculos. Apresentam muitas vezes pontuações claras simétricas, principalmente no disco, mas também são notadas algumas na região caudal, onde podem ocorrer manchas escuras transversais pouco evidentes (Gomes *et al.*, 2019) (Figura 1). Os indivíduos adultos chegam a medir 1 metro de comprimento, da ponta do rostro à ponta da nadadeira caudal (Bornatowski & Abilhoa, 2012).



Figura 1. Exemplar de *Pseudobatos percellens* coletado no oceano Atlântico em localidade próxima à costa do Estado de São Paulo, Brasil. Foto: uso autorizado pelo autor Matheus Marcos Rotundo.

A distribuição desta espécie abrange regiões do Atlântico Sudoeste, Oeste e Noroeste, ocorrendo geralmente em ambientes com profundidades de até 140 metros (Weigmann, 2016), desde o Golfo do México até o norte da Argentina (McEachran & de Carvalho, 2002) (Figura

2). São considerados organismos vivíparos lecitotróficos, apresentando desenvolvimento embrionário dentro do corpo da mãe, com nutrição vitelar, sem estrutura placentária (Bigelow & Schroeder, 1953; Figueiredo, 1977; Compagno, 1999), com ninhadas de até cinco filhotes (Costa & Chaves, 2006). A existência de áreas de berçário é relatada para a espécie na região de Caiçara do Norte (Yokota & Lessa, 2006) e Praia Salguero (Barbosa, 2006) no estado do Rio Grande do Norte e em Santa Marta, na Colômbia (Grijalba-Bendeck *et al.*, 2008). Os machos com cerca de 45 cm de comprimento e fêmeas com 45 a 50 cm já podem ser considerados sexualmente maduros (Bornatowski & Abilhoa, 2012). Importante ressaltar que essa espécie é considerada demersal e migradora sazonal de curta distância (Rocha & Gadig 2013), apresentando hábitos alimentares que envolvem invertebrados e peixes ósseos bentônicos (Gomes *et al.* 2019).



Figura 2. Mapa mostrando a área de distribuição de *Pseudobatos percellens* em regiões do Oceano Atlântico Sudoeste, Oeste e Noroeste. As áreas onde foram relatadas capturas da espécie estão destacadas em coloração marrom e a distribuição da espécie é apresentada em traço pontilhado vermelho (Adaptado de IUCN - iucnredlist.org/species/161373/887217).

No cenário da pesca, a espécie *P. percellens* geralmente não é considerada espécie alvo da pesca industrial e artesanal em sua área de distribuição. Ainda assim, em algumas regiões as capturas são intensas. Na Colômbia, por exemplo, esta espécie está entre as mais comumente capturadas entre as raias, tanto na pesca artesanal quanto na comercial (Acevedo *et al.*, 2007; Grijalba-Bendeck *et al.*, 2007).

No Brasil, há registros de comercialização e de captura da espécie principalmente como fauna acompanhante nas regiões Nordeste (Meneses *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2021), Sudeste (Araujo *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021) e Sul (Costa & Chaves, 2006; Bornatowski *et al.*, 2010; Bornatowski & Abilhoa, 2012; Bernardo *et al.*, 2020; Afonso & da Cunha Chaves, 2021). A fauna acompanhante consiste na captura de espécies que não são alvo principal da pesca por apresentarem reduzido valor comercial, sendo os exemplares capturados rotineiramente descartados mortos ou moribundos, representando, portanto, uma mortalidade "desnecessária" (Bellido *et al.*, 2011). No caso da raia *P. percellens*, quando são pescadas como fauna acompanhantes, elas são aproveitadas e não descartadas. Além disso, o desenvolvimento humano e a poluição costeira podem estar degradando habitats em alguns pontos da área de distribuição (Gonçalves-Silva & Vianna, 2018) e esses fatores têm contribuído para a avaliação atual de *P. percellens* na Lista Vermelha da International União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN) que é classificada como "Em Perigo" (EN) (Pollom *et al.*, 2020) e como "Dados Deficientes" (DD) no Livro da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBio, 2018).

Por ainda apresentarem aspectos biológicos em grande parte desconhecidos, considera-se que maiores atenções são requeridas para a espécie. Entre os poucos estudos desenvolvidos que englobam a espécie *P. percellens*, destacam-se os de Yokota & Lessa (2006) sobre regiões de berçário para tubarões e raias na região nordeste do Brasil. Os resultados desta investigação mostram dados de diferentes espécies usando a região de Caiçara do Norte, no estado do Rio Grande do Norte, como berçário primário e secundário, com nichos ecológicos separados para os tubarões e sobreposição espacial com relação às raias amostradas.

O estudo de Caltabellotta *et al.* (2019) realizado sobre idade e crescimento de três espécies de raias viola usando vértebras mostrou que estas exibiram consistências e contrastes em suas características de crescimento no sudeste do Brasil. Além disso, os parâmetros utilizados mostraram-se marcadamente diferentes entre os dois sexos em *P. percellens*, com os machos apresentando crescimento mais acelerado que as fêmeas e as fêmeas apresentando tamanho total maior em comparação ao dos machos.

O trabalho de Bornatowski *et al.* (2010) sobre hábitos alimentares realizados através da análise do conteúdo estomacal de *P. percellens*, em exemplares capturados pela pesca artesanal em regiões dos estados do Paraná e Santa Catarina, relacionaram a disponibilidade das presas no ambiente com o tamanho das raias analisadas, mostrando que *P. percellens* possui um alto nível trófico e, portanto, pode exercer influência na estrutura das comunidades marinhas. Por outro lado, o estudo de Spier *et al.* (2018) abordando informações sobre biogeografia, estado de conservação, importância econômica e grau de vulnerabilidade das espécies da ictiofauna da

plataforma interna do estado do Paraná, mostrou que essa região abriga várias espécies ameaçadas de extinção, contando com a ocorrência de 24% dos elasmobrânquios brasileiros. A riqueza da ictiofauna nesta região pode ser explicada pelo fato de ser composta por uma mistura de espécies com afinidades para as regiões tropicais e subantárticas. Além disso, o estudo destes perquisadores trouxe dados sobre as características de vários elasmobrânquios que ocorrem no litoral do Paraná, revelando que estes parecem usar a costa sul do Brasil para reprodução; suspeita-se ainda que várias espécies também usam esta região como berçário e para realizar o parto.

Na área da genética, Ferrette *et al.* (2019) descreveram resultados obtidos com o uso da técnica de DNA *barcoding* para identificar a composição de espécies de batoides capturadas pela pesca industrial de pequena escala no Atlântico sudoeste e da pesca artesanal no sudeste do Brasil, revelando a captura de espécies ameaçadas. Os resultados obtidos destacaram os impactos das capturas pela pesca artesanal não gerenciada e pesca industrial de pequena escala no Atlântico sudoeste sobre a biodiversidade marinha. Por outro lado, a investigação mostrou que a implementação de metodologias baseadas em DNA para identificação das espécies é uma ferramenta poderosa para melhorar a qualidade das estatísticas de captura da pesca e para manter registros precisos de capturas acessórias, uma vez que os elasmobrânquios constituem um dos grupos de vertebrados mais ameaçados em todo o mundo. Estudo de Cruz *et al.* (2021) sobre a avaliação da variabilidade genética e da estrutura populacional de *P. horkelii* e *P. percellens* na região sudeste do Brasil e litoral norte da Argentina, com base em sequências da região de controle (D-loop) do DNA mitocondrial, forneceu informações interessantes sobre a diversidade genética das duas espécies. De modo geral, as informações obtidas indicaram a existência de níveis consideráveis de diversidade genética e revelaram padrões de estrutura populacional ao longo da área sudeste do Oceano Atlântico para ambas espécies. Tal constatação revelou a necessidade de uma atenção mais centrada na conservação dos estoques silvestres das espécies em perigo de desaparecimento neste grupo de organismos.

Neste contexto, pode ser considerado que a falta de informações robustas abrangendo as populações de *P. percellens* que se referem principalmente à abordagem de questões sobre estruturação das populações e diversidade genética, pode ser creditado principalmente à inexistência ou precariedade dos recursos metodológicos disponíveis até recentemente.

Assim como com relação ao rastreio de características que conferem vantagens para indivíduos residentes em determinados ambientes, uma vez que a metodologia analítica necessária para investigar a base genética da adaptação carecia de técnicas mais adequadas e eficientes (Pardo-Diaz *et al.*, 2014).

1.4 Polimorfismo de nucleotídeo único e os avanços da genômica

O desenvolvimento de tecnologias genômicas e as informações obtidas estão fornecendo *insights* para um conjunto variado de questões evolutivas em um número expressivo de organismos, tornando possível a discriminação de relações filogenéticas, evolução do tamanho do genoma, demografia histórica e estrutura populacional, potencial adaptativo, hibridização e especiação (Allendorf *et al.*, 2010; Liedtke *et al.*, 2018; Supple & Shapiro, 2018; Brandies *et al.*, 2019).

Em particular, a revolução genômica nos últimos 10 anos associada ao desenvolvimento de vários métodos de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) concentraram esforços no aperfeiçoamento e efetividade da transição de marcadores microssatélites para a análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), com o propósito de aumentar a resolução e poder das estimativas da estrutura populacional (Lado *et al.*, 2020), detecção de fluxo gênico (Lujan *et al.*, 2020; Wold *et al.*, 2021) e diversidade genética em todo o genoma (Le Cam *et al.*, 2020). De acordo com a própria sigla, um SNP se apresenta como a variação ocorrida entre indivíduos em relação a uma única posição nucleotídica em uma sequência de DNA (Vignal *et al.*, 2002). Estes marcadores são altamente abundantes no genoma, ocorrendo em praticamente todos os indivíduos e populações (Wicks *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2012).

A utilização dos SNPs como marcadores genéticos nas análises pode ser destacada por inúmeras vantagens que apresenta, entre as quais o grande potencial para varreduras no DNA detectando regiões neutras ou adaptativas (Morin *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2019). Métodos inovadores para identificação de SNPs, triagem automatizada, inferência de haplótipos e análises estatísticas os tornam uma ferramenta genética eficiente e viável para estudos evolutivos (Allendorf *et al.*, 2010; Narum, 2011; Funk *et al.*, 2012; Bradbury *et al.*, 2015; Oyler-McCance *et al.*, 2016; Andrews *et al.*, 2018; Andrews *et al.*, 2021). Essa metodologia genética pode ser aplicada em grande escala, com alto rendimento e a custo moderado, levando a uma boa relação custo-benefício quando comparada com aquelas que se referem aos demais marcadores moleculares (Zimmerman *et al.*, 2020). Tais características mostram que este marcador auxilia nos estudos de conservação (Funk *et al.*, 2012), de genética populacional e de ecologia em várias espécies de elasmobrânquios (Cruz *et al.*, 2016, Momigliano *et al.*, 2017; Pazmiño *et al.*, 2017; Devloo-Delva *et al.*, 2019; Marandel *et al.*, 2020; Bernard *et al.*, 2021). Neste sentido, existem atualmente muitos métodos apropriados para detectar fatores específicos nos estudos populacionais, com base em estimativas dos índices de fixação como os valores de

F_{ST} , que diferem nos modelos demográficos subjacentes e apresentam a possibilidade de serem rastreados através de análises estatísticas (Lotterhos & Whitlock, 2014; Haasl & Payseur, 2016).

Dadas as características biológicas da espécie de raia viola *Pseudobatos percellens*, foi testada a hipótese de que, a partir de marcadores genéticos moleculares do tipo SNPs, sendo caracterizados elementos sobre a possível existência de estruturação genética entre as populações dessa espécie, com a identificação de diferenças entre indivíduos das regiões costeiras Norte/Nordeste e Sudeste/Sul.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente as populações desta espécie que ocorrem na costa brasileira, a partir de amostras obtidas de localidades nos estados do Amapá, Pará, Pernambuco, São Paulo e Paraná e, considerando-se a deficiência de dados moleculares disponíveis para a espécie de raia *Pseudobatos percellens*, desse modo, foi investigado a possível ocorrência de estruturação genética na espécie utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs. As análises foram realizadas para identificar a ocorrência de possíveis conexões existentes entre as populações amostradas analisando as diferenças e similaridades a partir da aplicação de metodologias estatísticas utilizadas em estudos de genética de populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

No presente estudo foram utilizadas 52 amostras de tecido muscular de indivíduos de *Pseudobatos percellens*, provenientes de cinco localidades da costa brasileira situadas nos estados do Amapá, Pará, Pernambuco, São Paulo e Paraná (Figura 3). Estas amostras foram obtidas com a colaboração de diversos pesquisadores e pescadores.

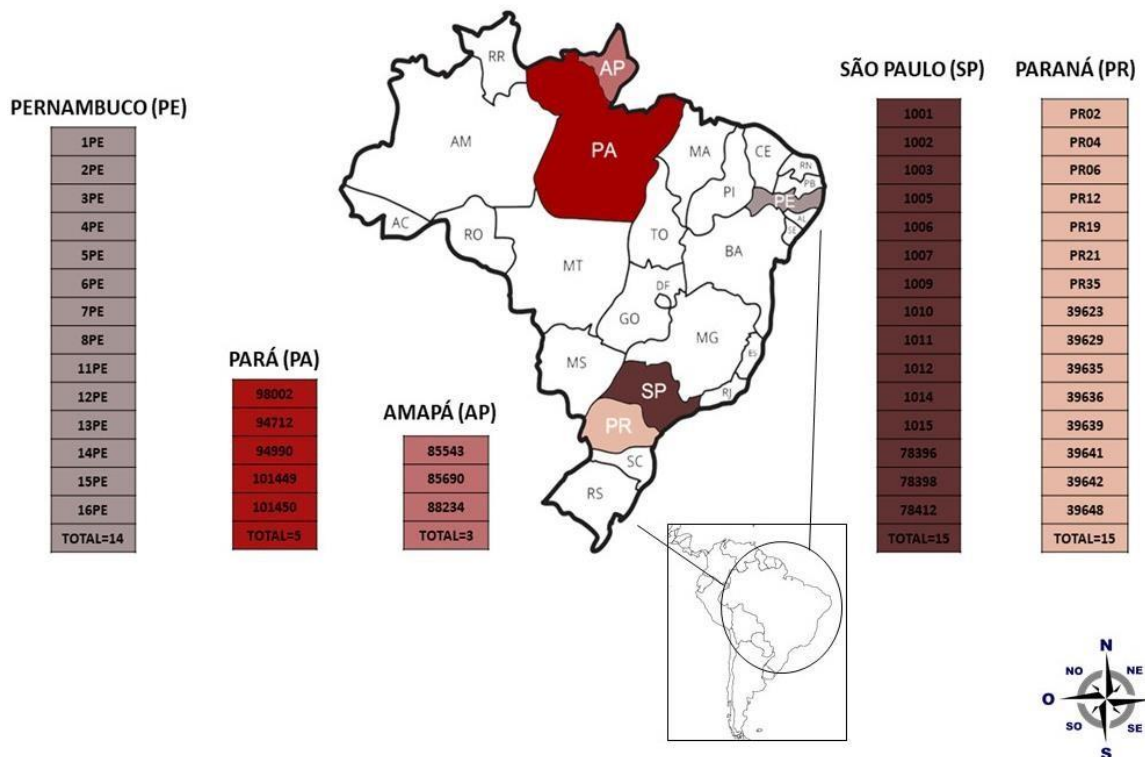


Figura 3. Mapa ilustrando o território brasileiro mostrando em destaque os estados costeiros (AP: Amapá, PA: Pará, PE: Pernambuco; SP: São Paulo e PR: Paraná) nos quais as amostras dos espécimes de *Pseudobatos percellens* foram coletadas. Os números de vouchers das amostras são indicados, bem como o total de amostras por localidade.

Todos estas amostras foram depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências da UNESP, credenciado junto ao Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositário de Amostras do Patrimônio Genético (SISBIO 13843-1). Amostras de tecido muscular e fragmentos de nadadeiras dos espécimes foram coletados, numeradas e preservados em etanol 96% para posterior processamento.

3.2 Obtenção de DNA e elaboração das bibliotecas de SNPs

3.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos 52 indivíduos de *Pseudobatos percellens* foi extraído do tecido muscular e de fragmentos de nadadeiras preservados em etanol utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. A fim de verificar a concentração do DNA, as amostras foram analisadas em um aparelho *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen) com o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*, seguindo o protocolo do fabricante. Em cada microtubo foram

adicionados 198 µl de Tampão Qubit, 1 µl de fluorescência e 1 µl do DNA, totalizando 200 µl. Após as etapas de quantificação, as amostras foram padronizadas para uma concentração final de 200 ng, com volume final de 34 µl e resultando em 5,8 ng/µl.

3.2.2 Elaboração das bibliotecas reduzidas

Dupla digestão enzimática (Double digest)

A preparação da biblioteca reduzida referente às amostras de *P. percellens* foi realizada utilizando o protocolo *double digest Restriction Associated DNA sequencing (ddRADseq)*, descrito por Peterson *et al.* (2012) e adaptado por Campos *et al.* (2017). Neste protocolo são utilizadas duas enzimas de restrição para a construção da biblioteca.

A dupla digestão de DNA foi realizada com algumas adaptações no protocolo para posterior sequenciamento, como a síntese de adaptadores específicos para as enzimas. Na reação de dupla digestão enzimática foram utilizados 34µl de DNA (200 ng de concentração), 0,5 µl de cada enzima EcoRI (20U/µl) e MspI (10U/µl) (Peterson *et al.*, 2012), 4 µl TANGO buffer (Cut Smart), 1 µl de água ultrapura autoclavada para um volume final de 40 µl, sendo a solução posteriormente incubada a uma temperatura de 37°C por três horas. As amostras do material digerido foram purificadas utilizando o kit de *beads* (esferas magnéticas) *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Fragmentos de tamanhos menores que 100 pares de bases foram eliminados.

Ligação dos adaptadores

Um par de adaptadores hibridados P1 (3 nM) correspondente à enzima EcoRI, com a sequência (P1.1 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG / P1.2 AGCAGCCGTCGCAGTCTACACATATTCTCTGTCTTAA) e com P2.1 (6 nM) CGCTGTCTCTTATACGTCCTCTT/P2.2GACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTG CTCTG), correspondente à enzima MspI com a sequência (P2.1) foi ligado ao produto de digestão num volume de reação final de 40 µl, composto de 2,0 µl do adaptador de cada uma das enzimas, 4 µl de T4 Ligase Buffer 1X (Promega), 0,5 µl da enzima T4 Ligase (Promega) e 31,5 µl do material digerido. Em seguida, as amostras foram incubadas a uma temperatura de 23°C por 30 minutos, de 65°C por 10 minutos e de 63°C por 90 segundos, sendo então a temperatura diminuída de 2°C a cada 90 segundos, até alcançar 23°C. Após essa etapas, as amostras da reação de ligação foram purificadas novamente com a utilização do kit de *beads*,

de acordo com o protocolo do fabricante.

Indexação

Na reação de indexação, em cada amostra foi inserida a sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) i5 e i7 (Nextera DNA CD Indexes – 96 indexes, 96 samples). Nesta reação foram utilizados 15 µl do produto de ligação, 25 µl de Go Taq® Master Mixes (Promega), 5 µl de cada index i5 e i7, e para cada amostra, uma combinação única de index.

A reação de indexação foi realizada de acordo com as seguintes condições de ciclo: 1 ciclo com um passo inicial de 72°C por 3 minutos seguido por 16 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e 95°C por 10 segundos, anelamento (55°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a reação de PCR, os fragmentos foram purificados utilizando o kit de *beads*, de acordo com o protocolo do fabricante. Na verificação da indexação das amostras, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1% e após a confirmação positiva, as amostras foram quantificadas, apresentando concentrações que variaram de 25 ng/µl a 106 ng/µl, sendo normalizadas a 25 ng/µl.

Pool das amostras

O *pool* de amostras foi realizado utilizando uma concentração de 25 ng/µl de DNA, tendo por base a quantificação anterior. O *pool* foi composto de 5 µl de cada amostra para um volume final de 200 µl e, em seguida, foi realizada a purificação do *pool* utilizando o kit de *beads*, de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do *pool* também foi realizada em aparelho *Qubit*, tendo sido obtida a concentração final de 68,6 ng/µl.

Size selection e sequenciamento

O processo *size selection* foi realizado com o objetivo de selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse aplicados no *pool* em gel de agarose a 1%. Ao final da eletroforese, uma parcela do gel com fragmentos de tamanho entre 300 pb e 500 pb foi cortada e, em seguida, foi realizada a purificação com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante. Após a purificação do gel, foi realizada a quantificação do DNA utilizando um aparelho *Qubit*, tendo sido obtido um valor de concentração final de 23,6 ng/µl.

A biblioteca final foi quantificada com a utilização do PCR em tempo real (qPCR) e posteriormente normalizada, tendo sido sequenciada com leituras de extremidade única (*single-end*) de 150 pb. Este procedimento foi realizado em uma célula de fluxo (*flow cell*) *High Output* na plataforma NGS Illumina Nextseq500 no Instituto de Biotecnologia (IBTEC– UNESP, campus Botucatu/SP), em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla.

3.2.3 Análises de bioinformática

A leitura das sequências foi realizada após a etapa de sequenciamento da biblioteca no *ddRAD*. A acurácia da qualidade das sequências foi verificada utilizando dois programas: o FastQC e o MultiQC. O FastQC fornece informações para verificação do controle de qualidade em dados de sequências brutas e um conjunto modular de análises, que pode ser usado para uma impressão rápida dos dados, para verificar em quais áreas pode haver problemas (em bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) (Andrews, 2010).

O MultiQC que sumariza os dados dos resultados do FastQC de todas as amostras em um único relatório e fornece uma verificação das principais estatísticas de forma rápida e fácil, com gráficos de comparações precisas entre as amostras. Tais informações permitem a detecção de diferenças sutis que não são perceptíveis ao relacionar arquivos diferentes (Ewels *et al.*, 2016) (disponível em github.com/ewels/MultiQC).

Os dados obtidos por meio destes programas permitiram ilustrar por meio de gráficos o grau de qualidade das amostras, como presença de sequências dos adaptadores usados na construção da biblioteca, as sequências que apresentam um *Phred Quality Score* (10-60) de qualidade, o tamanho das sequências em pares de base (pb), entre outros parâmetros de comparação. Posteriormente, foram realizadas etapas de filtragem utilizando o programa TRIMMOMATIC v.o.32 (Bolger *et al.*, 2014) para proceder ao corte dos adaptadores e das extremidades (*paired-ends*).

A montagem dos loci foi feita utilizando parâmetros *de novo* e posteriormente o *refmap*, ambos com o uso da pipeline STACKS (Catchen *et al.*, 2011) e abordagens de pipeline de Driller *et al.* (2020), considerando que não há genomas de referência para a espécie estudada. A montagem do catálogo de marcadores em *P. percellens* foi desenvolvida com indivíduos selecionados que apresentaram o maior número de sequências, ou seja, os indivíduos mais bem representados dentro de cada amostragem. No rastreamento de SNPs foram testados parâmetros, tendo sido decidido entre os parâmetros finais, o parâmetro M=2 que controla o número de incompatibilidades permitidas entre os dois alelos de um determinado loci e o parâmetro m=8,

que controla o número de leituras idênticas mínimas necessárias para iniciar um possível alelo. Uma vez desenvolvido, com o catálogo de marcadores foi construída a referência utilizando o software *Bowtie2* (v2.2.4), utilizando a pipeline *Ref map* do STACKS. Ao final do processo, foi utilizada a pipeline *Ref map* e *populations* do STACKS para a realização dos filtros de SNPs. Assim, primeiramente foram selecionados SNPs que genotiparam em pelo menos 75% dos indivíduos de cada população ($r = 0,75$); em seguida, foi aplicado um filtro com o qual foram excluídos SNPs que apresentaram valor de MAF (*Minor allele frequency*) $<0,05$

O programa GENEPOP v4.1.0 (Rousset, 2008) foi usado para investigar a diversidade genética, tendo sido analisado o coeficiente de endogamia (F_{IS}) e a probabilidade de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0.05$), calculada através de teste exato. O software *Populations* 1.2.30 (Langella, 1999) foi utilizado para calcular o número de alelos privados (N_a), a Heterozigosidade esperada (H_e), a Heterozigosidade observada (H_o) e a estimativa de diversidade nucleotídica (π). Com a finalidade de analisar a diferenciação genética entre as populações foram também calculados os valores de *F_{ST} pairwise* pelo programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2010).

Os cenários hipotéticos foram testados através de estimativas usando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) no ARLEQUIN v3.5.2.2, visando determinar a variação atribuída às diferenças entre os grupos (Φ_{CT}), entre as populações dentro de cada grupo (Φ_{SC}) e entre todas as populações (Φ_{ST}), com quatro cenários diferentes. Inicialmente foi utilizado um cenário considerando todas as amostras como um único grupo. Em um segundo cenário, foi usado o agrupamento por ecorregião, sendo elas Norte (Amapá e Pará) / Nordeste (Pernambuco) x Sudeste (São Paulo) / Sul (Paraná) do Brasil; em um terceiro cenário, foram considerados agrupamentos Norte (Amapá e Pará) x Nordeste (Pernambuco) x Sudeste (São Paulo) / Sul (Paraná) do Brasil; e no quarto cenário, as comparações Norte (Amapá e Pará) x Nordeste (Pernambuco) x Sudeste (São Paulo) x Sul (Paraná) do Brasil.

Nas análises de estruturação genética da espécie foi utilizada a análise Bayesiana através do software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), com $k=1$ a $k=6$ e com 1.000.000 de MCMC e *burn-in* de 10%, com 10 interações para cada K. A identificação do número de *clusters* genéticos (k) foi feita através do método Evanno (ΔK) (Evanno *et al.*, 2005) e pelo método de Puechmaille (Puechmaille, 2016) usando o *Structure Selector* (Li & Liu, 2018). Os gráficos foram visualizados no CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015). Adicionalmente, uma análise discriminante de componentes (*Discriminant Analysis of Principal Components - DAPC*) (Jombart & Ahmed, 2011) também foi realizada para estimar os *clusters* genéticos. Esta análise foi implementada no pacote *adegenet* do R (Jombart & Ahmed, 2011) e o número

apropriado de *clusters* genéticos foi determinado utilizando critérios de informação bayesiana (*Bayesian Information Criterion* - BIC). Por último, para o mesmo conjunto de dados, foram calculadas as taxas de migração relativa direcional usando a função do *divMigrate* (Sundqvist *et al.*, 2016) no pacote R *diveRsity* (Keenan *et al.*, 2013), fornecendo as estimativas do fluxo gênico com base no número de migrantes (Nm) com 1000 de *bootstrap*.

4 RESULTADOS

A identificação de SNPs a partir do sequenciamento de *ddRAD* para 52 amostras obtidas de indivíduos da espécie de raia *Pseudobatos percellens* está resumida na Figura 4. No total foram obtidas 86.319.471 sequências que apresentaram uma variação de 207.416 a 3.044.397 por amostra. Após as filtrações de qualidade, foram mantidas 70.757.837 de sequências que apresentaram uma variação de 175.933 a 2.578.145, resultando numa média de 81,42% de aproveitamento (Apêndice 1). Todas as sequências foram padronizadas com 140 pb.

Ao fim das etapas de filtração, a biblioteca resultou num número de sequências com média de 1.360.728 e com 140 pb para cada amostra. O aproveitamento das sequências por localidade revelou valores entre 75,1 e 95,0%, que foram destaques para as 5 regiões amostradas (Figura 5).

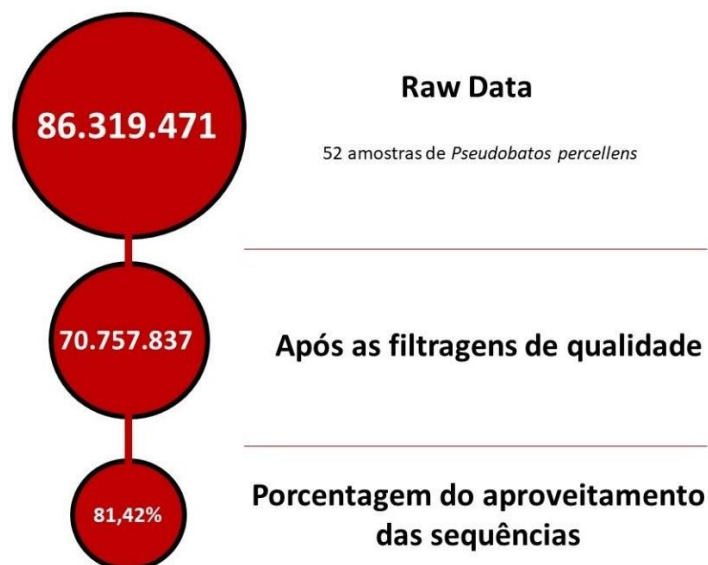


Figura 4. Resumo do sequenciamento *ddRAD* para *Pseudobatos percellens*. com indicação do fluxo de trabalho dos dados de processamento das sequências (disco superior).

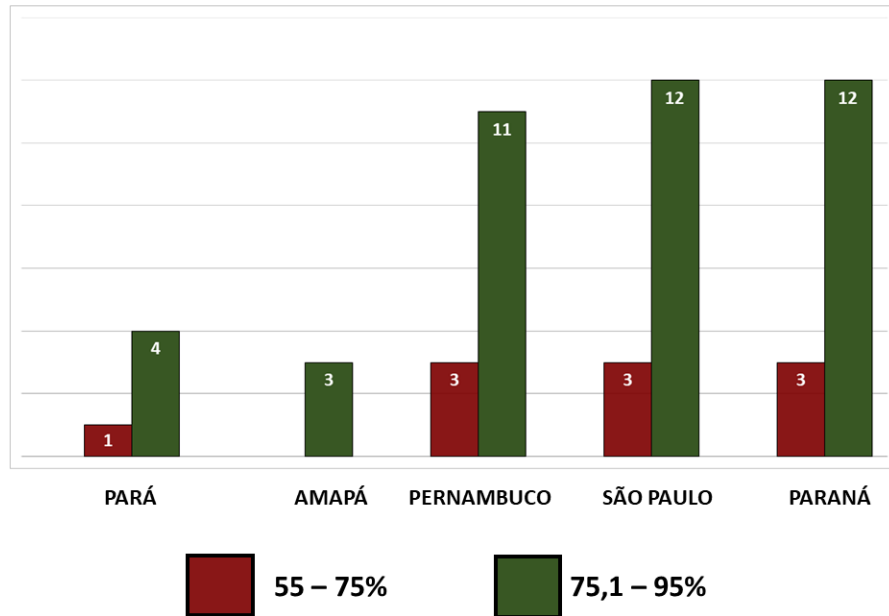


Figura 5. Gráfico mostrando a porcentagem final de sequências filtradas em relação ao número inicial de sequências, separadas por localidades onde os espécimes das amostras foram coletados.

Em todas as amostras analisadas de *P. percellens* foi constatado que 80,77% das sequências resultaram num aproveitamento entre 75,1% e 95%, conforme representado na Figura 6.

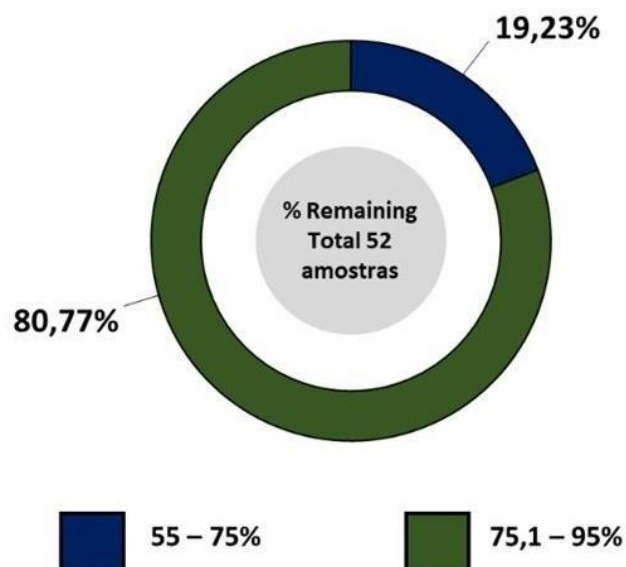


Figura 6. Gráfico mostrando a porcentagens de aproveitamento das sequências, considerando de forma geral todas as amostras de *Pseudobatos percellens* analisadas.

A partir do catálogo de marcadores desenvolvido entre as amostras mais representadas, ou seja, com maior número de *reads* (Vouchers 88234AP, 94712PA, 13PE, 1005SP e 39635PR) foi construída a referência, utilizando o software *Bowtie2* (v2.2.4). O processo final de filtragem de SNPs resultou num conjunto final com 3.329 marcadores SNPs.

4.1 Diversidade Genética

As informações genéticas foram obtidas utilizando 3.329 SNPs, dentre os quais foram detectadas 1.779 transições e 1.550 transversões, conforme apresentado na Figura 7. Estes marcadores foram submetidos a análises estatísticas em 52 amostras de *P. percellens*, distribuídas nas localidades dos estados do Pará, Amapá, Pernambuco, São Paulo e Paraná.

Em todas as localidades a heterozigosidade observada (H_o) apresentou um valor superior ao da heterozigosidade esperada (H_e), conforme apresentado na Tabela 1. Os valores encontrados para o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram negativos para todas as localidades amostradas, sendo que tais resultados são indicativos da ausência de endogamia nos grupos analisados. Além disso, os valores apresentados por todas as regiões amostradas indicam excesso de heterozigotos.

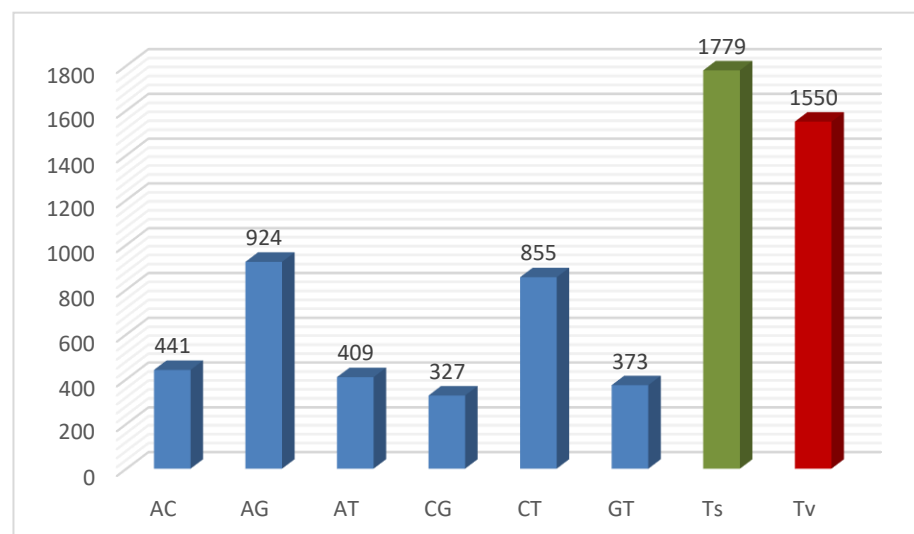


Figura 7. Identificação de transições (em verde) e transversões (em vermelho) e sua distribuidos em um conjunto de 3.329 SNPs caracterizados em *Pseudobatos percellens*. No eixo “x” estão as bases nitrogenadas (em azul), transições e tranversões. E no eixo “y” estão os valores quantitativos.

Tabela 1. Estatística dos valores de diversidade genética encontrados para *Pseudobatos percellens* utilizando 3.329 SNPs. N: número de amostras; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia.

Localidades	N	H _O	H _E	F _{IS}
Amapá	3	0.577	0.487	-0.542
Pará	5	0.471	0.415	-0.216
Pernambuco	14	0.315	0.298	-0.088
São Paulo	15	0.281	0.239	-0.213
Paraná	15	0.333	0.273	-0.233
Média		0.395	0.342	-0.258

A análise *pairwise* com base nos valores de diferenciação genética (Φ_{ST}) entre as amostras das diferentes localidades identificou valores de que variaram de 0.043 a 0.764, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Índices de fixação (F_{ST}) calculados na comparação par-a-par dos diferentes grupos amostrais de *Pseudobatos percellens* a partir da análise de SNPs. Em negrito estão os valores com significância estatística ($p < 0.050$).

Grupo amostral	Amapá	Pará	Pernambuco	São Paulo	Paraná
Amapá	-				
Pará	0.160	-			
Pernambuco	0.118	0.112	-		
São Paulo	0.764	0.696	0.544	-	
Paraná	0.730	0.676	0.538	0.043	-

Da mesma forma, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou diferenças significativas nos cenários testados, sendo obtido o valor de Φ_{ST} de 0.427 (p -value 0.000) quando consideradas todas as localidades como um único agrupamento. No segundo cenário, testado de acordo com as regiões (Norte e Nordeste do Brasil x Sudeste e Sul do Brasil), o valor de Φ_{ST} observado foi de 0.520 (p -value 0.000) (Tabela 3), com 46% da variação e este resultado pode ser explicado entre os grupos diante dos testes feitos. Todos os índices de fixação mostraram-se significativos ($p > 0.000$).

Tabela 3. Análise de variância molecular para cenários distintos de estrutura populacional de *Pseudobatos percellens*. Localidades analisadas no litoral dos estados do Amapá (AP), Pará (PA), Pernambuco (PE), São Paulo (SP) e Paraná (PR). * Φ_{ST} valores são significativos em $p > 0.000$.

Cenários hipotéticos	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variância	Índices de fixação	p-value
Todas as localidades	Entre os grupos	2534.553	32.514	42.799		
	Dentro dos grupos	3974.462	43.454	57.200	$\Phi_{ST}=0.427$	0.000±0.000
1 AP+PA+PE x SP+PR	Entre os grupos	2158.350	42.132	46.508	$\Phi_{ST}=0.520$	0.000±0.000
	Entre populações dentro dos grupos	376.203	5.004	5.524	$\Phi_{SC}=0.103$	0.000±0.000
	Dentro da população	3974.462	43.454	47.967	$\Phi_{CT}=0.465$	0.000±0.000
	Entre os grupos	2341.498	38.784	45.463	$\Phi_{ST}=0.490$	0.000±0.000
2 AP+PA x PE x SP+PR	Entre populações dentro dos grupos	193.055	3.069	3.598	$\Phi_{SC}=0.065$	0.000±0.000
	Dentro da população	3974.462	43.454	50.938	$\Phi_{CT}=0.454$	0.000±0.000
	Entre os grupos	2386.907	14.593	19.157	$\Phi_{ST}=0.429$	0.000±0.000
3 AP+PA x PE x SP x PR	Entre populações dentro dos grupos	147.646	18.129	23.799	$\Phi_{SC}=0.294$	0.000±0.000
	Dentro da população	3974.462	43.454	57.043	$\Phi_{CT}=0.191$	0.000±0.000

A análise bayesiana realizada com a utilização do *software* STRUCTURE demonstrou, com base nos dados de agrupamentos ($K=1-6$), que a maior probabilidade de clusters foi de $k=2$ ($(\ln(P) D) 3886 \pm 43141$), conforme demonstrado na Figura 8, segundo as estimativas do método de Evanno (Apêndice 2 e 3).



Figura 8. Resultado obtido pela aplicação do STRUCTURE com valor de $K=2$, considerando as localidades AP (Amapá), PA (Pará), PE (Pernambuco), SP (São Paulo) e PR (Paraná).

A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) identificou quatro *clusters* (Apêndice 4), no qual as amostras provenientes do Amapá, Pará e Pernambuco se apresentaram com diferentes graus de relacionamento. Uma divisão pode ser identificada na comparação entre as regiões Norte/Nordeste e Sudeste/Sul (Figura 9 e Apêndice 5).

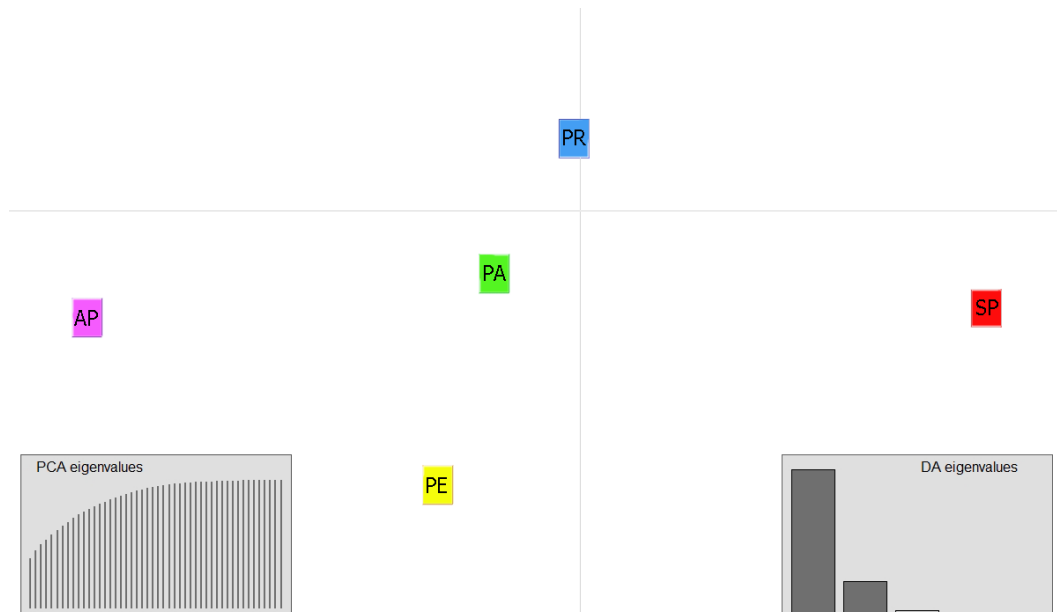


Figura 9. Análise de agrupamento realizada com 3.329 SNPs em amostras de *Pseudobatos percellens*. Gráfico do DAPC demonstrando as cinco localidades de origem das amostras, indicadas de acordo com as cores e siglas dos Estados. * AP (Amapá), PA (Pará), PE (Pernambuco), SP (São Paulo) e PR (Paraná).

As taxas de migração baseadas em estimativas do número de migrantes (Nm) entre as regiões analisadas demonstraram a existência de fluxo gênico entre as regiões Norte (Amapá e

Pará) e Nordeste (Pernambuco), com valores entre 0,33 a 0,47. Do mesmo modo, revelaram elevado fluxo gênico entre as regiões Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná), com valores entre 0,81 a 1,0. Entre a região Norte e a região Sudeste foi verificado um baixo valor de fluxo gênico, com valores entre 0,04 a 0,05, um comportamento igual foi demonstrado nas comparações entre a região Norte e a região Sul, com baixos valores de fluxo gênico, de 0,04 para as comparações nas duas direções. Entre a região Nordeste e Sudeste foi verificada a ocorrência de fluxo gênico, com valores moderados que variaram de 0,03 a 0,08; contudo, entre a região Nordeste e Sul o fluxo gênico também foi bastante baixo, com valores que variaram de 0,03 a 0,07 (Figura 10).

Os valores encontrados na rede de migração relativa para os organismos amostrados nas diferentes localidades (Figura 10) mostram maior conectividade entre as populações da região Norte e Nordeste e entre as regiões Sudeste e Sul, revelando baixo fluxo gênico quando a comparação é feita entre Norte/Nordeste x Sudeste/Sul.

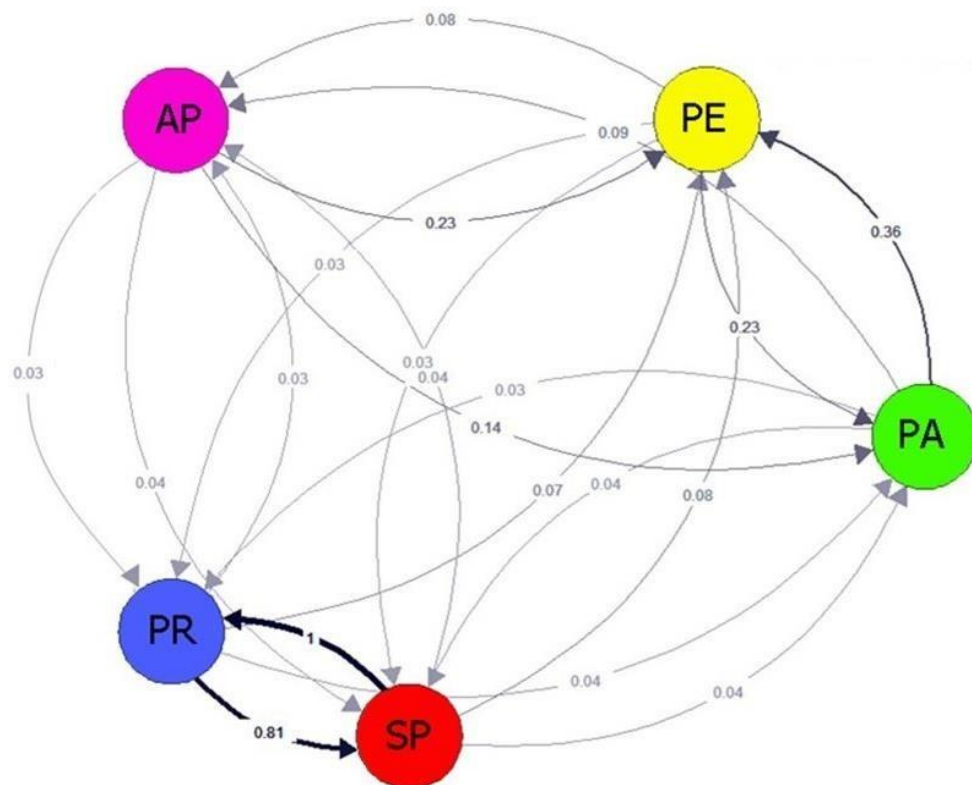


Figura 10. Rede de migração relativa entre as localidades abordadas no estudo das amostras de *Pseudobatos percellens* coletadas em diferentes localidades da costa brasileira, AP (Amapá), PA (Pará), PE (Pernambuco), SP (São Paulo) e PR (Paraná). As setas indicam a direção da migração, enquanto os números e a cor das setas, indicam as taxas relativas de migração. Números mais altos e linhas mais grossas significam a intensidade do processo de migração e conectividade entre as populações das localidades.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a diversidade genética e a estrutura genética populacional de populações de raia *Pseudobatos percellens* amostradas em cinco localidades da costa brasileira utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs. Os resultados mostraram a existência de significativa diversidade entre as amostras analisadas, com a identificação de estruturação genética entre as populações. Além disso, foi demonstrada a presença de pelo menos duas unidades de manejo regionais, a primeira composta por amostras analisadas de exemplares provenientes de localidades nos estados de Amapá, Pará e Pernambuco e a outra por amostras de exemplares provenientes de localidades nos estados de São Paulo e Paraná. Tais resultados corroboram a hipótese de que há estruturação genética, detectada com a utilização dos marcadores SNPs, sendo que os indivíduos das regiões Norte/Nordeste apresentam diferenças de estruturação e diversidade genética quando comparados com os indivíduos das regiões Sudeste/Sul.

As análises de diversidade genética revelaram que as estimativas de heterozigidade observadas (H_o) apresentaram valores acima da heterozigidade esperadas (H_e). Entre algumas espécies de raias estudadas, os valores das médias encontrados para esses fatores foram de $H_o=0.395$ e $H_e=0.342$ para *Pseudobatos percellens*, que se mostraram próximos àqueles encontrados no estudo com *Rhinoptera bonasus* (Souza *et al. in press*), que foram de $H_o=0.336$ e $H_e=0.382$. Entretanto, valores menores foram encontrados para *Bathytoshia brevicaudata* (Le Port *et al.*, 2016), que apresentou valores de $H_o=0.560$ e $H_e=0.590$; *Aetobatus narinari* (Sellas *et al.*, 2015) com média dos valores de H_o e H_e igual a 0,700; e em amostras de *P. percellens* coletadas no estado do Paraná (Ferrette, 2009), onde foram encontrados valores de $H_o=0,650$ e $H_e=0,620$.

Não obstante os valores discordantes encontrados no presente trabalho, os resultados apresentados devem ser avaliados com cautela, uma vez que o tamanho da amostra analisada em alguns locais era baixo e pode ter afetado essas estimativas.

Os resultados das análises populacionais indicaram a existência de estrutura entre os componentes das amostras utilizadas, com valores de F_{ST} significativos em nove análises pareadas ($p < 0,05$), nas comparações entre Pernambuco e Amapá, Pernambuco e Pará, São Paulo e Amapá, São Paulo e Pará, São Paulo e Pernambuco, Paraná e Amapá, Paraná e Pará, Paraná e Pernambuco e Paraná e São Paulo. Curiosamente, as estatísticas F (estimativas Φ_{ST}) geradas pela AMOVA revelaram heterogeneidade genética significativa ($p < 0,000$), com uma partição de variação genética nos três cenários testados, sendo o maior valor de Φ_{ST}

encontrado no cenário Amapá, Pará e Pernambuco contra São Paulo e Paraná. A diferenciação baseada em níveis populacionais e análises de DAPC e STRUCTURE indicaram que uma conectividade genética significativa está presente, separando os indivíduos amostrados no Norte (Amapá e Pará) e Nordeste (Pernambuco) quando comparada à conectividade genética observada entre o Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná). Além de uma conectividade genética restrita entre as populações de *P. percellens* da costa brasileira, os resultados das taxas de migração baseados em estimativas do número de migrantes sugerem que os indivíduos não se dispersam em longas distâncias, entre a região Norte/Nordeste e Sudeste/Sul, com valores muito baixos (abaixo de 0,1).

Diferentes estudos foram realizados na última década envolvendo aspectos biológicos de *P. percellens*, trazendo informações importantes sobre as condições desta espécie ao longo da costa atlântica da Colômbia e do Brasil, principalmente sobre idade, crescimento, padrões reprodutivos e migratórios dos indivíduos, entre outras (Barbosa, 2006; Yokota & Lessa, 2006; Grijalba-Bendeck *et al.*, 2007; Rocha & Gadig, 2013). Uma hipótese que poderia explicar os resultados aqui relatados é o fato de *P. percellens* realizar migrações sazonais (Vooren, 1997), sendo que tal característica pode ser relacionada a um comportamento de filopatria, com fidelidade reprodutiva ao local de nascimento. Resultados semelhantes sobre a existência de estrutura populacional em *P. percellens* foram relatados por Cruz *et al.* (2021) e em outra espécie de batoide residente *Hypanus americanus* (Richards *et al.*, 2019). Já em relação ao comportamento de filopatria, podem ser destacados estudos realizados com diferentes grupos de raias (Flowers *et al.*, 2016), *Pristis pristis* (Feutry *et al.*, 2015), *Aetobatus narinari* (Sellas *et al.*, 2015), *Bathytoshia brevicaudata* (Le Port *et al.*, 2016), *Neotrygon kuhlii* (Borsa *et al.*, 2012) e *Rhinoptera bonasus* (Souza *et al.*, *in press*).

Na costa brasileira são relatadas três regiões de berçário para raias, localizada no litoral dos estados do Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e São Paulo, esta na região de Bertioga (Springer, 1967). A presença dessas áreas sugere a possibilidade da existência de regiões que apresentam melhores fontes de alimentos e de proteção contra predadores, além do fato de que as condições ali presentes podem ajudar a contrabalançar a taxa de mortalidade precoce que pode ocorrer com os indivíduos deste grupo de organismos (Branstetter, 1987; Heupel & Simpfendorfer, 2002). Essas áreas podem incluir berçários primários, onde ocorre o parto e os jovens podem viver por um curto período de semanas ou meses, e habitats secundários para onde os juvenis se deslocam e são encontrados depois de deixar os berçários primários até atingir a maturidade (Bass, 1978).

Estudos sobre berçários realizados com diferentes espécies de raias têm revelado

padrões de comportamento e particularidades da ecologia, distribuição e comportamento dos componentes deste grupo de organismos. Estas informações compreendem aspectos biológicos que podem resultar no conhecimento da ocupação do mesmo espaço físico dos ambientes por diferentes populações e espécies em determinados espaços das suas áreas de distribuição. A existência de regiões identificadas como berçários já foi descrita para diversas espécies de raias, como para *Pseudobatos percellens* e de outras 11 espécies de elasmobrânquios no estado do Rio Grande do Norte, no nordeste brasileiro (Barbosa, 2006; Yokota & Lessa, 2006), bem como a descrição de duas regiões de berçário no sudeste do Brasil, uma no Rio de Janeiro, para *Gymnura altavela* (Gonçalves-Silva & Vianna, 2018) e outra em Bertioga, São Paulo, para *Rhinoptera bonasus* (Rangel *et al.* 2018).

Uma quinta região abrange localidades da costa paranaense como área de berçário para raias, mas ainda necessita da complementação de estudos que estão sendo realizados para comprovar as informações disponíveis, buscando dados sobre os padrões reprodutivos das diversas espécies que ocorrem nessa região. Nesse sentido, Bornatowski & Abilhoa (2012) comentam que existem registros consistentes indicando o uso dessa mesma área por recém-nascidos e juvenis das espécies de raias *Pseudobatos percellens*, *Zapteryx brevirostris*, *Dasyatis* spp. e *Rhinoptera* spp; sendo que Spier *et al.* (2018) suspeitam que a mesma área possa ser usada também por espécies de tubarões e raias como *Carcharhinus limbatus*, *Rhizoprionodon lalandii*, *Sphyrna lewini*, *Narcine brasiliensis* e *Rioraja agassizi*. Além disso, no trabalho de Vooren *et al.* (2005) foi relatado que a plataforma Sul, na região compreendida entre Passos de Torres (SC) e Chuí (RS) era usada para reprodução por 21 espécies de elasmobrânquios. Neste contexto de observações e considerando apenas uma questão de proximidade regional, pode ser suposto que indivíduos de regiões litorâneas dos estados do Amapá e do Pará poderiam usar berçários ainda desconhecido nestas regiões e também nas regiões dos países vizinhos como Colômbia, enquanto os indivíduos de Pernambuco poderiam usar o berçário do Rio Grande do Norte. Do mesmo modo, indivíduos da costa dos estados de São Paulo e Paraná tenderiam a se utilizar de possíveis berçários da costa paranaense ou de outras regiões ainda não identificadas abrangendo a região Sudeste e Sul do Brasil para reprodução, visto que muitas regiões possuem características ambientais específicas.

Outro aspecto da biologia desses organismos que merece atenção refere-se às estratégias fisiológicas e reprodutivas. Em *Pseudobatos percellens*, o início do processo de maturação sexual pode apresentar diferenças entre populações de diferentes localidades de ocorrência desta espécie (Barbosa, 2006; Yokota & Lessa, 2006; Grijalba-Bendeck *et al.*, 2007; Rocha & Gadig, 2013), sendo que tal processo pode estar sendo modulado por fatores relacionados às

condições ambientais como disponibilidade de alimentos e temperatura da água. Considera-se, pois, que as mudanças ambientais marcantes existentes nas áreas abordadas no presente estudo poderiam estar influenciando os movimentos migratórios e reprodutivos da espécie e, em decorrência, promover a estruturação das populações e a diversidade genética nos estoques.

O presente estudo indica que a raia costeira *P. percellens* exibe uma diferenciação genética significativa entre os cinco locais amostrados ao longo da costa brasileira, como resultado das análises genéticas realizadas utilizando marcadores do tipo SNPs. Deve ser considerado que estudos envolvendo aspectos de estrutura genética populacional, diversidade genética e história demográfica em tubarões e raias ainda são bastante restritos, uma vez que apenas cerca de 10% das espécies deste grupo de organismos foram investigadas (Domingues *et al.*, 2018). O conhecimento das características genéticas é importante não apenas para identificar as espécies e entender sua estrutura populacional, mas também para determinar as adequações de atividades de conservação das unidades de manejo e as prioridades de ações que devem ser realizadas para todas as regiões de distribuição geográfica de *P. percellens*.

Dentre os resultados principais do presente estudo, pode-se acrescentar que a utilização de marcadores genéticos na identificação da espécie e nas investigações da sua estrutura populacional foi bastante adequada e precisa, possibilitando a identificação das diferentes marcadores moleculares que compõem o *pool* de amostras analisadas que representam exemplares de uma espécie de raia procedentes de regiões diferentes e distantes na costa brasileira. Desse modo, foi constatado pelos resultados obtidos da análise de dados utilizando o *software* STRUCTURE que pelo menos dois componentes básicos formam o conjunto amostral de *P. percellens* analisado, considerando as amostras obtidas em localidades nos estados do Amapá, Pará, Pernambuco, São Paulo e Paraná. As análises revelaram a existência de pelo menos duas unidades de manejo regionais, a primeira composta por amostras provenientes de exemplares de localidades nos estados do Amapá, Pará e Pernambuco e a outra por amostras de exemplares de localidades nos estados de São Paulo e Paraná, formando agrupamentos para as localidades Norte e Nordeste e para as regiões Sudeste e Sul, informações estas reforçadas pela análise dos valores de fluxo gênico entre as amostras destas localidades base. Tais resultados apontam para a necessidade de continuidade do trabalho, com a realização de um amplo esforço amostral desta espécie ao longo de todo litoral do Brasil, para esclarecimento de possíveis conectividades entre os estados com as populações/estoques. Além disso, a evidência de novos estoques genéticos é crítica para reforçar as políticas de conservação neste grupo de organismos que se apresenta com um grande número de espécies ameaçadas.

6 REFERÊNCIAS

- Acevedo, K., Marino, B., Bohorquez-Herrern, J., Moreno, F., Marino, B., Moreno, C., Molina, E., Gomez-Canchong, P., Lozano, J.T., Marta, S. & Telfax, C. (2007) Tiburones y rayas (subclase elasmobranchii) descartados por la flota de arrastre camaronero en el caribe de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 12(2), 69-79.
- Afonso, M.G. & da Cunha Chaves, P.D.T. (2021) A pesca de emalhe costeiro de pequena escala no litoral do Paraná: um estudo de caso para a conservação. *Revista CEPSUL-Biodiversidade e Conservação Marinha* 10, e2021001–e2021001.
<https://doi.org/doi.org/10.37002/revistacepsul.vol10.1754e2021001>
- Allendorf, F.W., Bayles, D., Bottom, D.L., Currens, K.P., Frissell, C.A., Lichatowich, J.A., Nehlsen, W., Trotter, P.C. & Williams, T.H. (1997) Prioritizing Pacific Salmon Stocks for Conservation. *Conservation Biology* 11, 140–152.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1997.95248.x>
- Allendorf, F.W., Hohenlohe, P.A. & Luikart, G. (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*. 11, 697–709.
<https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Alter, E.S., Tariq, L., Creed, J.K. & Megafu, E. (2020) Evolutionary responses of marine organisms to urbanized seascapes. *Evolutionary Applications* 14, 210–232.
<https://doi.org/10.1111/eva.13048>
- Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed: 18 Mar 2021.
- Andrews, K.R., Adams, J.R., Cassirer, E.F., Plowright, R.K., Gardner, C., Dwire, M., & Waits, L. P. (2018). A bioinformatic pipeline for identifying informative SNP panels for parentage assignment from RAD seq data. *Molecular ecology resources*, 18(6), 1263-1281.
- Andrews, K.R., Hunter, S.S., Torrevillas, B.K., Céspedes, N., Garrison, S.M., Strickland, J., & Luckhart, S. (2021). A new mouse SNP genotyping assay for speed congenics: combining flexibility, affordability, and power. *BMC genomics*, 22(1), 1-12.
- Araujo, N.L.F., Lopes, C.A., Brito, V.B. & Neves, L. (2020) Artisanally Landed Elasmobranchs along the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 30, 33–53.
- Arlinghaus, R., Cooke, S.J., Sutton, S.G., Danylchuk, A.J., Potts, W., Freire, K. de M.F., Alós, J., da Silva, E.T., Cowx, I.G. & van Anrooy, R. (2016) Recommendations for the future of recreational fisheries to prepare the social-ecological system to cope with change. *Fisheries Management and Ecology*, 23, 177–186.
<https://doi.org/10.1111/fme.12191>
- Aschliman, N.C., Nishida, M., Miya, M., Inoue, J.G., Rosana, K.M. & Naylor, G.J.P. (2012) Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). *Molecular Phylogenetics. and Evolution*, 63, 28–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.012>

- Barbosa, T. Aspectos da biologia de *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) no berçário de Caiçara do Norte (RN). (2006). Monografia de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE. 42p.
- Bass, A.J. (1978). Problems in studies of sharks in the southwest Indian Ocean. pp. 545 – 594. In: E.S. Hogdson & R.F. Mathewson, (eds.), *Sensory biology of sharks, skates and rays*. Office of Naval Research Department of Navy, Arlington.
- Bellido, J.M., Pennino, M.G., Valeiras, X. & Pierce, G.J. (2011) Fishery discards and bycatch: Solutions for an ecosystem approach to fisheries management? *Hydrobiologia*, 670, 317–333.
<https://doi.org/10.1007/s10750-011-0721-5>
- Bernard, A. M., Finnegan, K. A., Pavinski Bitar, P., Stanhope, M. J., & Shivji, M. S. (2021). Genomic assessment of global population structure in a highly migratory and habitat versatile apex predator, the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *Journal of Heredity*, esab046.
- Bernardo, C., Corrêa de Lima Adachi, A.M., Paes da Cruz, V., Foresti, F., Loose, R.H. & Bornatowski, H. (2020). The label “Cação” is a shark or a ray and can be a threatened species! Elasmobranch trade in Southern Brazil unveiled by DNA barcoding. *Marine Policy*, 116, 103920.
<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103920>
- Bigelow, H.B. & Schroeder, W.C. (1953) *Fishes of the western north Atlantic*. Part 2. Sawfishes, guitarfishes, skates and rays. Yale University. New Haven. Connecticut.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bornatowski, H. & Abilhoa, V. (2012) *Tubarões e raias capturados pela pesca artesanal no Paraná: guia de identificação*. Hori Consultoria Ambiental, Curitiba, 124 pp.
- Bornatowski, H., Robert, M. de C. & Costa, L. (2010) Feeding of guitarfish *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1972) (Elasmobranchii, Rhinobatidae), the target of artisanal fishery in southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58, 45–52.
<https://doi.org/10.1590/S1679-87592010000100005>
- Borsa, P., Arlyza, I.S., Laporte, M., Berrebi, P. (2012) Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438, 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.09.010>
- Bradbury, I.R., Hamilton, L.C., Dempson, B., Robertson, M.J., Bourret, V., Bernatchez, L. & Verspoor, E. (2015) Transatlantic secondary contact in Atlantic Salmon, comparing microsatellites, a single nucleotide polymorphism array and restriction-site associated DNA sequencing for the resolution of complex spatial structure. *Molecular Ecology* 24, 5130–5144.
<https://doi.org/10.1111/mec.13395>

- Brandies, P., Peel, E., Hogg, C. & Belov, K. (2019). The value of reference genomes in the conservation of threatened species. *Genes* 10(11), 846.
<https://doi.org/10.3390/genes10110846>
- Branstetter, S. 1987. Age, growth and reproductive biology of the silky shark, *Carcharhinus falciformes*, and the scalloped hammerheads *Sphyrna lewini*, from the northwestern Gulf of Mexico. *Environ. Biol. Fish.* 19(3): 161_173.
- Brennan, R.S., Galvez, F. & Whitehead, A. (2015) Reciprocal osmotic challenges reveal mechanisms of divergence in phenotypic plasticity in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology* 218, 1212–1222.
<https://doi.org/10.1242/jeb.110445>
- Caltabellotta, F.P., Siders, Z.A., Murie, D.J., Motta, F.S., Cailliet, G.M. & Gadig, O.B.F. (2019). Age and growth of three endemic threatened guitarfishes *Pseudobatos horkelii*, *P. percellens* and *Zapteryx brevirostris* in the western South Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology* 95, 1236–1248.
<https://doi.org/10.1111/jfb.14123>
- Campos, M., Conn, J.E., Alonso, D.P., Vinetz, J.M., Emerson, K.J. & Ribolla, P.E.M. (2017). Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasites & Vectors* 10, 76.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2014-y>
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. & Postlethwait, J.H. (2011) *Stacks*: Building and genotyping loci *de novo* from short-read sequences. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 1, 171–182.
<https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>
- Cheung, W.W.L., Frölicher, T.L., Jones, M.C. & Reygondeau, G. (2018) Opportunities for climate-risk reduction through effective fisheries management. *Global change biology*, 24, 5149–5163.
<https://doi.org/10.1111/gcb.14390>
- Compagno, L.J.V. (1999). Checklist of living elasmobranchs. p. 471-498. In: Hamlett, W.C., (Eds). *Sharks, skates and rays: the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, Johns Hopkins Univ. Press.
- Costa, L. & Chaves, P. de T. da C. (2006). Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. *Biota Neotropica* 6.
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000300007>
- Cruz, V.P., Vera, M., Pardo, B.G., Taggart, J., Martinez, P., Oliveira, C. & Foresti, F. (2016). Identification and validation of single nucleotide polymorphisms as tools to detect hybridization and population structure in freshwater stingrays. *Molecular Ecology Resources*, 17(3):550-556.
- Cruz, V.P, Adachi, A.M., Oliveira, P. H., Ribeiro, G.S., Paim, F.G., Souza, B.C., Rodrigues, A.S.F., Vianna, M., Delpiana, S.M., Astarloa, J.M.D., Rotundo, M.M., Mendonça, F.F., Oliveira, C., Lessa, R.P. & Foresti, F. (2021). Genetic diversity in two threatened species of

- guitarfish (Elasmobranchii: Rhinobatidae) from the Brazilian and Argentinian coasts: an alert for conservation. *Neotropical Ichthyology*, 19(2), e210012.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0012>
- De Paula, S.A. & De Mello, L.F. (2019). As mudanças ambientais e suas dimensões no Antropoceno e no Capitaloceno. Anais do XXI Encontro Nacional de Estudos Populacionais. Disponível em: <http://www.abep.org.br/xxiencontro/arquivos/R0259-2.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2020
- Devloo-Delva, F., Maes, G.E., Hernández, S.I., Mcallister, J.D., Gunasekera, R.M., Grewe, P.M., & Feutry, P. (2019). Accounting for kin sampling reveals genetic connectivity in Tasmanian and New Zealand school sharks, *Galeorhinus galeus*. *Ecology and evolution*, 9(8), 4465 – 4472.
- Domingues, R.R., Hilsdorf, A.W.S. & Gadig, O.B.F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 19, 501–525.
<https://doi.org/10.1007/s10592-017-1038-3>
- Driller, M., Vilaça, S.T., Arantes, L.S., Carrasco-Valenzuela, T., Heeger, F., Chevallier, D., De Thoisy, B. & Mazzoni, C.J. (2020) Optimization of ddRAD-like data leads to high quality sets of reduced representation single copy orthologs (R2SCOs) in a sea turtle multi-species analysis. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.03.024331>
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavanagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N., Fordham, S.V., Francis, M.P., Pollock, C.M., Simpfendorfer, C.A., Burgess, G.H., Carpenter, K.E., Compagno, L.J., Ebert, D.A., Gibson, C., Heupel, M.R., Livingstone, S.R., Sanciangco, J.C., Stevens, J.D., Valenti, S. & White, W.T. (2014) Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife* 3, e00590.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00590>
- Dulvy, N.K., Simpfendorfer, C.A., Davidson, L.N.K., Fordham, S.V., Bräutigam, A., Sant, G. & Welch, D.J. (2017). Challenges and priorities in shark and ray conservation. *Current Biology*, 27, R565–R572.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.038>
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32, 3047–3048.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fargeot, L., Loot, G., Prunier, J.G., Rey, O., Veysière, C. & Blanchet, S. (2021) Patterns of

- epigenetic diversity in two sympatric fish species: genetic vs. environmental determinants. *Genes* 12, 107.
<https://doi.org/10.3390/genes12010107>
- Ferrette, B.L.S. (2009). Marcadores de Microsatélites para estudos de conservação da Raia-viola *Rhinobatos percellens* (Chondrichthyes, Rhinobatidae). Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/119063>. Acesso em: 28 Jun 2021.
- Ferrette, B.L. da S., Domingues, R.R., Rotundo, M.M., Miranda, M.P., Bunholi, I.V., De Biasi, J.B., Oliveira, C., Foresti, F. & Mendonça, F.F. (2019). DNA Barcode reveals the bycatch of endangered batoids species in the Southwest Atlantic: Implications for sustainable fisheries, management and conservation efforts. *Genes* 10, 304.
<https://doi.org/10.3390/genes10040304>
- Feutry, P., Kyne, P., Pillans, R., Chen, X., Marthick, J., Morgan, D., et al. (2015). Whole mitogenome sequencing refines population structure of the critically endangered sawfish *Pristis pristis*. *Marine Ecology Progress Series*, 533, 237–44.
<https://doi.org/10.3354/meps11354>
- Field, I.C., Meekan, M.G., Buckworth, R.C. & Bradshaw, C.J.A. (2009). Susceptibility of sharks, rays and chimaeras to global extinction. pp. 275–363. In: *Advances in Marine Biology*. Elsevier.
- Figueiredo, J. L. *Manual dos peixes marinhos do Sudeste do Brasil*. I. Introdução. Cações, raias e quimeras. (1977). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 104 p.
- Flowers, K.I., Ajemian, M.J., Bassos-Hull, K., Feldheim, K.A., Hueter, R.E., Papastamatiou, Y.P., et al. (2016) A review of batoid philopatry, with implications for future research and population management. *Marine Ecology Progress Series*, 562, 251–61.
<https://doi.org/10.3354/meps11963>
- Frank, S.A. (2011) Natural selection. II. Developmental variability and evolutionary rate. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 2310–2320.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02373.x>
- Fraser, D.J. & Bernatchez, L. (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10, 2741–2752.
<https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01411.x>
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. & Van der Laan, R. (2021) *Eschmeyer's catalog of fishes: species by family/subfamily*. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Accessed: 18 Mar 2021.
- Frisk, M. (2010) Life History Strategies of Batoids. pp. 283–316. In: *Sharks and Their Relatives II*. MarineBiology. CRC Press.
- Frisk, M.G., Miller, T.J. & Fogarty, M.J. (2001) Estimation and analysis of biological parameters in elasmobranch fishes: A comparative life history study. *Canadian Journal of*

- Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, 969–981.
<https://doi.org/10.1139/f01-051>
- Funk, W.C., McKay, J.K., Hohenlohe, P.A. & Allendorf, F.W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27 (9), 489-96.
- Gomes, U.L., Santos, H.R.S., Gadig, O.B.F., Signori, C.N. & Vicente, M.M. (2019) Identification Guide of sharks, batoids and chimaeroids from Rio de Janeiro State (Chondrichthyes: Elasmobranchii e Holocephali). *Revista Nordestina de Biologia*, 27.
- Gonçalves-Silva, F. & Vianna, M. (2018) Use of a species-rich and degraded tropical estuary by Elasmobranchs. *Brazilian Journal of Oceanography* 66, 339–346.
<https://doi.org/10.1590/s1679-87592018020106604>
- Grijalba-Bendeck, M., Polo Silva, C. & Acero, P. (2007). Una aproximación a la abundancia de los batoideos capturados artesanalmente en Santa Marta (Colombia). *Bulletin of Marine and Coastal Research*, 36.
<https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2007.36.0.209>
- Grijalba-Bendeck, M., Acero, A., & González, E. (2008). Biología reproductiva de *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) (Batoidea: Rajiformes) en el Caribe colombiano. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(3), 469-481.
- Haasl, R.J. & Payseur, B.A. (2016) Fifteen years of genomewide scans for selection: trends, lessons, and unaddressed genetic sources of complication. *Molecular Ecology*, 25, 5–23.
<https://doi.org/10.1111/mec.13339>
- Haggarty, D.R., Martell, S.J.D. & Shurin, J.B. (2016). Lack of recreational fishing compliance may compromise effectiveness of rockfish conservation areas in British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 73, 1587–1598.
<https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0205>
- Hannesson, R. (2020) The Nash-Cournot approach to shared fish Stocks: An empirical investigation. *Marine Policy* 118, 103978.
<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103978>
- Hansen, J., Sato, M. & Ruedy, R. (2012) Perception of climate change. *Proceedings of the Nat. Academy of Sciences* 109, E2415–E2423.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1205276109>
- Harasti, D., Davis, T.R., Jordan, A., Erskine, L. & Moltschaniwskyj, N. (2019). Illegal recreational fishing causes a decline in a fishery targeted species (Snapper: *Chrysophrys auratus*) within a remote no-take marine protected area C. A. Radford (Ed). *PLOS ONE*, 14, e0209926.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209926>
- Heupel, M.R. & Simpfendorfer, C.A. (2002). Estimation of mortality of juvenile blacktip sharks, *Carcharhinus limbatus*, within a nursery area using telemetry data. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, 624 – 632.

- Heupel, M., Carlson, J. & Simpfendorfer, C. (2007). Shark nursery areas: Concepts, definition, characterization, and assumptions. *Marine Ecology Progress Series*, 337, 287–297.
<https://doi.org/10.3354/meps337287>
- ICMBio. (2018) *Lista Vermelha do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies-dados-insuficientes>. Acesso em: 18 out 2021
- Jombart, T. & Ahmed, I. (2011) Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070–3071.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jorde, P.E., Kleiven, A.R., Sodeland, M., Olsen, E.M., Ferter, K., Jentoft, S. & Knutsen, H. (2018). Who is fishing on what stock: Population-of-origin of individual cod (*Gadus morhua*) in commercial and recreational fisheries W. S. Grant (Ed). *ICES Journal of Marine Science*, 75, 2153–2162.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy080>
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W. & Prodöhl, P.A. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(8), 782-788.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179-1191.
- Kumar, S., Banks, T.W. & Cloutier, S. (2012). SNP Discovery through Next-Generation Sequencing and its applications. *International Journal of Plant Genomics*, 2012, 1–15.
<https://doi.org/10.1155/2012/831460>
- Lado, S., Elbers, J.P., Doskocil, A., Scaglione, D., Trucchi, E., Banabazi, M.H., Almathen, F., Saitou, N., Ciani, E. & Burger, P.A. (2020). Genome-wide diversity and global migration patterns in dromedaries follow ancient caravan routes. *Communications Biology* 3, 387.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-1098-7>
- Langella, O. (1999) *Populations*. Disponível em: <http://www.cnrs-gif.fr/pge>. Acesso em: 18 Mar 2021.
- Last, P.R., White, W.T., Carvalho, M.R. de, Seret, B., Stehmann, M., Naylor, G.J.P. & Marshall, L. (2016) *Rays of the world*. CSIRO publishing.
- Le Cam, S., Daguin-Thiébaud, C., Bouchemousse, S., Engelen, A.H., Mieszkowska, N. & Viard, F. (2020). A genome-wide investigation of the worldwide invader *Sargassum muticum* shows high success albeit (almost) no genetic diversity. *Evolutionary Applications* 13, 500–514.
<https://doi.org/10.1111/eva.12837>
- Le Port, A., Roycroft, E.J., Thakur, V., Lavery, S.D. (2016). Characterisation of eleven new polymorphic microsatellite markers for the coastal stingray *Dasyatis brevicaudata*

- (Dasyatidae Hutton 1875), and cross-amplification in seven dasyatid species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 65, 234–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.009>
- Lewin, W.C., Weltersbach, M.S., Ferter, K., Hyder, K., Mugerza, E., Prellezo, R., Radford, Z., Zarauz, L. & Strehlow, H.V. (2019). Potential environmental impacts of recreational fishing on marine fish stocks and ecosystems. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 27, 287–330.
<https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1586829>
- Li, Y.L. & Liu, J.X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 176–177.
- Liedtke, H.C., Gower, D.J., Wilkinson, M. & Gomez-Mestre, I. (2018). Macroevolutionary shift in the size of amphibian genomes and the role of life history and climate. *Nature Ecology & Evolution* 2, 1792–1799.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0674-4>
- Lotterhos, K.E. & Whitlock, M.C. (2014) Evaluation of demographic history and neutral parameterization on the performance of F_{ST} outlier tests. *Molecular Ecology* 23, 2178–2192.
<https://doi.org/10.1111/mec.12725>
- Lujan, N.K., Weir, J.T., Noonan, B.P., Lovejoy, N.R. & Mandrak, N.E. (2020). Is Niagara Falls a barrier to gene flow in riverine fishes? A test using genome-wide SNP data from seven native species. *Molecular Ecology* 29, 1235–1249.
<https://doi.org/10.1111/mec.15406>
- Mao, Z., Gu, X., Cao, Y., Luo, J., Zeng, Q., Chen, H. & Jeppesen, E. (2021). How does fish functional diversity respond to environmental changes in two large shallow lakes? *Science of The Total Environment* 753, 142158.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142158>
- Marandel, F., Charrier, G., Lamy, J. B., Le Cam, S., Lorance, P., & Trenkel, V. M. (2020). Estimating effective population size using RADseq: Effects of SNP selection and sample size. *Ecology and evolution*, 10(4), 1929–1937.
- Marques, J.M.L., Cruz, R. & Feitosa, C.V. (2021). Dynamics of artisanal fisheries performed with hook-and-line gear under different management regimes in Brazil. *Ocean & Coastal Management* 200, 105403.
<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105403>
- McEachran, J.D. & de Carvalho, M.R. (2002). Batoid fishes. In: *The living marine resources of the Western Central Atlantic*. Kent E. Carpenter, Rome.
- McMahon, C.R. & Hays, G.C. (2006). Thermal niche, large-scale movements and implications of climate change for a critically endangered marine vertebrate. *Global Change Biology* 12, 1330–1338.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01174.x>

- Meneses, T.S., Santos, F.N. & Pereira, C.W. (2005) Fauna de Elasmobrânquios do litoral do estado de Sergipe, Brasil. *Arquivo de Ciências do Mar*. 38, 79–83.
- Momigliano, P., Harcourt, R., Robbins, W.D., Jaiteh, V., Mahardika, G.N., Sembiring, A. & Stow, A. (2017). Genetic structure and signatures of selection in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Heredity*, 119(3), 142–153.
- Morin, P.A., Luikart, G. & Wayne, R.K. (2004). SNPs in ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 208–216.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- Murawski, S.A., Peebles, E.B., Gracia, A., Tunnell, J.W. & Armenteros, M. (2018). Comparative abundance, species composition, and demographics of continental shelffish assemblages throughout the Gulf of Mexico. *Marine and Coastal Fisheries* 10, 325–346.
<https://doi.org/10.1002/mcf2.10033>
- Myers, R.A. & Worm, B. (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes J. R. Beddington and G. P. Kirkwood (Eds). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 13–20.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1573>
- Narum, S.R. (2011). Comparison of F_{ST} outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* 11, 184–194.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02987.x>
- Norman, A.J., Putnam, A.S. & Ivy, J.A. (2019) Use of molecular data in zoo and aquarium collection management: Benefits, challenges, and best practices. *Zoo biology* 38, 106–118.
<https://doi.org/doi.org/10.1002/zoo.21451>
- Oyler-McCance, S.J., Oh, K.P., Langin, K.M. & Aldridge, C.L. (2016). A field ornithologist's guide to genomics: Practical considerations for ecology and conservation. *The Auk*, 133, 626–648.
<https://doi.org/10.1642/AUK-16-49.1>
- Pardo-Diaz, C., Salazar, C. & Jiggins, C.D. (2014). Towards the identification of the loci of adaptive evolution. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 445–464.
<https://doi.org/doi.org/10.1111/2041-210X.12324>
- Pazmiño, D. A., Maes, G. E., Simpfendorfer, C. A., Salinas-de-León, P., & van Herwerden, L. (2017). Genome-wide SNPs reveal low effective population size within confined management units of the highly vagile Galapagos shark (*Carcharhinus galapagensis*). *Conservation Genetics*, 18(5), 1151–1163.
- Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S. & Hoekstra, H.E. (2012). Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species L. Orlando (Ed). *PLoS ONE* 7, e37135.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Pieraccini, M., Coppa, S. & De Lucia, G.A. (2017). Beyond marine paper parks? Regulation theory to assess and address environmental non-compliance: Environmental non-

- compliance in MPAs. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27,177–196.
<https://doi.org/10.1002/aqc.2632>
- Pollom, R., Charvet, P., Avalos, C., Blanco-Parra, M., Derrick, D., Espinoza, E., Faria, V., Herman, K., Mejía-Falla, P.A., Motta, F., Nunes, J., Rincon, G. & Dulvy, N.K. (2020) *Pseudobatos percellens*. The IUCN Red List of threatened species, e.T161373A887217.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T161373A887217>
- Price, T.D., Qvarnström, A. & Irwin, D.E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 1433–1440.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2372>
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Puechmaille, S.J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 608-627.
- Radersma, R., Noble, D.W.A. & Uller, T. (2020). Plasticity leaves a phenotypic signature during local adaptation. *Evolution Letters*, 4, 360–370.
<https://doi.org/10.1002/evl3.185>
- Rangel, B.S., Rodrigues, A., Moreira, R.G. (2018) Use of a nursery area by cownose rays (Rhinopteridae) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 16(1).
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170089>
- Reid, N.M., Proestou, D.A., Clark, B.W., Warren, W.C., Colbourne, J.K., Shaw, J.R., Karchner, S.I., Hahn, M.E., Nacci, D., Oleksiak, M.F., Crawford, D.L. & Whitehead, A. (2016). The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science*, 354, 1305–1308.
<https://doi.org/10.1126/science.aah4993>
- Richards, V.P., DeBiase, M.B., Shivji, M. (2019). Deep mitochondrial lineage divergence among populations of the southern stingray *Hypanus americanus* (Hildebrand & Schroeder, 1928) throughout the Southeastern United States and Caribbean. *Marine Biodiversity*, 49(4), 1627–34.
<https://doi.org/10.1007/s12526-018-0930-5>
- Rocha, F. & Gadig, O.B.F. (2013). Reproductive biology of the guitarfish *Rhinobatos percellens* (Chondrichthyes, Rhinobatidae) from the São Paulo Coast, Brazil, western South Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 82, 306–317.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03493.x>
- Rodrigues, N.T., Souza, M.R. de, Peixer, J. & Amorim, A.F. (2021). Identification of elasmobranchs in Caraguatatuba City, São Paulo State (2018-19). *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4, 452–466.
<https://doi.org/10.34188/bjaerv4n1-039>

- Rose, G.A. (2005). On distributional responses of North Atlantic fish to climate change. *ICES Journal of Marine Science* 62, 1360–1374.
<https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.05.007>
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103-106.
- Sellas, A.B., Bassos-Hull, K., Perez-Jimenez, J.C., Angulo-Valdes, J.A., Bernal, M.A., Hueter, R.E. (2015). Population structure and seasonal migration of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*. *Journal of Heredity*, 106(3), 266–75.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esv011>
- Séret, B., Last, P.R. & Naylor, G.J.P. (2016). Guitarfishes Family Rhinobatidae: subcapítulo 13 (Choala Guitarfish). In: *Rays of the World*. CSIRO Publishing, 169–194.
- Simões, M.A. (2020). Molecular identification of shark and ray meat (Elasmobranchii) distributed in Rio de Janeiro, Brazil. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Spier, D., Gerum, H.L.N., Bornatowski, H., Contente, R., Mattos, N.A.S., Vilar, C.C. & Spach, H.L. (2018). Ichthyofauna of the inner shelf of Paraná, Brazil: checklist, geographic distribution, economic importance and conservation status. *Biota Neotropica*, 18.
<https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0385>
- Springer, S. (1967). Social organization of shark populations. pp. 149 – 174. In: P.W. Gilbert, R.F. Matheson & D.P. Rall, (eds.), *Sharks, Skates and Rays*, John Hopkins Press, Baltimore.
- Stein, R.W., Mull, C.G., Kuhn, T.S., Aschliman, N.C., Davidson, L.N., Joy, J.B. & Mooers, A. O. (2018). Global priorities for conserving the evolutionary history of sharks, rays and chimaeras. *Nature ecology & evolution*, 2(2), 288-298.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P. & Kleinhans, D. (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and evolution*, 6(11), 3461-3475.
- Supple, M.A. & Shapiro, B. (2018) Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biology* 19, 131.
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1520-3>
- Tu, C.-Y., Chen, K.-T. & Hsieh, C. (2018). Fishing and temperature effects on the size structure of exploited fish stocks. *Scientific Reports*, 8, 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25403-x>
- Verba, J.T., Pennino, M.G., Coll, M. & Lopes, P.F.M. (2020). Assessing drivers of tropical and subtropical marine fish collapses of Brazilian Exclusive Economic Zone. *Science of the Total Environment*, 702, 134940.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134940>
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34,275–305.
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>

- Vooren, C.M. (1997) Demersal elasmobranchs. In: Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. (Eds). *Subtropical convergence environment: the coast and the sea in the Southwestern Atlantic*. Berlin: Springer.
- Vooren, C.M., Klippel, S. & Projeto “Salvar Seláquios do Sul do Brasil” eds. (2005). *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Igaré, Porto Alegre, 261 pp.
- Weigmann, S. (2016). Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, 88, 837–1037.
<https://doi.org/10.1111/jfb.12874>
- West-Eberhard, M.J. (2003) *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H. & Plasterk, R.H.A. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nature genetics*, 28, 160–164.
<https://doi.org/doi/10.1038/88878>
- Wold, J., Galla, S., Eccles, D., Hogg, C.J., Koepfli, K.-P., Lec, M.L., Guhlin, J., Price, K., Roberts, J. & Steeves, T. (2021). *Expanding the conservation genomics toolbox: incorporating structural variants to enhance functional studies for species of conservation concern*. Preprints.
- Yokota, L. & Lessa, R.P. (2006) A nursery area for sharks and rays in Northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75, 349–360.
<https://doi.org/10.1007/s10641-006-0038-9>
- Zimmerman, S.J., Aldridge, C.L. & Oyler-McCance, S.J. (2020). An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. *BMC Genomics* 21, 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9>

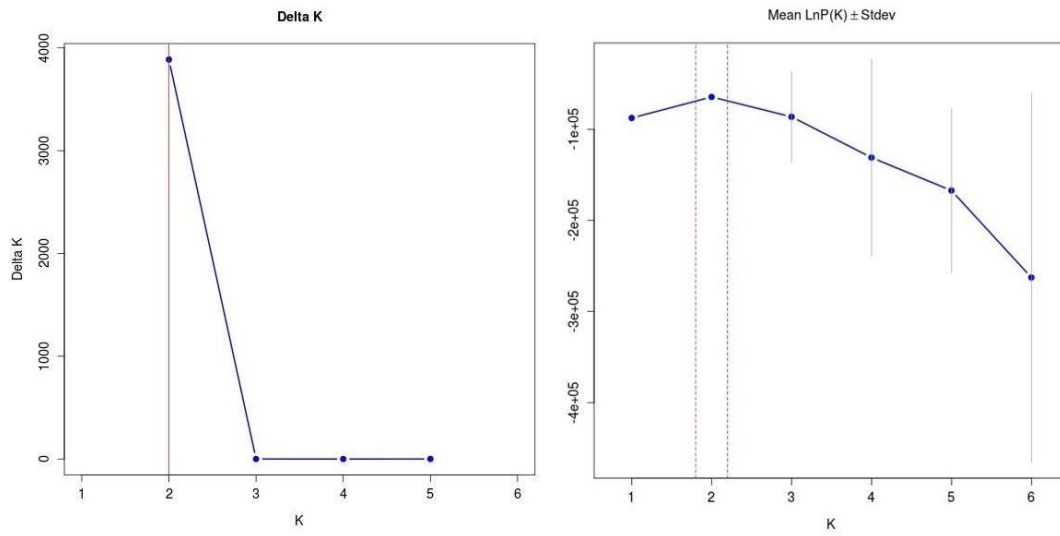
APÊNDICES

Apêndice 1. Identificação da amostra (*vouchers*), estado e sumário do sequenciamento *ddRAD* e processamento das sequências em indivíduos de *Pseudobatos percellens* nas localidades analisadas da costa do Brasil. *Raw Data*: número de sequências obtidas; (% *Remaining*) porcentagem final de sequências filtradas em relação ao *Raw Data*.

<i>Voucher</i>	<i>Localidade</i>	<i>Raw Date</i>	<i>Final</i>	<i>% Remaining</i>
98002	Pará	1.789.388	1.494.963	83,55%
94712	Pará	1.834.347	1.503.568	81,97%
94990	Pará	1.568.179	1.359.066	86,67%
101449	Pará	1.246.354	924.580	74,18%
101450	Pará	1.780.418	1.494.963	83,97%
85543	Amapá	1.592.634	1.240.322	77,88%
85690	Amapá	207.416	175.933	84,82%
88234	Amapá	1.762.517	1.341.711	76,12%
1PE	Pernambuco	1.421.034	1.105.420	77,79%
2PE	Pernambuco	1.198.502	907.854	75,75%
3PE	Pernambuco	1.728.967	1.499.587	86,73%
4PE	Pernambuco	1.324.023	982.652	74,22%
5PE	Pernambuco	1.221.237	1.012.540	82,91%
6PE	Pernambuco	1.722.904	1.555.572	90,29%
7PE	Pernambuco	1.667.441	1.394.922	83,66%
8PE	Pernambuco	1.358.980	975.245	71,76%
11PE	Pernambuco	1.939.233	1.394.922	71,93%
12PE	Pernambuco	3.044.497	2.538.142	83,37%
13PE	Pernambuco	1.780.229	1.628.563	91,48%
14PE	Pernambuco	1.503.580	1.377.005	91,58%
15PE	Pernambuco	1.664.632	1.580.071	94,92%
16PE	Pernambuco	1.678.142	1.493.681	89,01%
1001	São Paulo	1.829.515	1.526.873	83,46%
1002	São Paulo	1.333.021	974.521	73,11%
1003	São Paulo	1.362.623	1.098.248	80,60%
1005	São Paulo	2.081.031	1.845.214	88,67%
1006	São Paulo	1.350.320	1.024.103	75,84%
1007	São Paulo	1.299.510	992.452	76,37%
1009	São Paulo	1.747.620	1.363.464	78,02%
1010	São Paulo	2.406.931	2.168.945	90,11%
1011	São Paulo	1.458.652	1.203.547	82,51%
1012	São Paulo	1.979.983	1.376.701	69,53%
1014	São Paulo	1.875.725	1.055.045	56,25%

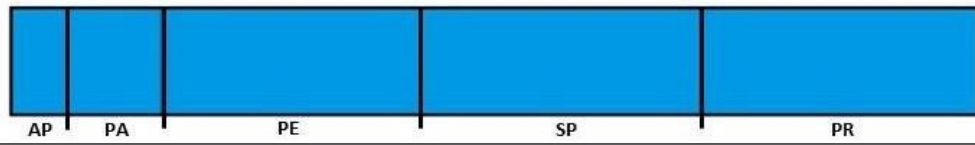
1015	São Paulo	1.799.062	1.509.097	83,88%
78396	São Paulo	1.692.726	1.418.166	83,78%
78398	São Paulo	1.933.800	1.518.304	78,51%
78412	São Paulo	1.632.519	1.432.462	87,75%
PR02	Paraná	1.232.281	921.452	74,78%
PR04	Paraná	1.704.999	852.003	79,26%
PR06	Paraná	1.311.201	909.852	69,39%
PR12	Paraná	1.488.771	1.123.050	75,43%
PR19	Paraná	1.088.741	869.231	79,84%
PR21	Paraná	1.666.212	1.320.547	79,25%
PR35	Paraná	1.464.214	1.180.357	80,61%
39623	Paraná	2.221.370	1.997.624	89,93%
39629	Paraná	2.009.598	1.859.092	92,51%
39635	Paraná	1.922.036	1.697.671	88,33%
39636	Paraná	2.088.145	1.776.926	85,10%
39639	Paraná	1.527.188	1.324.798	86,75%
39641	Paraná	2.942.812	2.578.145	87,61%
39642	Paraná	1.401.230	1.024.125	73,09%
39648	Paraná	2.062.981	1.834.540	88,93%
Total		86.319.471	70.757.837	
Média		1.659.990	1.360.728	81,42%

Apêndice 2. Estimativa do método de Evanno, que demonstrou a maior probabilidade de clusters de $k=2$ ($(\ln(P) D) 3886 \pm 43141$).

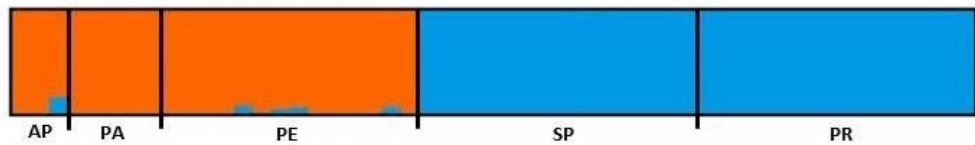


Apêndice 3. Resultado do STRUCTURE com valores de $k=1-6$ considerando as localidades AP (Amapá), PA (Pará), PE (Pernambuco), SP (São Paulo) e PR (Paraná).

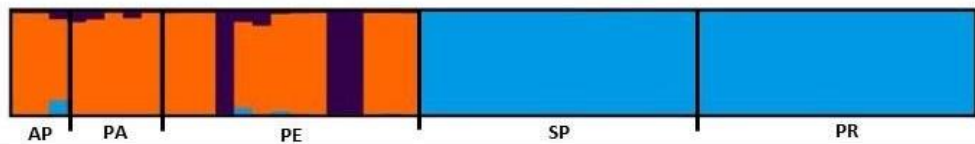
K=1



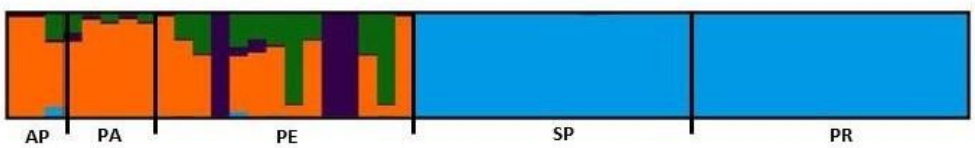
K=2



K=3



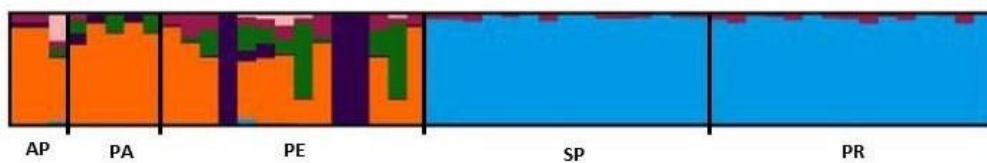
K=4



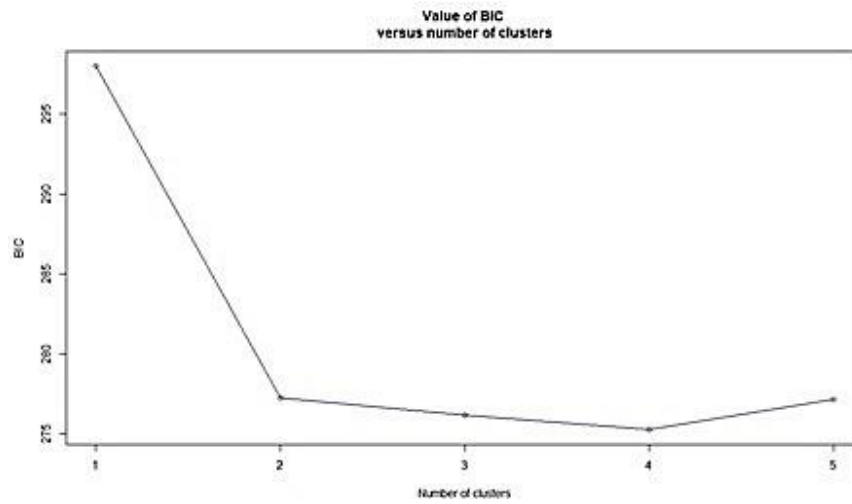
K=5



K=6



Apêndice 4. Número ideal de cluster $k = 4$ identificado utilizando o *Bayesian Information Criterion* (BIC), para a Análise de DAPC.



Apêndice 5. Gráfico obtido da análise de DAPC, onde as amostras são divididas de acordo com a maior probabilidade de compartilhamento de genótipos, no caso cinco genótipos. É possível através do gráfico observar que todas as amostras da localidade do Amapá (AP) pertencem ao mesmo genótipo (representado pela cor roxo). O mesmo acontece com todas as amostras das localidades de São Paulo (SP) e Paraná (PR) que pertencem a um mesmo genótipo (representado pela cor marrom). Porém é possível observar também, que as 14 amostras da localidade de Pernambuco (PE) compartilham três genótipos (representados pelas cores laranja, verde e azul). E por último, as amostras do estado do Pará (PA) compartilham dois genótipos (com a grande maioria compartilhando o genótipo representado pela verde, e apenas uma representada pela cor roxo).

