

**Diversidade genética e análise de parentesco em tubarões da  
espécie *Squalus acanthias* (Chondrichthyes: Squalidae) no oceano  
Atlântico, por meio de SNPs**

**Beatriz Rochitti Boza**

**Botucatu-SP**

**2022**

**Diversidade genética e análise de parentesco em tubarões da  
espécie *Squalus acanthias* (Chondrichthyes: Squalidae) no oceano  
Atlântico por meio de SNPs**

Aluna: Beatriz Rochitti Boza

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Claudio de Oliveira

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Vanessa Paes da Cruz

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

**Botucatu – SP**

**2022**

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

Boza, Beatriz Rochitti.

Diversidade genética e análise de parentesco em tubarões da espécie *Squalus acanthias* (Chondrichthyes: Squalidae) no oceano Atlântico, por meio de SNPs / Beatriz Rochitti Boza.  
- Botucatu, 2022

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

Orientador: Claudio Oliveira

Coorientador: Vanessa Paes da Cruz

Capes: 20204000

1. Tubarão (Peixe) - Conservação. 2. Diversidade genética.  
3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Genômica.

Palavras-chave: Conservação; Genômica; NGS; SNPs; Tubarões.

*Dedico à minha mãe, que é meu porto seguro.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus por todas as oportunidades concedidas em minha vida.

À minha família, principalmente minha mãe, que sempre foi meu exemplo de garra e força. Te amo, mãe. Nós conseguimos vencer mais uma batalha.

Ao meu orientador, Professor Cláudio, por ter me aceitado em 2016 como IC e por ter continuado comigo nesse longo caminho, agregando conhecimento e bom humor aos meus dias.

À minha co-orientadora e amiga, Vanessa, que é um exemplo de liderança, companheirismo, e acima de tudo amizade.

Ao Professor Fausto, que sempre se faz presente em meus trabalhos, adicionando todo conhecimento e carinho.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e a todos que fazem parte desse lugar incrível, que é mais do que um local de trabalho, é uma segunda casa, onde encontro amizade, companheirismo e acolhimento.

A todos os amigos que estiveram comigo nessa jornada, mas em especial: Ailton, Aisni, Beatriz, Fabilene, Gabriela, Giovana, Najila e Silvana, vocês são mais que um presente em minha vida.

Às minhas amigas desde antes da vida acadêmica, Amanda, Camila, Débora, Gabriela, Isabela, Lívia, Marcela, Patricia Corrêa, Patricia Cortés e Tainá.

Aos colaboradores deste projeto, Dr. Sergio M. Delpiani e Dra. Gabriela Delpiani e Instituto de Biotecnologia (IBTEC).

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da UNESP de Botucatu, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2019/15131-0) pela bolsa de estudo concedida, tornando possível a realização do meu mestrado.

Nada teria sido possível sem o apoio de cada um de vocês, muito obrigada.

## Resumo

A pesca excessiva influencia em mudanças na estratégia de vida das populações dos organismos aquáticos, especialmente dos elasmobrânquios (tubarões e raias). O conhecimento e identificação de estoques das populações representam um ponto fundamental para o manejo e conservação das espécies. A espécie *Squalus acanthias* é um tubarão de pequeno porte, pertencente ao gênero *Squalus*, popularmente conhecido como cação-bagre-espinhoso, amplamente distribuído, migrador e susceptível à sobrepesca. Na Argentina, há uma alta ocorrência de pesca sobre *S. acanthias*, que atualmente recebe a classificação Vulnerável (VU) na lista vermelha da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos estudar amostras de *S. acanthias*, procurando rastrear marcadores SNPs para estudos populacionais e parentesco, estudar a composição genética de uma população e a ocorrência de paternidade múltipla. A biblioteca *ddRADSeq* foi realizada com fêmeas e seis ninhadas, variando de três a 12 filhotes/mãe, totalizando 40 amostras de Mar del Plata (n=17) e Puerto de Santa Cruz (n=23), Argentina. Após o sequenciamento, foi realizado o rastreio de marcadores, resultando em 4.157 SNPs. Os índices de diversidade genética foram moderados (para heterosiguidade observada e heteroziguidade esperada), além disso, o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi negativo para ambas as localidades analisadas, indicando um excesso de heterozigotos e ausência de endogamia. O  $F_{ST}$  pairwise foi de 0.042 entre as regiões de Mar del Plata e Puerto de Santa Cruz, demonstrando ausência de estruturação populacional. As análises com os programas STRUCTURE e DAPC indicaram que os indivíduos analisados estão distribuídos em três clusters genéticos, além disso, foi encontrado um alto fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes localidades, porém apresentando baixo tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ). As análises de parentesco revelaram indivíduos bem relacionados geneticamente. No programa COLONY foram identificadas 35 relações de irmãos completos, distribuídos em oito grupos que variaram em tamanho de dois a cinco indivíduos, e 45 relações de meio-irmãos, e a paternidade múltipla foi detectada em três das seis ninhadas analisadas. Este é o primeiro estudo que avaliou a diversidade genética, estruturação populacional e paternidade múltipla na espécie *S. acanthias* na costa da Argentina com marcadores SNPs. Os resultados obtidos apresentam evidências da ocorrência de uma única unidade panmítica na costa da Argentina e ocorrência de paternidade múltipla na espécie, que pode estar auxiliando na manutenção da variabilidade genética.

## Abstract

Overfishing influences changes in the life strategy of populations of aquatic organisms, especially elasmobranchs (sharks and rays). The knowledge and identification of stocks of populations represent a fundamental point for the management and conservation of the species. The species *Squalus acanthias* is a small shark, belonging to the genus *Squalus*, popularly known as the spiny dogfish, widely distributed, migratory and susceptible to overfishing. In Argentina, there is a high occurrence of fishing on *S. acanthias*, which is currently classified as Vulnerable (VU) on the IUCN (International Union for Conservation of Nature) red list. In this context, the present work aims to study samples of *S. acanthias*, trying to track SNP markers for population and kinship studies, study the genetic composition of a population and study the occurrence of multiple paternity. The ddRADSeq library was performed with females and six litters, ranging from three to 12 pups/mother, totaling 40 samples from Mar del Plata (n=17) and Puerto de Santa Cruz (n=23), Argentina. After sequencing, marker screening was performed, resulting in 4.157 SNPs. The genetic diversity indices were moderate (for observed heterozygosity and expected heterozygosity), in addition, the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) was negative for both analyzed localities, indicating an excess of heterozygotes and absence of inbreeding. The pairwise  $F_{ST}$  was 0.042 between the regions of Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz, demonstrating the absence of population structure. The analyzes with the STRUCTURE and DAPC programs indicated that the analyzed individuals are distributed in three genetic clusters, in addition, a high gene flow was found between individuals from different locations, with a low effective population size ( $N_e$ ). Kinship analyzes revealed genetically well-related individuals. In the COLONY program, 35 full-sibling relationships were identified, distributed in eight groups that varied in size from two to five individuals, and 45 half-sibling relationships, and multiple paternity was detected in three of the six litters analyzed. This is the first study that evaluated the genetic diversity, population structure and multiple paternity in the *S. acanthias* species off the coast of Argentina with SNPs markers. The results obtained show evidence of the occurrence of a single panmitic unit on the coast of Argentina and the occurrence of multiple paternity in the species, which may be helping to maintain the genetic variability.

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>9</b>
1.1 Elasmobrânquios.....	9
1.2 Família Squalidae, Gênero <i>Squalus</i> .....	10
1.3 <i>Squalus acanthias</i> (Linnaeus, 1758).....	11
1.4 Poliandria.....	12
1.5 Genética molecular .....	14
1.6 Estudos genéticos em <i>Squalus acanthias</i> .....	15
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivos específicos .....	15
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>16</b>
3.1 Obtenção do material genômico .....	16
3.2 Elaboração da Biblioteca ddRAD para SNPs .....	16
3.3 Análises de SNPs .....	18
3.4 Diversidade genética.....	19
3.5 Estruturação genética.....	19
3.6 Análises de relacionamento .....	20
<b>4. Resultados .....</b>	<b>22</b>
4.1 Genetical diversity and population structure .....	23
4.2 Kinship analyses .....	26
<b>5. Discussion.....</b>	<b>29</b>
5.1 Genetic diversity .....	29
5.2 Population genetic structure and migration .....	29
5.3 Relationship and kinship.....	30
<b>6. List of Supplementary Material.....</b>	<b>32</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>37</b>
<b>8. Produção bibliográfica e científica, desenvolvida durante o mestrado.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Outras atividades acadêmicas .....</b>	<b>53</b>



## **1. Introdução**

### **1.1 Elasmobrânquios**

Os elasmobrânquios, grupo taxonômico formado pelos peixes cartilaginosos (tubarões e raias), englobam mais de 1.200 espécies válidas (Fricke et al. 2021). Possuem uma longa história evolutiva com mais de 400 milhões de anos, habitando uma variedade de nichos ecológicos (Miller, 2003; Pough, 2013). São amplamente distribuídos e algumas espécies altamente migradoras (Gomes et al. 2019).

Ecologicamente, devido a sua função de predadores ou mesopredadores, os tubarões desempenham o papel de reguladores da cadeia trófica de ecossistemas marinhos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Ferretti et al. 2010; Roff et al. 2016). Formam um grupo de espécies ecologicamente e demograficamente diversificado, com representantes adaptados aos mais variados ambientes (Weigmann, 2016), reflexo das inúmeras adaptações evolutivas desses animais (Gomes et al. 2019).

Apesar de sua grande importância ecológica, os tubarões estão entre as espécies marinhas mais ameaçadas de extinção, e isto se deve a um conjunto de características biológicas que os tornam pouco resilientes às modificações causadas no ambiente, como crescimento lento, maturação sexual tardia, longa expectativa de vida, baixa fecundidade e pouca frequência reprodutiva, além de algumas espécies possuírem longos períodos de gestação e grande investimento materno (Cortés, 2000; Dulvy et al. 2014; Dulvy et al. 2021).

As populações de algumas espécies de tubarões pelágicos tiveram um declínio de aproximadamente 71% nos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico desde o ano de 1970, indicando o risco de serem extintas em uma ou duas décadas (Pacoureaux et al. 2021). Essa redução populacional se dá principalmente pela rápida e crescente expansão das atividades humanas, como os altos índices de poluição nos diferentes ambientes, principalmente em regiões costeiras, causando degradação do habitat de populações naturais, alterações climáticas e efeitos da sobrepesca (Dulvy et al. 2021; Osgood et al. 2021).

O risco de extinção em tubarões pode ser duas vezes maior do que em peixes teleósteos (Myers & Worm, 2005), pois as espécies de tubarões necessitariam de décadas para se recuperar dos efeitos da pesca (Stevens et al. 2000). Neste contexto é considerado que a redução populacional de tubarões pode causar inúmeras consequências negativas, tanto ecológicas quanto econômicas (Grubbs et al. 2016; Simpfendorfer et al. 2021; Osgood et al. 2021). Portanto, diferentemente de outros organismos aquáticos, os

elasmobrânquios requerem abordagens distintas daquelas comumente adotadas (Dulvy et al. 2017; Stein 2018), como por exemplo, o cálculo de tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) para maior conhecimento sobre aspectos genéticos das populações e planejamento de ações de conservação (Domingues et al. 2018).

## **1.2 Família Squalidae, Gênero *Squalus***

A família de tubarões Squalidae (Blainville, 1816) é composta por dois gêneros, *Squalus* Linnaeus, 1758 (gênero-tipo) e *Cirrhigaleus* Tanaka, 1912 (Bigelow & Schroeder, 1957). Existem mais de 60 espécies dentro desta família, cujas descrições originais, em sua maioria são pouco informativas, ocasionando em casos de identificação equivocados na literatura. Além disso, a perda de holótipos ou outros tipos primários para classificação constituem empecilhos secundários para a identificação dos componentes desta família, contribuindo ainda hoje para erros de nomenclatura e utilização de sinônimos (Viana et al. 2016; Fricke et al. 2021).

O gênero *Squalus* é um dos grupos mais problemáticos em questões taxonômicas entre as espécies de tubarões, tendo essa complexidade potencializada pela alta sobreposição de caracteres morfológicos entre as espécies, já que a identificação das mesmas se dá muitas vezes por meio de caracteres limitados e insuficientemente consistentes, como contagem de vértebras e certas medidas corporais (Veríssimo et al. 2017; Pflieger et al. 2018). As espécies de *Squalus* estão divididas em três “complexos de espécies” classificados de acordo com a similaridade morfológica, denominados complexo *S. acanthias*, *S. megalops* e *S. mitsukurii*, podendo ou não representar grupos monofiléticos (Bigelow & Schroeder, 1957).

Atualmente, o gênero é composto por 35 espécies popularmente conhecidos como “cações-bagre”, entre estas, podem ser citadas *Squalus acanthias* Linnaeus, 1758 (espécie-tipo); *S. blainvillei* (Risso, 1826); *S. suckleyi* (Girard, 1854); *S. megalops* (Macleay, 1881); *S. mitsukurii* Jordan & Snyder (1903); *S. japonicus* Ishikawa, 1908; *S. brevirostris* Tanaka, 1912; *S. griffini* Phillipps, 1931; *S. montalbani* Whitley, 1931; *S. cubensis* Howell-Rivero, 1936; *S. melanurus* Fourmanoir & Rivaton, 1979; *S. rancureli* Fourmanoir & Rivaton, 1979; *S. clarkae* (Pflieger et al. 2018) e mais 13 espécies recentemente descritas nos oceanos Índico e Pacífico (Baranes, 2003; Last et al. 2007; White & Iglésias, 2011). De maneira geral, as espécies de *Squalus* estão distribuídas nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, sendo considerados tubarões de pequeno porte que podendo atingir até 1,5m de comprimento total (Compagno et al. 2005).

### 1.3 *Squalus acanthias* (Linnaeus, 1758)

*Squalus acanthias* (Fig. 1) é conhecido popularmente como “cação-bagre-espinhoso”, é considerado um tubarão de pequeno porte (~1,5m), altamente migratório com distribuição mundial, exceto nas regiões tropicais e polares (Compagno, 1984) e no oceano Pacífico Norte, área de ocorrência e distribuição da espécie *Squalus suckleyi*, em que análises genéticas revelaram diferenças entre as duas espécies (Ebert et al. 2010).

Considerada mesopredatória, possui dieta diversificada, com presas variando desde invertebrados marinhos até uma grande variedade de peixes bentônicos e crustáceos (Murdy et al. 2013). A maturação sexual ocorre entre 60-70cm CT (comprimento total) para os machos e 75-90cm CT para fêmeas (Muus et al. 1999), acompanhado de longos períodos gestacionais (18 a 24 meses) com média de 1 a 21 filhotes por gestação (Compagno, 1984).



**Fig. 1.** Em primeiro plano um exemplar de *Squalus acanthias*. Foto por: Andy Murch ([www.fishbase.se](http://www.fishbase.se))

Como muitos elasmobrânquios, *S. acanthias* possui características K-estrategistas, com taxas de crescimento lentas, baixa fecundidade e maturação sexual tardia (Compagno, 1984; King et al. 2003; Dell’Apa et al. 2015), conseqüentemente é sensível à superexploração pesqueira (Gracan et al. 2020). Portanto, a recuperação completa de um estoque leva aproximadamente dez anos, que é aproximadamente o período necessário para atingir a maturidade sexual das fêmeas (7,5 anos) somado a gestação (2 anos) (Bargione et al. 2019).

Globalmente, a espécie está classificada como VU “Vulnerável” na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) (Finucci et al. 2020). Apesar de estar ameaçada de extinção, é uma espécie com

importância econômica, utilizada para consumo alimentício, obtenção de óleo de fígado, vitaminas, lixa, couro e fertilizantes (Compagno et al. 1984; Lamb et al. 1986).

#### 1.4 Poliandria

Ao longo da história evolutiva, os tubarões desenvolveram uma variedade de modos reprodutivos, como a viviparidade (reprodução interna), oviparidade (postura de ovos), partenogênese, acasalamentos monogâmicos e poliândricos (Chapman, 2004). Os acasalamentos poliândricos podem resultar em uma ninhada composta por irmãos completos e meio-irmãos, essa é uma estratégia reprodutiva que recebe o nome de paternidade múltipla (Pratt et al. 2001; Birkhead et al. 1998; Marie et al. 2019; Liu et al. 2020).

A paternidade múltipla é possível pela presença de uma estrutura encontrada em praticamente todas as fêmeas de Chondrichthyes, chamada glândula oviducal (Hamlett et al. 1998; Hamlett et al. 1999). Essa estrutura possibilita o armazenamento e a mistura dos espermatozoides de diferentes machos, aumentando o potencial de fecundação dos óvulos com diferentes progenitores em uma mesma ninhada. Esse sistema de acasalamento pode influenciar os níveis populacionais, levando a mudança nos níveis de variabilidade genética e endogamia (Frankham, 2005; Lamarca et al. 2020a).

Com a aplicação de marcadores moleculares, geralmente microssatélites, para analisar ninhadas de filhotes ou de embriões, foi demonstrada a ocorrência de poliandria em espécies de elasmobrânquios vivíparos e ovíparos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Ordem, gênero e espécies de elasmobrânquios investigadas em estudos sobre a ocorrência de paternidade múltipla.

Order	Family	Species	Reference
		<i>Carcharhinus acronotus</i>	Barker et al. (2019)
		<i>Carcharhinus leucas</i>	Pirog et al. (2015)
		<i>Carcharhinus leucas</i>	Pirog et al. (2019)
		<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>	Green et al. (2017)
		<i>Carcharhinus obscurus</i>	Rossouw et al. (2016)
		<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Portnoy et al. (2007)
		<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Daly-Engel et al. (2007)
Carcharhiniformes	Carcharhinidae	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Daly-Engel et al. (2006)
		<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Marino et al. (2015)
		<i>Carcharhinus altimus</i>	Daly-Engel et al. (2006)
		<i>Galeocerdo cuvier</i>	Holmes et al. (2018)
		<i>Galeocerdo cuvier</i>	Pirog et al. (2020)
		<i>Negaprion acutidens</i>	Mourier et al. (2013)
		<i>Negaprion brevirostris</i>	Feldheim et al. (2001)
		<i>Negaprion brevirostris</i>	Feldheim et al. (2004)

		<i>Negaprion brevirostris</i>	DiBattista et al. (2008)
	Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus canicular</i>	Griffiths et al. (2011)
	Sphyrnidae	<i>Sphyrna lewini</i>	Rossouw et al. (2016)
		<i>Sphyrna lewini</i>	Green et al. (2017)
		<i>Sphyrna lewini</i>	Marie et al. (2019)
		<i>Sphyrna tiburo</i>	Chapman et al. (2004)
	Triakidae	<i>Mustelus mustelus</i>	Marino et al. (2015)
		<i>Mustelus mustelus</i>	Rossouw et al. (2016)
		<i>Mustelus mustelus</i>	Maduna et al. (2018)
		<i>Mustelus punctulatus</i>	Marino et al. (2015)
		<i>Mustelus henlei</i>	Byrne & Avise (2012)
		<i>Mustelus henlei</i>	Chabot & Haggin (2014)
		<i>Mustelus asterias</i>	Farrell et al. (2014)
		<i>Mustelus antarcticus</i>	Boomer et al. (2013)
		<i>Mustelus lenticulatus</i>	Boomer et al. (2013)
		<i>Galeorhinus galeus</i>	Hernandez et al. (2014)
		<i>Triakis semifasciata</i>	Nosal et al. (2013)
Hexanchiformes	Hexanchidae	<i>Hexanchus griseus</i>	Larson et al. (2011)
Lamniformes	Lamnidae	<i>Isurus oxyrinchus</i>	Corrigan et al. (2015)
		<i>Isurus oxyrinchus</i>	Liu et al. (2020)
	Carchariidae	<i>Carcharias taurus</i>	Chapman et al. (2013)
		<i>Carcharias taurus</i>	Townsend et al. (2015)
Orectolobiformes	Ginglymostomatidae	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	Saville et al. (2002)
		<i>Ginglymostoma cirratum</i>	Heist et al. (2011)
	Rhincodontidae	<i>Rhincodon typus</i>	Schmidt et al. (2010)
Squaliformes	Squalidae	<i>Squalus albicaudus</i>	Lamarca et al. (2020b)
		<i>Squalus acanthias</i>	Lage et al. (2008)
		<i>Squalus acanthias</i>	Veríssimo et al. (2011)
		<i>Squalus acanthias</i>	Craven et al. (2018)
		<i>Squalus mitsukurii</i>	Daly-Engel et al. (2010)
Rajiformes	Rajidae	<i>Raja clavata</i>	Chevolot et al. (2007)
Myliobatiformes	Myliobatidae	<i>Aetobatus narinari</i>	Janse et al. (2013)
	Urotrygonidae	<i>Urobatis halleri</i>	Lyons et al. (2017)

Acreditava-se que os benefícios da poliandria em tubarões seriam mais ligados ao sexo masculino e influenciados pelo conflito sexual, visto que tubarões não costumam formar casais monogâmicos e não fornecem cuidado parental, além do alto custo energético para as fêmeas, devido às mordidas dadas pelos machos no momento da cópula (Pratt et al. 2005; Daly-Engel et al. 2006; Portnoy et al. 2007; DiBattista et al. 2008).

A poliandria com ocorrência de paternidade múltipla pode apresentar vários benefícios genéticos para a espécie como um todo, como por exemplo, a aptidão genética da mãe, podendo aumentar à medida que ela produza filhotes capazes de crescer e se reproduzir, assim, a aptidão genética dos filhotes também pode melhorar à medida que a variação genética também aumenta, além disso, o aumento da diversidade genética pode

diminuir ou até mesmo neutralizar os problemas causados por endogamia (Green et al. 2017). Duas hipóteses poderiam explicar a poliandria em animais, a primeira consiste em benefícios genéticos para machos que geram prole com descendentes vivos e férteis, que apresentam uma maior contribuição para a manutenção da espécie, a segunda é um possível desequilíbrio entre as taxas de acasalamento machos x fêmeas, que pode levar a conflitos sexuais, pois as fêmeas passam bastante tempo grávidas (Fox et al. 2019).

### **1.5 Genética molecular**

Abordagens moleculares na pesquisa com espécies de tubarões têm sido usadas para inferências filogenéticas, definição de estruturas populacionais, identificações espécie-específica, análise de transcriptoma (Franco et al. 2012; Pavan-Kumar et al. 2014; Camargo et al. 2016; Vargas-Caro et al. 2017; Ovenden et al. 2018; Thrasher et al. 2018; da Silva Ferrete et al. 2019; Domingues et al. 2020) e ainda, marcadores polimórficos podem ser usados para atribuir parentesco com precisão genética à prole e determinar o grau de relação genética entre indivíduos (Green et al. 2017), permitindo assim, uma maior compreensão dos sistemas reprodutivos, que são frequentemente difíceis de serem observados na natureza (Feldheim et al. 2001; Chapman et al. 2004; Ovenden et al. 2018; Wosnick et al. 2019; Marie et al. 2019).

Os avanços das tecnologias NGS (*Next-Generation Sequencing*), permitiram aos pesquisadores uma mudança nas pesquisas genéticas com marcadores tradicionais para uma abordagem genômica, trazendo mais informações que antes não eram possíveis (Kumar et al. 2017; Kraft et al. 2020; Mamoozadeh et al. 2020). Portanto, o conhecimento sobre identificação e estrutura populacional destas espécies, constitui a base para ações de conservação e determina quais os métodos mais eficientes que podem ser aplicados (Domingues et al. 2018; Pacoureau et al. 2021).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são marcadores amplamente distribuídos no genoma que podem ser rastreados por abordagens genômicas, utilizando sequenciamento de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição (do inglês *Restriction site Associated DNA sequencing, RADseq*) (Baird et al. 2008, revisado por Andrews et al. 2016). A maior vantagem na utilização de SNPs é a possibilidade da aplicação em organismos “não-modelo”, detectando regiões neutras e adaptativas, permitindo assim o aumento da robustez para os parâmetros genéticos populacionais e identificação de processos adaptativos (Allendorf et al. 2010; Kelley et al. 2016).

Essas características tornam os SNPs o tipo de marcador ideal para estudos e conservação (Funk et al. 2012), de genética populacional e de ecologia em várias espécies de peixes (Zhang et al. 2015; Cruz et al. 2016; DiBattista et al. 2017; Colloca et al. 2020;

Cruz et al. 2021), bem como estudos de relações de parentesco e múltipla paternidade (Flanagan & Jones 2019; Marie et al. 2019; Bester-van der Merwe et al. 2019; Liu et al. 2020; Duchatelet et al. 2020).

Apesar dos avanços no campo da genômica, os estudos envolvendo espécies de tubarões, tiveram como foco principal espécies com maior relevância na área econômica, por exemplo espécies pertencentes a família *Carcharhinidae*, sendo esses os mais citados na literatura (Pazmino et al. 2017; Johri et al. 2019; Bernard et al. 2021). Entretanto, quando pesquisas são relacionadas e comparadas a outras espécies de tubarões, a família *Squalidae* possui pouca referência literária, demonstrando a ausência de estudos robustos a despeito da mesma, assim, destacando a relevante necessidade de estudos genéticos relacionados a família (Oleksiak, 2016; Mamoozadeh et al. 2020; Pearce et al. 2021).

### **1.6 Estudos genéticos em *Squalus acanthias***

Os estudos genéticos acerca de *S. acanthias*, em sua maioria são com marcadores microssatélites, como estudos de avaliação da estruturação genética populacional (Veríssimo et al. 2010), estruturação espacial versus temporal (Thorburn et al. 2018), diversidade e caracterização genética (Gracan et al. 2020). Além de estudos sobre a biologia reprodutiva como os de Lage et al. (2008) e Veríssimo et al. (2011) no oceano Atlântico Norte, onde evidências de poliandria foram detectadas com o uso de marcadores microssatélites em ambos os estudos. Diante disso, os indivíduos de *Squalus acanthias* nunca tiveram suas populações analisadas acerca de diversidade genética e padrões reprodutivos com marcadores SNPs na costa da Argentina.

## **2. Objetivos**

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar geneticamente a espécie *S. acanthias*, que ocorre no sudoeste do oceano Atlântico, testando a hipótese nula de panmixia e ocorrência de poliandria nessa espécie.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Analisar a diversidade genética dos indivíduos de *S. acanthias* do sudoeste do oceano Atlântico através de análise molecular em escala genômica.
- Investigar a ocorrência de poliandria, sua frequência e, se detectada, verificar o número de machos participantes da fecundação de cada ninhada.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Obtenção do material genômico

Para realização do presente estudo foram utilizadas amostras de espécimes de *S. acanthias* de duas localidades na costa da Argentina, no Oceano Atlântico. A coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP, Unesp, Botucatu-SP) conta com 92 amostras das espécies em estudo (Tabela suplementar 1).

As amostras foram obtidas por doações feitas pelos pesquisadores Dr. Sergio M. Delpiani e Dra. Gabriela Delpiani (Investigaciones Marinas y Costeras – Argentina), colaboradores deste projeto.

Um fragmento de tecido muscular foi removido de cada indivíduo e preservado em etanol 95% a temperatura de -20°C para estudos moleculares e, posteriormente depositados na coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP) credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante.

Entre os espécimes de *S. acanthias*, foram extraídos DNAs de 92 amostras, distribuídas em 11 ninhadas. Para verificar a concentração das amostras, o DNA foi quantificado em um aparelho *Qubit* 4.0 Fluorometer (Invitrogen), com o kit *Qubit*™ dsDNA BR Assay Kit, após as quantificações, as amostras foram padronizadas para uma concentração de 200ng em volume final de 34ul, resultando em 5.8 ng/ul.

Devido ao tamanho do genoma de *Squalus* de aproximadamente 6GB, foram selecionadas 6 ninhadas, variando de 3 a 12 embriões, totalizando 40 amostras. A escolha foi baseada na qualidade do DNA extraído, sendo elas as ninhadas SQ3 (1 mãe e 8 embriões), SQ4 (1 mãe e 3 embriões), SQ23 (1 mãe e 3 embriões), SQ26 (1 mãe e 4 embriões), SQ27 (1 mãe e 12 embriões) e SQ30 (1 mãe e 4 embriões).

#### 3.2 Elaboração da Biblioteca ddRAD para SNPs

*Dupla digestão enzimática (Double digest)*

O protocolo utilizado para a preparação da biblioteca de *Double-Digest Restriction Site-Associated DNA Sequencing (ddRADseq)* descrito por Peterson et al. (2012) e adaptado em Campos et al. (2017). Para a dupla digestão enzimática, foi utilizado 34ul de DNA, em uma concentração de 5.8 ng/μl, 1 μl de cada enzima EcoRI (corte raro) e MspI (corte frequente), 4μl buffer (*Cut Smart*), em um volume final de 40μl, a digestão foi incubada por três horas a uma temperatura de 37°C.



As amostras do material digerido foram purificadas utilizando *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Depois da purificação do DNA, realizamos a ligação dos adaptadores.

#### *Ligação dos adaptadores*

Um par de adaptadores hibridizados P1 (3 nM) correspondente à enzima EcoRI com a sequência (P1.1 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG/P1.2 AGCAGCCGTCGCAGTCTACACATATTCTCTGTCTTAA) e P2 (6 nM) correspondente à enzima MspI com a sequência (P2.1 CGCTGTCTCTTATACGTCCTCTT/P2.2GACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGG GTGCTCTG) foram ligados aos fragmentos digeridos, com volume de reação final de 40µl, constituído de 2,0 µl do adaptador de cada uma das enzimas, 4µl de T4 Ligase Buffer 1X (Promega), 0,5µl da enzima T4 Ligase (Promega), e 31,5µl do material digerido. Em seguida, amostras foram incubadas a uma temperatura de 23°C por 30 minutos, 65°C por 10 minutos, 63°C por 90 segundos, no qual, a temperatura diminui 2°C a cada 90 segundos até alcançar 23°C. Após essa etapa, as amostras da reação de ligação aos adaptadores foram purificadas novamente, utilizando *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### *Indexação*

Para reação de indexação, foram sintetizados primers com os index da Illumina, I5 (501 ao 508) e I7 (701 ao 712). Estes *primers* foram indexados em cada amostra e combinados de diferentes formas, nos insertos ligados aos adaptadores. A reação de indexação continha: 15µl do produto de ligação, 25µl de Master Mix (GoTaq), 5µl de cada index I5 e I7, para cada amostra apresentando uma combinação única de index.

A reação de PCR para indexação foi realizada de acordo com as seguintes condições de ciclo: 1 ciclo com um passo inicial de 72°C por 3 minutos seguido de 16 ciclos de desnaturação (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 *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação da indexação, o material foi aplicado em um gel de agarose 1% a fim de verificar se as amostras haviam indexado de acordo com o tamanho esperado.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas em um aparelho *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen), estas apresentaram concentrações que variaram de 65,7ng/ul à 40ng/ul, sendo normalizadas a 40ng/ul.

### *Pool de amostras*

Para a realização do *pool* de amostras, utilizamos a concentração de 40ng/μl de DNA baseado na quantificação anterior, o *pool* foi composto de 5μl de cada amostra obtendo um volume final de 200μl, em seguida, realizamos a purificação do *pool* utilizando *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do *pool* também foi realizada em um aparelho *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen) obtendo a concentração de 147ng/μl.

### *Size selection e sequenciamento*

O *size selection* foi realizado com o objetivo de selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse, no qual aplicamos o *pool* em gel de agarose a 1%. Ao final da eletroforese, cortamos um fragmento do gel com um tamanho entre 300pb e 500pb, 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, realizamos a quantificação de DNA em um aparelho *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen) obtendo a concentração final de 2,98ng/μl.

Para verificar com precisão a biblioteca, foi realizado o PCR em tempo real (qPCR), e, posteriormente, a normalização da mesma. A biblioteca foi sequenciada com leituras de extremidade única (*single-end*) de 150pb, em uma célula de fluxo (*flow cell*) *High Output*, na plataforma NGS Illumina Nextseq500, no Laboratório de Pesquisa em Análise Genéticas no Instituto de Biotecnologia (IBTEC– UNESP, campus Botucatu/SP), em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla.

### **3.3 Análises de SNPs**

Após a etapa de sequenciamento da biblioteca no Nextseq500, foram obtidas as leituras das *reads*. Afim de verificar a acurácia de qualidade das *reads Raw Date*, dois programas foram utilizados: o FastQC (Andrews, 2018) (disponível em <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), o qual verifica diferentes parâmetros de qualidade das *reads* de cada amostra, e o MultiQC (Ewels et al. 2016) (Disponível em <https://github.com/ewels/MultiQC>) combina os resultados do FastQC e aplica para todas as *reads* das amostras. Os dados obtidos por meio destes programas ilustram, através de gráficos, o grau de qualidade das amostras que são: se há presença de sequências dos adaptadores usados na construção da biblioteca, índices de qualidade *Phred Quality Score*, tamanhos das *reads* em pares de base (pb) e entre outros.

Posteriormente foram realizadas etapas de filtragem utilizando o programa TRIMMOMATIC v.o.32 (Bolger et al. 2014), no qual eliminamos *reads* que apresentaram um *Phred Quality Score* <Q20. Além disso, foi realizada a digestão *in silico*

segundo Driller et al. (2020) para remoção de *reads* que apresentaram regiões de sítios enzimáticos e, ao final, as *reads* foram padronizadas com 143pb utilizando novamente o programa TRIMMOMATIC v.o.32 (Bolger et al., 2014).

Como a espécie estudada nesta pesquisa não possui genoma de referência, a montagem do catálogo de marcadores e o rastreamento de SNPs foram realizados utilizando a abordagem *de novo* e posteriormente o *refmap*, ambos com o uso da pipeline STACKS (Catchen et al. 2011). A montagem do catálogo de marcadores em *S. acanthias* foi desenvolvida com indivíduos selecionados que apresentaram o maior número de *reads*, ou seja, os indivíduos com melhor representatividade dentro de cada amostragem. Para o rastreamento de SNPs foi utilizado o parâmetro  $M=2$ , que controla o número de incompatibilidades permitidas entre os dois alelos de um determinado loci e o parâmetro  $m=6$ , que controla o número de leituras idênticas mínimas necessárias para iniciar um possível alelo.

Após a montagem do catálogo de marcadores, foi construída a referência utilizando o software *Bowtie2* (v2.2.4) e em seguida utilizamos a pipeline *Refmap* do STACKs. Ao final, utilizamos o programa *Populations*, implementado do STACKs para a aplicação de filtros de SNPs, dessa forma, primeiramente foram selecionados SNPs que genotiparam em pelo menos 80% dos indivíduos de cada população ( $r= 0,80$ ), e em seguida foi aplicado um filtro com o qual foram excluídos SNPs que apresentaram valor de MAF (*Minor allele frequency*)  $<0,05$ .

### **3.4 Diversidade genética**

O coeficiente de endogamia para investigação da diversidade genética foi calculado utilizando o programa GENEPOP v4.1.0 (Rousset, 2008). 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 ( $\pi$ ) foram calculadas no ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier et al. 2010).

O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi estimado utilizando um conjunto de dados reduzidos de 377 SNPs, os valores foram estimados através do programa NeESTIMATOR v2 (Do et al. 2014), utilizando o desequilíbrio de ligação com 95% intervalo de confiança (CI) baseado nos dados de SNPs.

### **3.5 Estruturação genética**

Com a finalidade de analisar a diferenciação genética entre as populações foram calculados os valores de  $F_{ST}$  pairwise, no programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier et

al. 2010). A análise bayesiana do software STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), foi utilizada para estimar o número de *clusters* genéticos (k) na espécie, testamos k=1 a k=4, com 500.000 de MCMC e 10% de *burn-in*, com 10 interações para cada K. A identificação do “melhor” k foi feita através do método Evanno ( $\Delta K$ ) (Evanno *et al.* 2005) utilizando o Structure Selector (Li & Liu, 2018). Os gráficos foram visualizados no CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015).

Adicionalmente, foi realizada uma análise discriminante de componentes principais (*Discriminant Analysis of Principal Components* - DAPC) (Jombart & Ahmed 2011) também para estimar os números de *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).

Ao final, as estimativas do fluxo gênico foram obtidas com base no número de migrantes (Nm), usando a função do *divMigrate* (Sundqvist *et al.*, 2016) no pacote R *diveRcity* (Keenan *et al.* 2013), fornecendo ainda, as estimativas da direção e a magnitude da migração entre os locais de amostragem.

### **3.6 Análises de relacionamento**

As análises de relacionamento foram realizadas com um conjunto reduzido de marcadores, totalizando 377 SNPs. Para facilitar a compreensão, as amostras foram renomeadas como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Identificação das amostras de *Squalus acanthias* dividido em ninhadas (1 a 6), as mães (FM) e os filhotes (F) de cada ninhada.

<b>Ninhada 1</b>												
<b>Mãe</b>	FM1											
<b>Filhotes</b>	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18				
<b>Ninhada 2</b>												
<b>Mãe</b>	FM2											
<b>Filhotes</b>	F21	F22	F23									
<b>Ninhada 3</b>												
<b>Mãe</b>	FM3											
<b>Filhotes</b>	F31	F32	F33									
<b>Ninhada 4</b>												
<b>Mãe</b>	FM4											
<b>Filhotes</b>	F41	F42	F43	F44								
<b>Ninhada 5</b>												
<b>Mãe</b>	FM5											
<b>Filhotes</b>	F51	F52	F53	F54	F55	F56	F57	F58	F59	F510	F511	F512
<b>Ninhada 6</b>												
<b>Mãe</b>	FM6											
<b>Filhotes</b>	F61	F62	F63	F64								

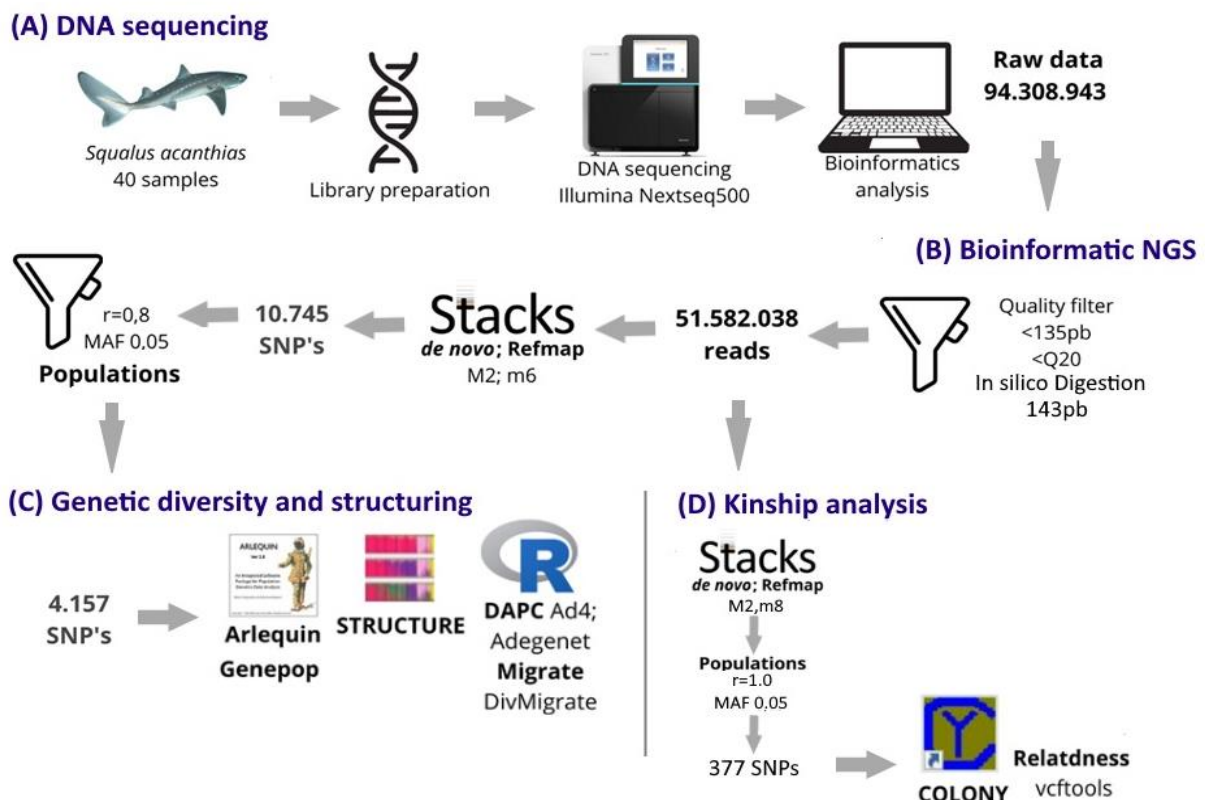
As estimativas de parentesco genético são calculadas com base nos padrões de identidade-por-descendência (IBD – *Identity by Descent*), onde dois alelos são idênticos quando descendem recentemente de um mesmo alelo ancestral (Queller & Goodnight, 1989). A caracterização do grau de parentesco genético entre dois indivíduos baseia-se, então, na probabilidade de que seus os alelos sejam IBD, fator também chamado de “coeficiente de coancestralidade” (Weir et al. 2006). Para estimar a relação entre todos os 40 indivíduos, foi calculada a probabilidade de dois alelos serem idênticos por descendência (IBD), utilizando o coeficiente de parentesco  $\phi$  (Manichaikul et al. 2010) com a função “Relatedness2” do vcftools (Danecek et al. 2011). Um dendrograma foi então criado seguindo o script relatedness R ([https://github.com/davemcg/R\\_play/blob/master/relatedness.R](https://github.com/davemcg/R_play/blob/master/relatedness.R)) em R.

O Programa COLONY v.2.0.6.2 (Jones & Wang, 2010) foi utilizado para estimar relações de parentesco, bem como identificar o número mais provável de machos (pais) envolvidos em cada ninhada analisada. Para realizar essa análise, o COLONY utiliza uma abordagem de máxima verossimilhança para atribuir indivíduos à agrupamentos com

base no relacionamento da prole, categorizados como irmãos completos, meio-irmãos ou não relacionados. Essa abordagem produz agrupamentos de filhotes de irmãos completos que compartilham ambos os pais e meio-irmãos que compartilham pelo menos um dos pais com outro indivíduo do agrupamento. Para tanto, para cada ninhada, realizamos dez corridas longas para determinar a consistência das análises utilizando os seguintes parâmetros: método de verossimilhança total, sem atualização das frequências alélicas, parentesco fraco a priori e alta precisão assumindo poligamia para ambos os sexos.

#### 4. Resultados

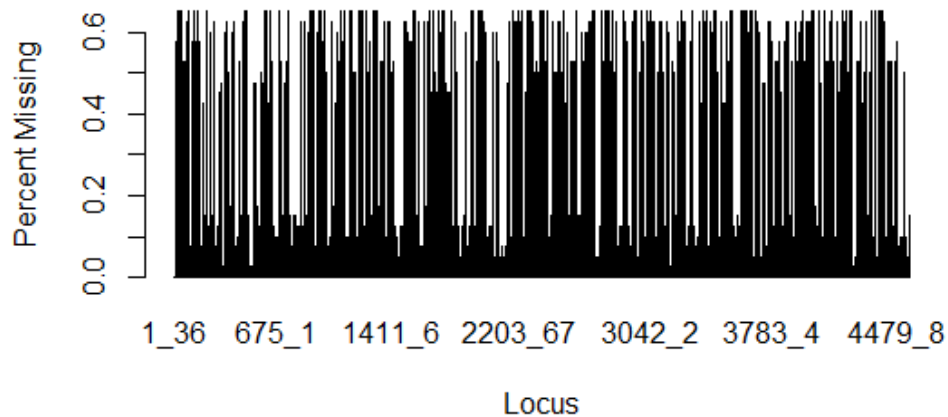
The ddRAD library for 40 samples of *Squalus acanthias* results in 94.308.943 reads raw data (Fig. 1A), ranged from 1.082.597 to 3.124.731 reads per sample (Table S2). After the quality filtering, 51.582.038 reads (Fig. 1B), ranged from 594.373 to 1.873.556 were kept. All reads were standardized with 143 bp. At the end of the filtering steps, the library resulted in a number of reads above 541.427 with 143 bp for each sample.



**Fig 1.** Methodological approach for sequencing and data analyses ddRAD in *Squalus acanthias*. (A) DNA sequencing, an outline of the construction of genomic library. (B) Bioinformatic NGS, with quality filter NGS and identification of SNPs. (C) Genetic diversity and structuring, using 4.157 SNPs. (D) Kinship analysis, using 377 SNPs.

#### 4.1 Genetical diversity and population structure

Genetic information was obtained using 4.157 SNPs (Fig. 1C) which was used in all calculations, with only 11.7% of missing data (Fig. 2). Among which 2.732 transitions and 1.425 transversions were detected (Fig. S1). These markers were subjected to statistical analysis in 40 samples of *S. acanthias*, distributed in the localities of Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz, Argentina.



**Fig. 2.** Allele polymorphisms after the application of the matrix to the final dataset of the analyses, based on <12% of missing data.

The number of alleles detected are between 4.157 SNPs, for each group the number of alleles was very similar, being for 7.283 in Mar del Plata and 7.296 alleles in Puerto de Santa Cruz. The number of private alleles ( $A_p$ ) in each location was calculated, with results that revealed 346 for Mar del Plata and 487 for Puerto de Santa Cruz. For both locations, the observed heterozygosity ( $H_o$ ) presented a higher value than the expected heterozygosity ( $H_e$ ), and these values were  $H_o=0.293$  and  $H_e=0.250$  for Mar del Plata and to Puerto de Santa Cruz,  $H_o=0.281$  and  $H_e=0.258$ , as shown in Table 1. Considering the two sampling locations, differences between the variances of observed and expected heterozygosity are statistically significant (Bartlett's K-squared = 1101.8, d.f.=1, P-value < 2.2e-16), where  $H_o$  (overall  $H_o=0.291$ ) is statistically different from  $H_e$  (overall  $H_e=0.250$ ), suggesting an initial excess heterozygote, with the global population departs from HWE.

The fixation index or inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) values were predominant negative for the sampled locations, indicating the absence of inbreeding in this group. The region of Mar del Plata the  $F_{IS}$  value was -0.171 and Puerto de Santa Cruz was -0.128, these

negative values corresponding an excessive heterozygosity. The values for effective size of population estimates raging from 50.8 (42.4-62.8 CI) in Mar del Plata to 120.3 (88.0-186.4 CI) in Puerto de Santa Cruz. The nucleotide diversity was  $0.103\pm 0.05$  for Mar del Plata and  $0.109\pm 0.05$  for Puerto de Santa Cruz.

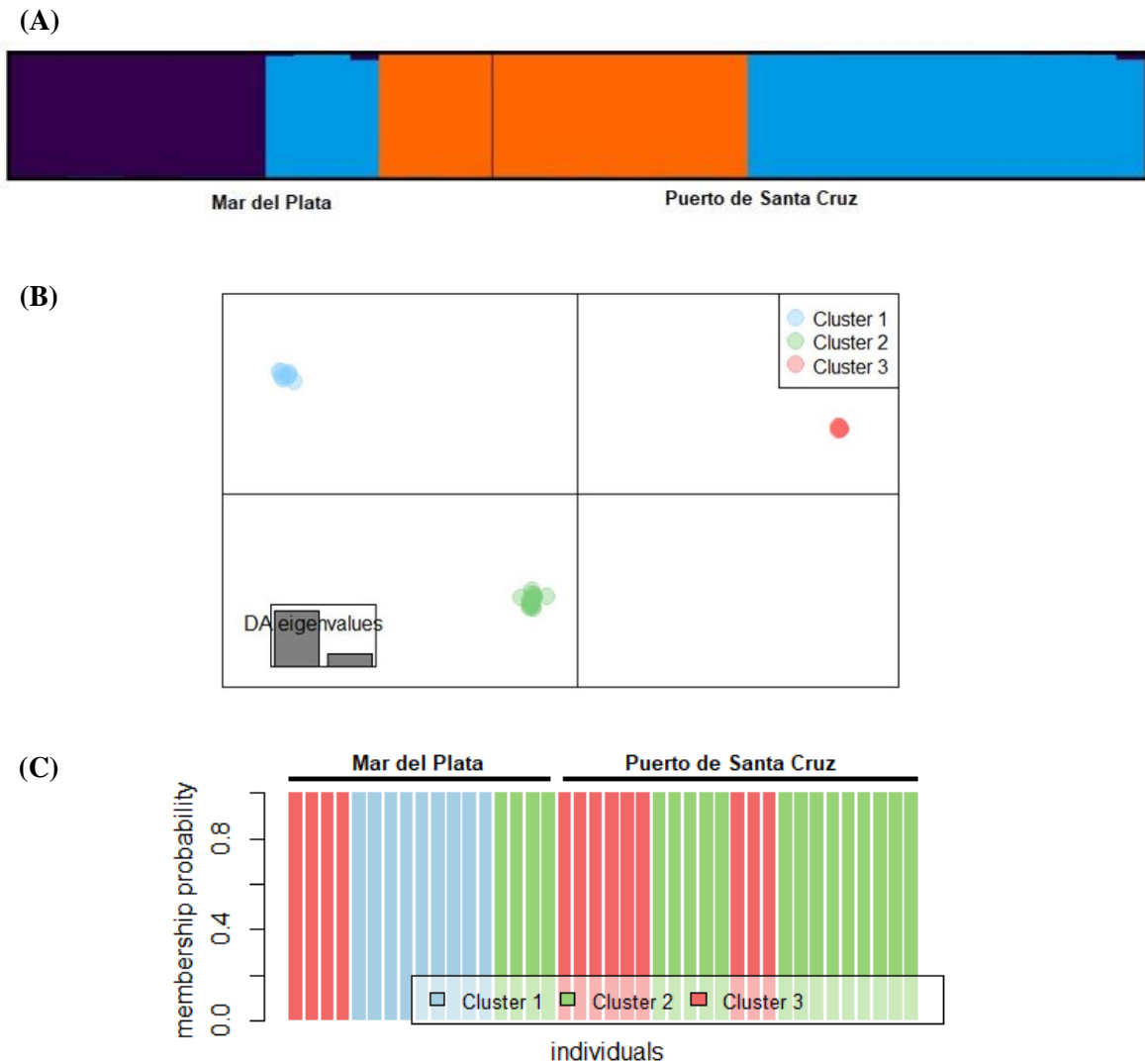
**Table 1.** Statistics of genetic diversity values found for *Squalus acanthias* using 4.157 SNPs. N: number of individuals per location; Ap: number of private alleles; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; Fis: inbreeding coefficient; Ne: effective population size based on the molecular linkage disequilibrium; 95% CI: Single standard deviation with 95% confidence interval;  $\pi$ : Nucleotide diversity.

Localities	N	Ap	Ho	He	Fis	Ne	95%CI	$\pi$
Mar del Plata	17	346	0.293	0.250	-0.171	50.8	42.4-62.8	0.103(+/-0.05)
Puerto de Santa Cruz	23	487	0.281	0.258	-0.128	120.3	88.0-186.4	0.109(+/-0.05)

The pairwise analysis based on genetic differentiation values ( $F_{ST}$ ) between the two locations revealed a low value of 0.042 (P-value<0.050), indicating an absence population genetic structure. The Bayesian analysis performed in the STRUCTURE program (Fig. 3A) based on cluster data (K=1-4), demonstrated that the highest probability of three clusters (k=3) distributed between two locations according to the estimate of the method of Evanno ( $\Delta k=20608.48993$ ) (Fig. S2).

Another inference of genetic clusters realized with DAPC, identified three clusters in *S. acanthias* distributed in the localities of Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz (Fig. 3B). In the membership probability analysis, based on the data generated in the DAPC analysis and with optimal k equal to three (Fig. S3), again three groups were observed, with cluster 1 (blue) represented by litters 1, 4 and 5, cluster 2 (green) by the litters 1 and 2, and cluster 3 (red) by the 3, 5 and 6 litters (Fig. 3C), in which it is possible to observe that there was no mixing between the clusters.





**Fig. 3.** Cluster analysis performed with 4.157 SNPs in *Squalus acanthias*. (A) STRUCTURE result with values of  $k=3$  considering the locations Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz. (B) DAPC graphic demonstrating the three clusters, indicated according to the colors and symbols in the legend, was performed adopting an optimum number of principal components ( $PC = 32$ ) calculated using the  $\alpha$ -score function of the Aegenet software. (C) Graphical representation of membership assignment probabilities (y-axis) for 40 individuals (x-axis) as calculated via DAPC analysis.

Migration rates based on estimates of the number of migrants ( $Nm$ ) between the analyzed regions demonstrated the existence of high gene flow between the two locations (Fig. 4). Between Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz, a gene flow value of 0.83 migrants from MP to PSC and 1.0 from migrants from PSC to MP was verified.



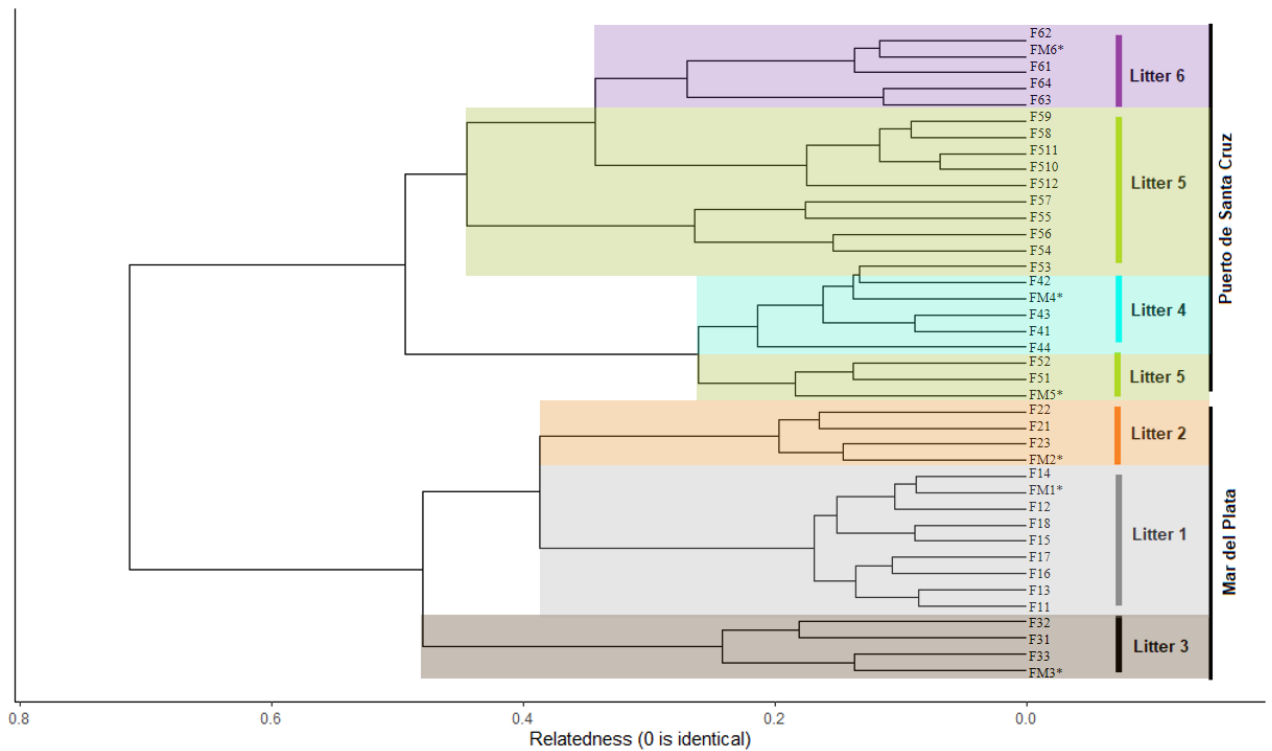
**Fig. 4.** Relative migration network between the locations covered in the study of samples of *Squalus acanthias* collected in different locations coast of Argentine. The arrows indicate the direction of migration, while the numbers and color of the black arrows indicate the relative rates of migration. Higher numbers and thicker lines signify the intensity of the migration process. MP: Mar del Plata; PSC: Puerto de Santa Cruz.

#### 4.2 Kinship analyses

We applied two methods to examine relatedness in the samples, namely genotype score correlation, using 377 SNPs with 100% of individuals genotyped (Fig. 1D). First, using the pairwise kinship coefficient  $\phi$  (Manichaikul et al. 2010) the probability of two alleles being identical by descent (IBD), estimated relatedness among all 40 individuals using the vcftools' relatedness2 function (Danecek et al. 2011).

We found a high relatedness among embryos on the basis of Manichaikul et al. (2010) statistic  $\Phi$ , between embryos from litter 1 (FM1) ranging from  $\phi = 0.393-0.417$ , between embryos from litter 2 (FM2) ranging from  $\phi = 0.369-0.394$ , between embryos from litter 3 (FM3)  $\phi = 0.340-0.359$ , among embryos from litter 4 (FM4)  $\phi = 0.336-0.384$ , and from litter 6 (FM6)  $\phi = 0.344-0.405$ . Only embryos from litter 5 (FM5) showed a greater variation, between  $\phi = 0.235-0.363$ .

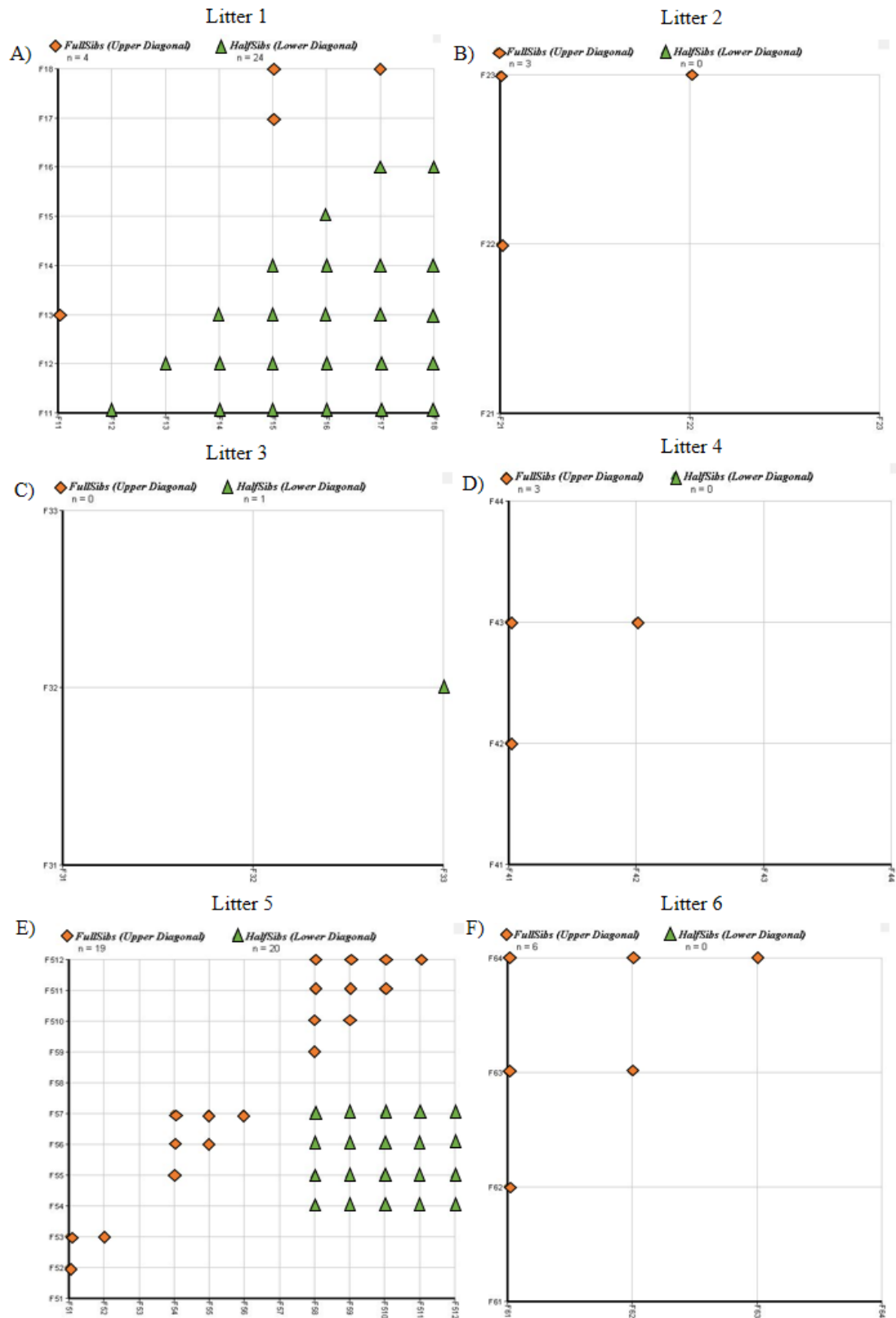
The clustering tree (Fig. 5) built on the basis of statistic  $\Phi$ , when plotted, identified 7 groups, distributed in six litters, represented by the colors gray (litter 1), orange (litter 2), dark gray (litter 3), blue (litter 4), green (litter 5) and purple (litter 6). Almost all embryos were located according to litter belonging, except for litter 5, in which individuals were allocated into two separate groups.



**Fig 5.** Clustering dendrogram based on hierarchical clustering of kinship coefficient  $\phi$ . The colors represent each litter (1 to 6); (\*) represents the mothers.

The COLONY program runs were performed with a reduced dataset with 377 SNPs. In total, 35 supposed full-sibling relationships were identified, distributed in 8 groups that ranged in size from two to five individuals, and 45 supposedly half-sibling relationships (Table S3). Full-sib and half-sib relationships are illustrated in Figure 6. Among the five litters analyzed, three presented only full-sib relationships (litters 2, 4 and 6) indicating the absence of polyandry. In the other three litters it was possible to identify the occurrence of polyandry, as they presented half-sib relationships in litters 1, 3 and 5.

In the first litter (Fig. 6A) two groups of full brothers and 24 half-sibling relationships were identified, with polyandrous behavior being identified with the occurrence of multiple paternity, with at least three males related to this litter. Litter 2 showed only full-sib relationships (Fig. 6B). Litter 3 presented three half-sibling relationships (Fig. 6C), with the possibility of at least two males (fathers) participating in this litter. Litter 4 showed only full-sib relationships (Fig. 6D). Litter 5 identified three groups of full-siblings and 20 half-sibling relationships (Fig. 6E), with the possibility of at least three males (fathers) involved in this litter. In litter 6 (Fig. 6F) they only had full-sib relationships. In this way, it was possible to detect multiple paternity in 3 of the 6 litters analyzed.



**Fig 6.** Graph generated by the COLONY program of sibling relationships. A: litter 1, B: litter 2, C: litter 3, D: litter 4, E: litter 5 and F: litter 6. Orange diamonds represent fullsib relationships and green triangles represent halfsib relationships.

## 5. Discussion

### 5.1 Genetic diversity

Based on data obtained from SNPs markers, the observed levels of heterozygosity ( $H_o=0.281-0.293$ ) in *S. acanthias* that are comparable to other widely distributed sharks such as the bull shark (*Carcharhinus leucas*) ( $H_o=0.128-0.214$ ) (Glau et al. 2020), the gray reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) ( $H_o=0.139-0.312$ ) (Momigliano et al. 2017) and the galapagos shark (*C. galapagensis*) ( $H_o=0.188-0.193$ ) (Pazmiño et al. 2017). In this study, the observed heterozygosity was greater than the expected heterozygosity, these values associated with negative inbreeding values ( $F_{IS}$ ) indicate the absence of inbreeding in the population analyzed.

The effective population number ( $N_e$ ) was recently estimated for wildlife populations due to availability and refinement of genetic estimators (Waples, 2016). The estimates observed in this study were low: 50.8 (42.4-62.8 CI) in Mar del Plata and 120.3 (88.0-186.4 CI) in Puerto de Santa Cruz, compared to other studies with sharks such as the lemon shark *Negaprion brevirostris* (Posteire et al. 2021), which varied between the localities studied from 11.5 (95% CI: 10.30-12.70) to 674.20 (95% CI: 157.30-  $\infty$ ), the author justifies that the lower  $N_e$  value was probably because of the smaller sample size and collected at different times, compared to the other regions and the scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* (Marie et al. 2019), which obtained a  $N_e= 191$  (CI 95%: 149.0 – 241) and  $N_e = 343.6$  (CI 95% : 343.0 – 344.3) in 104 unrelated individuals. The criterion proposed by Frankham et al. (2014) suggests that the minimum  $N_e$  necessary to maintain an evolutionary potential is  $N_e \geq 100$  is required to limit inbreeding depression to 10% over 5 generation and  $N_e \geq 1000$  is required for retaining evolutionary potential.

We cannot fail to mention that the value of  $N_e$  found in this study may have its reliability affected by being genetically related individuals, but these values provide us with an estimate for an initial state of conservation, which can be informative for management decisions and species management.

### 5.2 Population genetic structure and migration

The  $F_{ST}$  index found between *S. acanthias* samples indicates low genetic structuring (0.042), corroborated by the Bayesian structuring analysis. This is expected for widely distributed and migratory species such as the silk shark (*Carcharhinus falciformis*) (Derek et al. 2020), tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) (Bernard et al. 2021) and pale shark (*Sphyrna tiburo*) (Díaz-Jaimes et al. 2021).

The migratory habit of individuals can contribute to low structuring, when the gene flow is reduced, indicates that a population who suffers off overfishing, it may not be replenished by immigrants from nearby populations, in this study we found a high gene flow through the analysis based on the number of migrants between locations, demonstrating high connectivity, with the number of individuals who immigrate to Mar del Plata being more prominent, compared to individuals who emigrate to Puerto de Santa Cruz. It is for this reason that the genetic management of stocks is essential for the maintenance of species exploited by fisheries, whether intentional or unintentional (Tallmon et al. 2010).

Some patterns and characteristics of sharks may explain the maintenance of gene flow in the species. During evolutionary history, sharks have developed a variety of reproductive modes, such as viviparity, oviparity, parthenogenesis, and monogamous and polyandrous mating behavior, with polyandrous matings occurring more frequently (Green et al. 2017; Marie et al. 2019; Liu et al. 2020). At least seven orders of elasmobranchs exhibit polyandry behavior, namely: Carcharhiniformes, Hexanchiformes, Lamniformes, Orectolobiformes, Squaliformes, Rajiformes and Myliobatiformes (Rossouw et al. 2016).

This behavior is possible by the presence of a structure called the oviducal gland present in the female of practically all living Chondrichthyes, which allows the storage and mixing of sperm from different males (Hamlett et al. 1998; Hamlett et al. 1999). The polyandrous mating system can influence processes at population levels, leading to changes in the levels of genetic variability and inbreeding (Lamarca et al. 2020a), in addition to determining and increasing the number of viable offspring in a single litter (Newcomer et al. 1999).

The discovery of a single panmictic unit on the coast of Argentina provides a foundation for management and conservation actions for the area.

### **5.3 Relationship and kinship**

The fecundity observed in this study was moderate, with a variation of three to six offspring per litter, since the species can produce from one to 21 offspring per gestation cycle (Compagno, 1984), different than congeners *Squalus megalops*, which can develop three to six pups per pregnancy, and the species *S. blaiuillei*, which develops an average of three to four pups per litter (Ebert et al. 2013).

The number of offspring per litter is usually related to the size of the females, as already highlighted by Colonello et al. (2016), however, in this study, we do not have accurate information on their size. However, we found that the probability of having

higher rates of polyandry is higher in litters with a greater number of pups, among the three litters that we detected polyandry, two had a number of embryos that varied from nine to twelve. The same was also observed in the study by Lage et al. (2008) where 10 litters of *S. acanthias* were analyzed, and multiple paternity was detected in 3 litters, which were the largest. The correlation of female size x litter size was found by Veríssimo et al. (2011) with 29 litters analyzed, 5 of them presented polyandry, however the litter size was similar for polyandrous and monandrous females.

Females of *S. acanthias* present sexual dimorphism in relation to males of the same species and, it is suggested that female size is directly related to fertility (Lombardi, 1998), this shows that females become sexually mature with a longer period than males. Furthermore, *S. acanthias* has an occurrence of bathymetric variation between the sexes, that is, males and females are distributed at different depths, in which males are often captured in deep waters, and females in smaller depths, usually in a state of maturation or pregnant, suffering even more from the population decline caused by fishing (Shepherd et al. 2002; Lamarca et al. 2020b).

It is already known that throughout the Atlantic Ocean, *S. acanthias* is fished as a by-catch by the main industrial fisheries, but is normally discarded at sea (Cedrola et al. 2012). This fishing exploitation can decrease the reproduction rates of potential mates, due to decreased abundance or changes in the sex ratio of mature individuals (Daly-Engel et al. 2006).

Many sharks and rays have already become extinct, about a third of the species have already been lost due to human pressures, and fishing was responsible for the extinction of 67.3% of these species (Dulvy et al. 2021). Given the importance of maintaining genetic variability for the existence of a species, the findings of this study emphasize the need for management policies and management of species exploited by fisheries, especially in sharks, which have complex life characteristics and have a history of low replacement of stocks.

The occurrence of multiple paternity can maintain the gene flow and genetic diversity of a population, while producing a greater number of offspring in a single litter (Hoekert et al. 2002; Newcomer et al. 1999), in addition to helping the reduction of infertility (Schmidt et al. 2010). For this reason, multiple matings with the occurrence of multiple paternity may be essential in support genetic diversity within this species.

## 6. List of Supplementary Material

**Tabela S1.** Lista das amostras disponíveis para estudo de *Squalus acanthias*, provenientes da Argentina. MP: Mar del Plata / PSC: Puerto de Santa Cruz

	<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Voucher</b>
<b>1</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-1
<b>2</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-2
<b>3</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-3
<b>4</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-4
<b>5</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-5
<b>6</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-6
<b>7</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-7
<b>8</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-8
<b>9</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-9
<b>10</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-10
<b>11</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ1-11
<b>12</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-1
<b>13</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-2
<b>14</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-3
<b>15</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-4
<b>16</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-5
<b>17</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-6
<b>18</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-7
<b>19</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-8
<b>20</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-9
<b>21</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-10
<b>22</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-11
<b>23</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ2-12
<b>24</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-1
<b>25</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-2
<b>26</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-3
<b>27</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-4
<b>28</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-5
<b>29</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-6
<b>30</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-7
<b>31</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-8
<b>32</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ3-9
<b>33</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ4-1
<b>34</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ4-2
<b>35</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ4-3
<b>36</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ4-4
<b>37</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-1
<b>38</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-2
<b>39</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-3
<b>40</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-4
<b>41</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-5
<b>42</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-6
<b>43</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-7
<b>44</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-8
<b>45</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-9
<b>46</b>	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-10



47	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-11
48	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-12
49	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ7-13
50	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-1
51	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-2
52	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-3
53	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-4
54	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-5
55	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-6
56	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-7
57	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ15-8
58	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-1
59	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-2
60	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-3
61	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-4
62	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-5
63	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-6
64	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ16-7
65	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ23-1
66	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ23-2
67	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ23-3
67	<i>Squalus acanthias</i>	MP/Argentina	SQ23-4
68	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ26-1
69	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ26-2
70	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ26-3
71	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ26-4
72	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ26-5
73	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-1
74	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-2
75	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-3
76	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-4
77	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-5
78	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-6
79	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-7
80	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-8
81	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-9
82	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-10
83	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-11
84	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-12
85	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-13
86	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ27-14
87	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-1
88	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-2
89	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-3
90	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-4
91	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-5
92	<i>Squalus acanthias</i>	PSC/Argentina	SQ30-6

**Table S2.** Summary of ddRAD sequencing and processing of reads filtering in individuals of the species *Squalus acanthias* from Mar del Plata and Puerto de Santa Cruz. ID: identification for samples in this study.

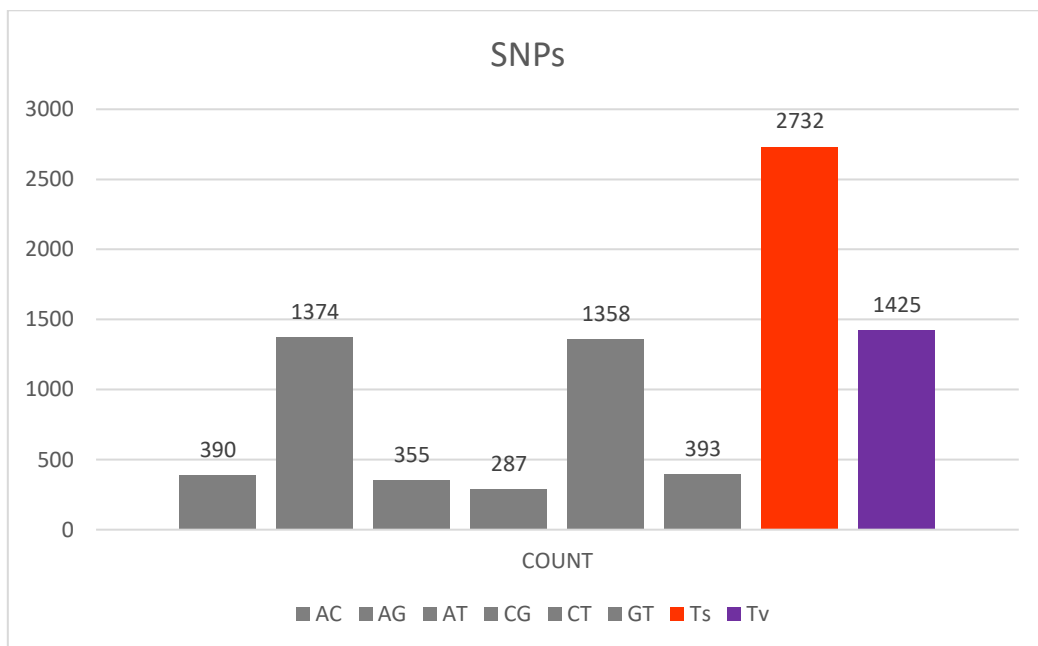
Voucher	ID Voucher	Location	Raw Data	Quality Lenght 135pb	Quality Filtering 20	Digest	143pb
*SQ31	FM1	MP/Argentina	2.409.454	1.317.718	1.316.361	1.250.233	1.131.669
SQ32	F11	MP/Argentina	2.225.154	1.287.308	1.285.946	1.220.403	1.107.996
SQ33	F12	MP/Argentina	2.595.289	1.437.826	1.436.371	1.364.838	1.236.358
SQ34	F13	MP/Argentina	3.447.616	1.972.807	1.970.973	1.873.556	1.701.036
SQ35	F14	MP/Argentina	2.661.341	1.558.481	1.557.199	1.478.492	1.345.300
SQ36	F15	MP/Argentina	1.966.165	1.239.790	1.238.643	1.177.495	1.071.874
SQ37	F16	MP/Argentina	2.247.754	1.486.584	1.485.017	1.416.181	1.295.068
SQ38	F17	MP/Argentina	1.761.139	1.299.940	1.298.959	1.228.150	1.140.035
SQ39	F18	MP/Argentina	2.722.878	1.472.889	1.471.112	1.393.700	1.264.730
*SQ41	FM2	MP/Argentina	2.635.520	1.488.260	1.486.319	1.404.455	1.277.589
SQ42	F21	MP/Argentina	2.215.224	1.319.692	1.317.980	1.248.830	1.135.566
SQ43	F22	MP/Argentina	2.279.136	1.265.672	1.264.289	1.198.779	1.087.173
SQ44	F23	MP/Argentina	1.327.398	761.635	760.880	723.657	656.813
*SQ231	FM3	MP/Argentina	2.140.982	1.236.841	1.235.387	1.170.443	1.066.252
SQ232	F31	MP/Argentina	1.714.486	943.757	942.361	891.321	808.349
SQ233	F32	MP/Argentina	2.297.156	1.372.439	1.371.050	1.298.897	1.180.004
SQ234	F33	MP/Argentina	2.304.334	1.447.853	1.446.177	1.378.297	1.256.529
*SQ261	FM4	PSC/Argentina	1.817.923	1.002.082	1.000.672	947.261	859.345
SQ262	F41	PSC/Argentina	1.979.518	1.114.825	1.113.434	1.055.568	964.436
SQ263	F42	PSC/Argentina	2.131.274	1.041.946	1.040.611	985.073	887.470
SQ264	F43	PSC/Argentina	2.600.901	1.344.717	1.343.264	1.274.425	1.146.768
SQ265	F44	PSC/Argentina	3.006.625	1.431.545	1.429.798	1.352.112	1.214.970
*SQ271	FM5	PSC/Argentina	2.420.747	1.367.697	1.365.836	1.295.567	1.174.841
SQ272	F51	PSC/Argentina	1.082.597	639.792	638.844	594.373	541.427
SQ273	F52	PSC/Argentina	2.547.519	1.538.536	1.536.807	1.463.935	1.335.102
SQ274	F53	PSC/Argentina	2.560.784	1.384.799	1.383.091	1.278.603	1.156.564
SQ275	F54	PSC/Argentina	2.640.081	1.522.506	1.520.619	1.438.887	1.309.306
SQ276	F55	PSC/Argentina	2.572.571	1.343.975	1.342.512	1.268.775	1.151.486
SQ278	F56	PSC/Argentina	2.678.957	1.673.108	1.671.627	1.561.319	1.427.219
SQ279	F57	PSC/Argentina	2.093.257	1.551.888	1.550.402	1.472.527	1.365.734
SQ2710	F58	PSC/Argentina	2.400.524	1.235.787	1.233.934	1.143.086	1.033.641
SQ2711	F59	PSC/Argentina	2.180.316	1.345.459	1.344.135	1.273.116	1.159.222
SQ2712	F510	PSC/Argentina	2.727.283	1.675.426	1.673.649	1.583.476	1.446.120
SQ2713	F511	PSC/Argentina	2.527.244	1.656.320	1.654.696	1.552.727	1.418.287
SQ2714	F512	PSC/Argentina	2.439.703	1.263.975	1.262.419	1.191.386	1.079.665
*SQ301	FM6	PSC/Argentina	3.124.731	1.837.582	1.835.726	1.739.983	1.585.072
SQ302	F61	PSC/Argentina	2.978.525	1.617.902	1.616.385	1.536.488	1.392.157
SQ303	F62	PSC/Argentina	2.740.117	1.654.079	1.652.435	1.569.384	1.429.175
SQ304	F63	PSC/Argentina	2.534.038	1.447.672	1.445.796	1.366.632	1.246.671
SQ305	F64	PSC/Argentina	1.572.685	975.107	974.144	919.895	838.038
<b>TOTAL</b>			<b>94.308.943</b>	<b>54.576.217</b>	<b>54.515.860</b>	<b>51.582.038</b>	
<b>Mean</b>			2.357.724	1.364.405	1.362.897		

**Raw date:** number of reads obtained after sequencing; **Quality lenght:** reads smaller than 135bp have been removed; **Phred Quality < 20:** reads with quality below Q20 have been removed; **In silico digestion:** removal of reads that have regions of enzymatic sites; **143bp:** Standardization of reads to 143bp for tracking SNPs in the STACKS pipeline; (\*): individuals who were selected according to the number of reads, for the assembly of the catalog (de novo).

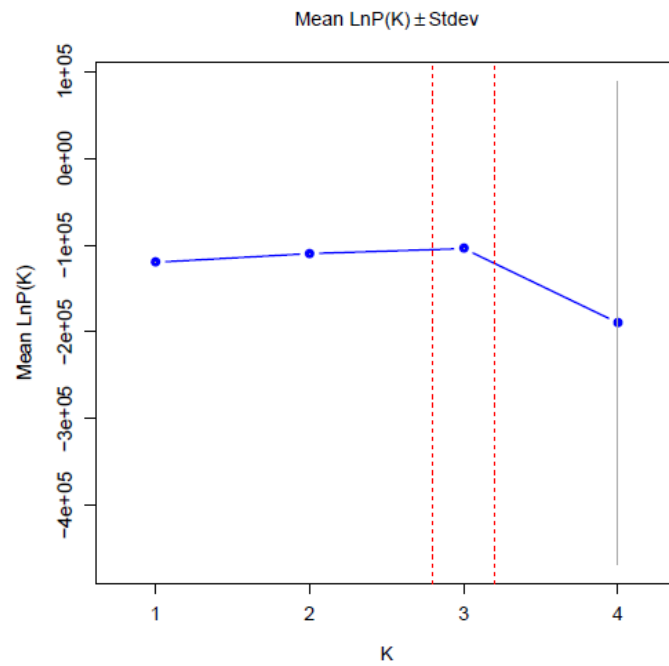
**Table S3.** Full sib assignments results obtained using COLONY.

Fullsib family	Member1	Member2	Member3	Member4	Member5
1	F11	F13			
2	F15	F17	F18		
3	F21	F22	F23		
4	F41	F42	F43		
5	F51	F52	F53		
6	F54	F55	F56	F57	
7	F58	F59	F510	F511	F512
8	F61	F62	F63	F64	

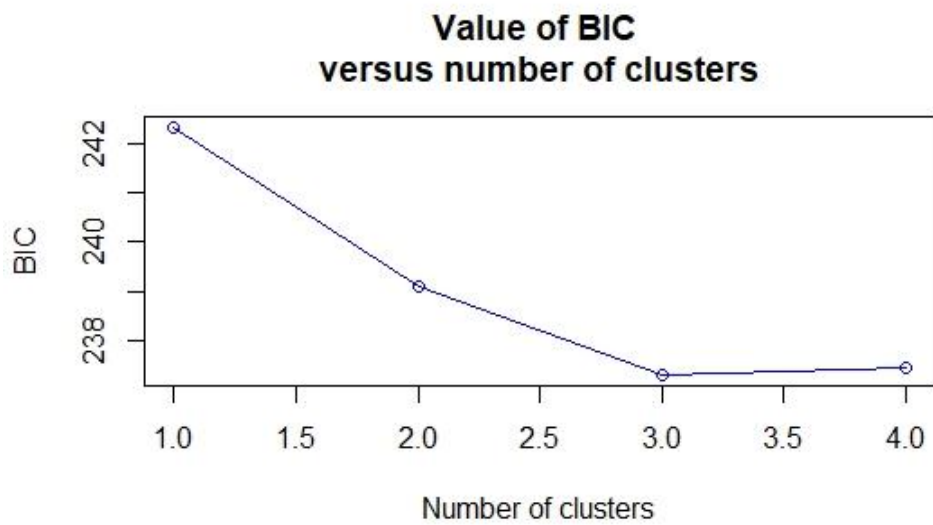
For each full siblingship family, the identification's number of each individual is provided.



**Fig S1.** Identification of transitions (orange) and transversions (purple) distributed in a set of 4.157 SNPs characterized in *Squalus acanthias*.



**Fig S2.** Evanno's method estimate, which demonstrated the greatest probability of clusters of  $k=3$ .



**Fig S3.** Optimal cluster number  $k=3$  identified using Bayesian Information Criterion (BIC) for DAPC Analysis.

## 7. Referências Bibliográficas

- Allendorf F, Hohenlohe P, Luikart G (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews genetics*, 697-709.
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe PA (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.
- Andrews S (2018). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Johnson EA (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS one*, 3(10), e3376.
- Baranes A (2003). Sharks from the Amirantes Islands, Seychelles, with a description of two new species of squaloids from the deep sea. *Israel Journal of Zoology*, 49, 33–65.
- Bargione G, Donato F, La Mesa M, Mazzoldi C, Riginella E, Vasapollo C, Lucchetti A. (2019). Life-history traits of the spiny dogfish *Squalus acanthias* in the Adriatic Sea. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Barker AM, Frazier BS, Gelsleichter J, Grubbs RD, Hollenbeck CM, Portnoy DS. (2019). High rates of genetic polyandry in the Blacknose Shark, *Carcharhinus acronotus*. *Copeia*, 107(3), 502-508.
- Bernard AM, Finnegan KA, Pavinski Bitar P, Stanhope MJ, Shivji MS (2021). Genomic assessment of global population structure in a highly migratory and habitat versatile apex predator, the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *Journal of Heredity*, 112(6), 497-507.
- Bester-van der Merwe AE, Maduna SN, Hull KL, Bell J, Rossouw C, Wintner SP (2019). Evidence for multiple paternity and confirmation of an Indo-Pacific origin of blacktip shark *Carcharhinus limbatus* occurring in South Africa. *African Journal of Marine Science*, 41(3), 281-289.
- Bigelow HB & Schroeder WC (1957). A study of the sharks of the suborder Squaloidea. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College in Cambridge*, 1–150.
- Birkhead TR, Møller AP. *Sperm Competition and sexual selection* (1998). Academic Press.
- Bolger AM, Lohse M, & Usadel B. Trimmomatic: um trimmer flexível para dados de sequência Illumina. *Bioinformatics* 30, 2114–2120 (2014). *Scientific RepoRtS*, 10, 13443.

- Boomer JJ, Harcourt RG, Francis MP, Walker TI, Braccini JM, & Stow AJ (2013). Frequency of multiple paternity in gummy shark, *Mustelus antarcticus*, and rig, *Mustelus lenticulatus*, and the implications of mate encounter rate, postcopulatory influences, and reproductive mode. *Journal of Heredity*, 104(3), 371-379.
- Byrne RJ & Avise JC (2012). Genetic mating system of the brown smoothhound shark (*Mustelus henlei*), including a literature review of multiple paternity in other elasmobranch species. *Marine Biology* Volume 159, Number 4 (2012), 749-756, Doi: 10.1007/s00227-011-1851-z.
- Camargo SM, Coelho R, Chapman D, Howey-Jordan L, Brooks EJ, Fernando D, ... & Mendonca FF (2016). Structure and genetic variability of the oceanic whitetip shark, *Carcharhinus longimanus*, determined using mitochondrial DNA. *PloS one*, e0155623.
- Campos M, Conn JE, Alonso DP, Vinetz JM, Emerson KJ, & Ribolla PEM (2017). Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasites & vectors*, 1-8.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W & Postlethwait JH (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 171-182.
- Cedrola PV, González AM, Chiaramonte GE, & Pettovello AD (2012). Bycatch of sharks (Elasmobranchii) in the Patagonian red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) fishery. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 14(2), 349-356.
- Chabot CL, Haggin BM (2014). Frequency of multiple paternity varies between two populations of brown smoothhound shark, *Mustelus henlei*. *Marine Biology*, 161(4), 797-804.
- Chapman DD, Prodohl PA, Gelsleichter J, Manire CA, Shivji MS (2004). Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: implications for shark conservation. *Mol Ecol*. 13:1965–1974.
- Chapman DD, Wintner SP, Abercrombie DL, Ashe J, Bernard AM, Shivji MS, Feldheim KA (2013). The behavioural and genetic mating system of the sand tiger shark, *Carcharias taurus*, an intrauterine cannibal. *Biology letters*, 9(3), 20130003.
- Chevolot M, Ellis JR, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2007). Multiple paternity analysis in the thornback ray *Raja clavata* L. *J Hered*. 98:712–715.
- Colloca F, Carrozzi V, Simonetti A & Di Lorenzo M (2020). Using local ecological knowledge of fishers to reconstruct abundance trends of elasmobranch populations in the Strait of Sicily. *Frontiers in Marine Science*, 7, 508.

- Colonello JH, Cortés F, Belleggia M, Massa AM (2016). Reproductive and population parameters of spiny dogfish *Squalus acanthias* in the south-western Atlantic Ocean. *Journal of fish biology*, 88(5), 1758-1775.
- Compagno LJV (1984). *FAO species catalogue. v. 4:(1) Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date, Pt. 1-Hexanchiformes to Lamniformes.*
- Compagno LJV, Dando M, Fowler S (2005). *Sharks of the World – Princeton Field Guides.* Harper Collins Publishers Ltd., London, 368 pp.
- Corrigan S, Kacev D, Werry J (2015). A case of genetic polyandry in the shortfin mako *Isurus oxyrinchus*. *Journal of fish biology*, 87(3), 794-798.
- Craven KS, Webb C, Ragsdale AK, Schrey AW (2018). A pilot study of multiple paternity in three litters of spiny dogfish (*Squalus acanthias*) off the South Carolina/Georgia coast. *Bios*, 89(1), 23-28.
- Cruz VP, Adachi AM, Oliveira P H, Ribeiro GS, Paim FG, Souza BC, 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.
- Cruz VP, Vera M, Pardo BG, 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*. Doi 10.1111/1755-0998.12564.
- Daly-Engel TS, Grubbs RD, Feldheim KA, Bowen BW, Toonen RJ (2010). Is multiple paternity beneficial or unavoidable? Low multiple paternity and genetic diversity in the shortspine spurdog *Squalus mitsukurii*. *Mar Ecol Prog Ser.* 403:255–267.
- Daly-Engel TS, Grubbs RD, Holland KN, Toonen RJ, & Bowen BW (2006). Assessment of multiple paternity in single litters from three species of carcharhinid sharks in Hawaii. *Environmental Biology of Fishes*, 419-424.
- Daly-Engel TS, Grubbs RD, Bowen BW, Toonen RJ (2007). Frequency of multiple paternity in an unexploited tropical population of sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(2), 198-204.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA. 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.

- Dell’Apa A, Bangley CW, Rulifson RA. Who let the dogfish out? A review of management and socio-economic aspects of spiny dogfish fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 25, 273–295 (2015).
- Díaz-Jaimes P, Bayona-Vásquez NJ, Escatel-Luna E, Uribe-Alcocer M, Pecoraro C, Adams DH, Babbucci M. (2021). Population genetic divergence of bonnethead sharks *Sphyrna tiburo* in the western North Atlantic: Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(1), 83-98.
- DiBattista JD, Feldheim KA, Thibert-Plante X, Gruber SH, Hendry AP (2008). A genetic assessment of polyandry and breeding-site fidelity in lemon sharks. *Mol Ecol.* 17:3337–3351.
- DiBattista JD, Saenz-Agudelo P, Piatek MJ, Wang X, Aranda M, Berumen ML (2017). Using a butterflyfish genome as a general tool for RAD-Seq studies in specialized reef fish. *Molecular Ecology Resources*. Doi 10.1111/1755-0998.12662.
- Domingues RR, Hilsdorf AWS & Gadig OBF (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 1-25.
- Domingues RR, Mastrochirico-Filho VA, Mendes NJ, Hashimoto DT, Coelho R, Cruz, VP, Mendonça FF (2020). Comparative eye and liver differentially expressed genes reveal monochromatic vision and cancer resistance in the shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Genomics*, 4817-4826.
- Driller M, Vilaca ST, Arantes LS, Carrasco-Valenzuela T, Heeger F, Chevallier D, Mazzoni CJ (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*.
- Duchatelet L, Oury N, Mallefet J, Magalon H (2020). In the intimacy of the darkness: Genetic polyandry in deep-sea luminescent lanternsharks *Etmopterus spinax* and *Etmopterus molleri* (Squaliformes, Etmopteridae). *Journal of Fish Biology*, 96(6), 1523-1529.
- Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavahagh RD, Kyne PM, Harrison LR, Carlson JK, Davidson LNK, Fordham SV, Francis MP, Pollock CM, Simpfendorfer CA, Burgess GH, Carpenter KE, Compagno LJV, Ebert DA, Gibson C, Heupel MR, Livingstone SR, Sanciangco JC, Stevens JD, Valenti S, White WT (2014). Extinction risk and conservation of the world’s sharks and rays. *Elife*, e00590.
- Dulvy NK, Pacoureaux N, Rigby CL, Pollom RA, Jabado RW, Ebert DA, Simpfendorfer CA (2021). Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. *Current Biology*, 31(21), 4773-4787.



- Dulvy NK, Simpfendorfer CA, Davidson LN, Fordham SV, Bräutigam A, Sant G, Welch D J (2017). Challenges and priorities in shark and ray conservation. *Current Biology*, 27(11), R565-R572.
- Ebert DA, White WT, Goldmann KJ, Compagno LJV, Daly-Engel TS, Ward RD (2010). Resurrection and redescrptions of *Squalus suckleyi* (Girard, 1854) from the North Pacific, with comments on the *Squalus acanthias* subgroup (Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa*, 2612, 22–40
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 2611-2620.
- Evans JP, Kelley JL (2008). Implications of multiple mating for offspring relatedness and shoaling behaviour in juvenile guppies. *Biol Lett.* 4:623–626.
- Evans JP, Magurran AE (2000). Multiple benefits of multiple mating in guppies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10074–10076.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 3047-3048.
- Farrell ED, O'Sullivan N, Sacchi C, Mariani S. (2014). Multiple paternity in the starry smooth-hound shark *Mustelus asterias* (Carcharhiniformes: Triakidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 111(1), 119-125.
- Feldheim KA, Gruber SH & Ashley MV (2004). Reconstruction of parental microsatellite genotypes reveals female polyandry and philopatry in the lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Evolution.* 58:2332–2342.
- Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001). Multiple paternity of a lemon shark litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae). *Copeia*, 2001(3), 781-786.
- Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001). Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 295-303.
- Finucci B, Cheek J, Chiamonte GE, Cotton CF, Dulvy NK, Kulka DW, Neat FC, Pacoureau N, Rigby CL, Tanaka S, Walker TI (2020). *Squalus acanthias*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Flanagan SP, Jones AG (2019). The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. *Molecular ecology.* 28, 544-567.
- Fox RJ, Head ML, Jennions MD (2019). Disentangling the costs of male harassment and the benefits of polyandry for females. *Behav Ecol* 30(3):872–881. <https://doi.org/10.1093/beheco/arz024>

- Franco B, Mendonça, FF, Oliveira C, & Foresti F (2012). Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: genetic identification to aid conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 272-276.
- Frankham R (2005). Genetics and extinction. *Biol Conserv.* 126:131–140.
- Frankham R, Bradshaw CJ, Brook BW (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- Fricke R, Eschmeyer WN, 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> (March 18, 2021).
- Funk WC, McKay JK, Hohenlohe PA & Allendorf FW (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in ecology & evolution*, 489-96.
- Glaus KB, Appleyard SA, Stockwell B, Brunnschweiler JM, Shivji M, Clua E, Rico C. (2020). Insights Into Insular Isolation of the Bull Shark, *Carcharhinus leucas* (Müller and Henle, 1839), in Fijian Waters. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1087.
- Gomes UL, Santos HRS, Gadig OBF, Signori CN, Vicente MM (2019) Identification Guide of sharks, batoids and chimaeroids from Rio de Janeiro State (Chondrichthyes: Elasmobranchii e Holocephali). 27, 198.
- Gračan R, Lazar B, Zupan S, Bužan, E. (2020). Genetic characterisation of the spiny dogfish *Squalus acanthias* in the Adriatic Sea: evidence for high genetic diversity and an Atlantic–South Pacific origin. *Marine and Freshwater Research*, 72(1), 131-139.
- Green ME, Appleyard SA, White W, Tracey S & Ovenden J (2017). Variability in multiple paternity rates for grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*). *Scientific reports*, 1528.
- Green ME, Appleyard SA, White W, Tracey S, Ovenden J (2017). Variability in multiple paternity rates for grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*). *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
- Griffiths AM, Jacoby DMP, Casane D, McHugh M, Croft DP, Genner MJ, Sims DW (2011). First Analysis of Multiple Paternity in an Oviparous Shark, the Small-Spotted Catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *J Hered* (March-April 2012): 166-173.doi: 10.1093/jhered/esr112 First published online: November 3, 2011.
- Griffiths AM, Jacoby DMP, Casane D, McHugh M, Croft DP, Genner MJ, Sims DW (2011). First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark

- (*Scyliorhinus canicula* L.). *Journal of Heredity*, 103(2), 166–173.  
<https://doi.org/10.1093/jher>
- Grubbs RD, Carlson JK, Romine JG, Curtis TH, McElroy WD, McCandless CT, Cotton CF, Musick JA (2016). Critical assessment and ramifications of a purported marine trophic cascade. *Scientific Reports*, (6) 20970. doi: 10.1038/srep20970
- Hamlett WC, Hysell MK (1998). Uterine specializations in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology*, 438-459.
- Hamlett WC, Koob T (1999). Female reproductive system. Pp. 398-443. In W. C. Hamlett (ed.), *Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranchs Fishes*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Heist EJ, Carrier JC, Pratt Jr HL, Pratt TC (2011). Exact enumeration of sires in the polyandrous nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Copeia*, 2011(4), 539-544.
- Hernandez S, Duffy C, Francis MP, Ritchie PA (2014). Evidence for multiple paternity in the school shark *Galeorhinus galeus* found in New Zealand waters. *Journal of Fish Biology*, 85(5), 1739-1745.
- Hoekert WEJ, Neufeglise H, Schouten AD, Menken SBJ (2002). Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity*, 89(2), 107-113.
- Holmes BJ, Pope LC, Williams SM, Tibbetts IR, Bennett MB, Ovenden JR (2018). Lack of multiple paternity in the oceanodromous tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *Royal Society Open Science*, 5(1), 171385.
- Janse M, Kappe AL, Van Kuijk BLM (2013). Paternity testing using the poisonous sting in captive white-spotted eagle rays *Aetobatus narinari*: A non-invasive tool for captive sustainability programmes. *Journal of Fish Biology*, 82(3), 1082–1085.  
<https://doi.org/10.1111/jfb.12038>.
- Johri S, Solanki J, Cantu VA, Fellows SR, Edwards RA, Moreno I, Dinsdale EA (2019). Genome skimming with the MinION hand-held sequencer identifies CITES-listed shark species in India's exports market. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Jombart T, Ahmed I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071.
- Jones OR, & Wang J (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular ecology resources*, 551-555.
- Keenan K, McGinnity P, Cross TF, Crozier WW, Prodöhl PA. (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.

- King JR, McFarlane GA. Marine fish life history strategies: Applications to fishery management. *Fish. Manag. Ecol.* 10, 249–264 (2003).
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191.
- Kraft DW, Conklin EE, Barba EW, Hutchinson M, Toonen RJ, Forsman ZH, Bowen B. W. (2020). Genomics versus mtDNA for resolving stock structure in the silky shark (*Carcharhinus falciformis*). *PeerJ*, 8, e10186.
- Kumar G, Kocour M. (2017). Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. *Fisheries Research*, 186, 11-22.
- Lage CR, Petersen CW, Forest D, Barnes D, Kornfield I, Wray C (2008). Evidence of multiple paternity in spiny dogfish (*Squalus acanthias*) broods based on microsatellite analysis. *J Fish Biol.* 73:2068–2074.
- Lamarca F, Carvalho PH, Vilasboa A, Netto-Ferreira AL, & Vianna M (2020a). Is multiple paternity in elasmobranchs a plesiomorphic characteristic? *Environmental Biology of Fishes*, 1-9.
- Lamarca F, Vianna M, & Vilasboa A (2020b). The first reproductive parameters and evidence of multiple paternity in one new spiny dogfish species, *Squalus albicaudus* (Squaliformes, Squalidae). *Journal of Fish Biology*, 1268-1272.
- Lamb A, Edgell P (1986). *Coastal fishes of the Pacific northwest*. Madeira Park, (BC, Canada): Harbour Publishing Co. Ltd., 224p.
- Larson S, Christiansen J, Griffing D, Ashe J, Lowry D, Andrews K (2011). Relatedness and polyandry of sixgill sharks *Hexanchus griseus*, in an urban estuary. *Conservation Genetics*. Volume 12, Number 3 (2011), 679-690, DOI: 10.1007/s10592-010-0174-9.
- Last PR, White WT & Pogonoski JJ (2007). Descriptions of new dogfishes of the genus *Squalus* (Squaloidea: Squalidae). *CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper*, 14, 130 pp.
- Liu SYV, Tsai WP, Lee M, & Chien HW (2020). Accessing multiple paternity in the shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Zoological studies*, 59.
- Lombardi J. (1998) *Life Histories*. In: *Comparative Vertebrate Reproduction*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4937-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4937-6_12).
- Lyons K, Chabot CL, Mull CG, Paterson Holder CN, Lowe CG (2017). Who's My Daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. *Ecology and Evolution*, 7(15), 5603–5612, <https://doi.org/10.1002/ece3.3086>.

- Maduna SN, Van Wyk JH, Da Silva C, Gennari E, Bester-Van Der Merwe AE (2018). Evidence for sperm storage in common smoothhound shark *Mustelus mustelus* and paternity assessment in a single litter from South Africa. *Journal of Fish Biology*, 92(4), 1183-1191.
- Mamoozadeh NR, Graves JE, McDowell JR (2020). Genome-wide SNPs resolve spatiotemporal patterns of connectivity within striped marlin (*Kajikia audax*), a broadly distributed and highly migratory pelagic species. *Evolutionary applications*, 13(4), 677-698.
- Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS, Daly K, Sale M, Chen WM. (2010). Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 26(22), 2867-2873.
- Marie AD, Herbing C, Fullsack P, Rico C. (2019). First reconstruction of kinship in a scalloped hammerhead shark aggregation reveals the mating patterns and breeding sex ratio. *Frontiers in Marine Science*, 676.
- Marino IA, Riginella E, Gristina M, Rasotto MB, Zane L, Mazzoldi, C (2015). Multiple paternity and hybridization in two smooth-hound sharks. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2011). Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Fish Biology and Fisheries*. Doi 10.1007/s11160-011-9210-1.
- Miller R, Cloutier R, Turner S (2003). The oldest articulated chondrichthyan from the Early Devonian period. *Nature* 425, 501–504. <https://doi.org/10.1038/nature02001>
- Momigliano P, Harcourt R, Robbins WD, Jaiteh V, Mahardika GN, Sembiring A, Stow A (2017). Genetic structure and signatures of selection in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Heredity*, 119(3), 142-153.
- Mourier J, Buray N, Schultz JK, Clua E, Planes S (2013). Genetic network and breeding patterns of a sicklefin lemon shark (*Negaprion acutidens*) population in the Society Islands, French Polynesia. *PLoS One*, 8(8), e73899.
- Murdy EO, Musick JA (2013). *Field guide to fishes of the Chesapeake Bay*. JHU Press, 360 p.
- Muus BJ (1999). *Freshwater fish*. Scandinavian Fishing Year Book.
- Myers RA, Worm B (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1453), 13-20.

- Newcomer SD, Zeh JA, Zeh DW (1999). Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10236-10241.
- Nosal AP, Lewallen EA, Burton RS (2013). Multiple paternity in leopard shark (*Triakis semifasciata*) litters sampled from a predominantly female aggregation in La Jolla, California, USA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446, 110-114.
- Ohta Y, Okamura K, McKinney EC, Bartl S, Hashimoto K, Flajnik MF (2000). Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 4712-4717.
- Ohta Y, Shiina T, Lohr RL, Hosomichi K, Pollin TI, Heist EJ, Suzuki S, Inoko H, Flajnik MF (2011). Primordial linkage of beta 2-microglobulin to the MHC. *Journal of Immunology* 186:3563–3571.
- Oleksiak MF. *Marine genomics: insights and challenges*. 2016.
- Osgood GJ, White ER, Baum JK. (2021). Effects of climate-change-driven gradual and acute temperature changes on shark and ray species. *Journal of Animal Ecology*, 90(11), 2547-2559.
- Ovenden JR, Dudgeon C, Feutry P, Feldheim K, & Maes GE (2018). *Genetics and Genomics for Fundamental and Applied Research on Elasmobranchs*. *Shark Research: Emerging Technologies and Applications for the Field and Laboratory*.
- Pacoureau N, Rigby CL, Kyne PM, Sherley RB, Winker H, Carlson J, Dulvy NK (2021). Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. *Nature*, 589, 567-571.
- Pavan-Kumar A, Gireesh-Babu P, Babu PS, Jaiswar AK, Krishna VH, Prasad KP, Lakra WS (2014). Molecular phylogeny of elasmobranchs inferred from mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Biology Reports*, 447-457.
- Pazmiño DA, Maes GE, Simpfendorfer CA, 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.
- Pearce J, Fraser MW, Sequeira AM, Kaur P. (2021). State of Shark and Ray Genomics in an Era of Extinction. *Frontiers in Marine Science*, 8, 744986.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS one*, e37135.

- Pfleger MO, Grubbs RD, Cotton CF, Daly-Engel TS (2018). *Squalus clarkae* sp. nov., a new dogfish shark from the Northwest Atlantic and Gulf of Mexico, with comments on the *Squalus mitsukurii* species complex. *Zootaxa*, 101-119.
- Pirog A, Jaquemet S, Soria M, Magalon H (2015). First evidence of multiple paternity in the bull shark (*Carcharhinus leucas*). *Marine and Freshwater Research*, 68(1), 195-201.
- Pirog A, Magalon H, Poirout T, Jaquemet S (2019). Reproductive biology, multiple paternity and polyandry of the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, 95(5), 1195-1206.
- Pirog A, Magalon H, Poirout T, Jaquemet S (2020). New insights into the reproductive biology of the tiger shark *Galeocerdo cuvier* and no detection of polyandry in Reunion Island, western Indian Ocean. *Marine and Freshwater Research*, 71(10), 1301-1312.
- Portnoy DS, Piercy AN, Musick JA, Burgess GH, Graves JE (2007). Genetic polyandry and sexual conflict in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Mol Ecol*. 16:187–197.
- Postaire BD, Feldheim KA, Clementi GM, Quinlan J, van Zinnicq Bergmann MPM, Brooks, EJ, Chapman DD (2022). Small localized breeding populations in a widely distributed coastal shark species. *Conservation Genetics*, 23(1), 51-61.
- Pratt HL, Carrier JC, Hamlett WC (2005). Elasmobranch courtship and mating behavior. *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras*, 129-169.
- Pratt Jr HL, Carrier JC (2001). A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Env. Biol. Fish.* 60:157–188.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 945-959.
- Queller DC, Goodnight KF (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258 – 275.
- Roff G, Doropoulos C, Rogers A, Bozec YM, Krueck NC, Aurellado E, Mumby PJ (2016). The ecological role of sharks on coral reefs. *Trends in ecology & evolution*, 31(5), 395-407.
- Rossouw C, Wintner SP, Bester-Van Der Merwe AE (2016). Assessing multiple paternity in three commercially exploited shark species: *Mustelus mustelus*, *Carcharhinus obscurus* and *Sphyrna lewini*. *J Fish Biol* 89:1125–1141. <https://doi.org/10.1111/jfb.12996>
- Saville KJ, Lindley AM, Maries EG, Carrier JC, Pratt HL (2002). Multiple paternity in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes*, 63(3), 347-351.

- Schmidt JV, Chen CC, Sheikh SI, Meekan MG, Norman BM, Joung SJ (2010). Paternity analysis in a litter of whale shark embryos. *Endangered Species Research*, 12(2), 117-124.
- Schmidt L (2010). Psychosocial consequences of infertility and treatment. In *Reproductive endocrinology and infertility* (pp. 93-100). Springer, New York, NY.
- Shepherd T, Page F, Macdonald B (2002). Length and sex-specific associations between spiny dogfish (*Squalus acanthias*) and hydrographic variables in the bay of Fundy and Scotian shelf. *Fisheries Oceanography*, 11(2), 78– 89.
- Simpfendorfer CA, Heupel MR, Kendal D (2021). Complex human-shark conflicts confound conservation action. *Frontiers in Conservation Science*, 35.
- Stein RW, Mull CG, Kuhn TS, Aschliman NC, Davidson LN, Joy JB, Mooers AO (2018). Global priorities for conserving the evolutionary history of sharks, rays and chimaeras. *Nature ecology & evolution*, 2(2), 288-298.
- Stevens JD, Bonfil R, Dulvy NK, Walker PA (2000). The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 476-494.
- Sundqvist L, Keenan K, Zackrisson M, Prodöhl P, Kleinhans D (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and evolution*, 6(11), 3461-3475.
- Tallmon DA, Gregovich D, Waples R, Baker CS 2010. When are genetic methods useful for estimating contemporary abundance and detecting population trends? *Molecular Ecology Resources* 10(4):684-692.
- Thorburn J, Jones R, Neat F, Pinto C, Bendall V, Hetherington S, Jones C (2018). Spatial versus temporal structure: Implications of inter-haul variation and relatedness in the North-east Atlantic spurdog *Squalus acanthias*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(5), 1167-1180.
- Townsend R, Stow A, Asmyhr M, Momigliano P (2015). Multiple paternity in captive grey nurse sharks (*Carcharias taurus*): implications for the captive breeding of this critically endangered species. *Pacific Conservation Biology*, 21(2), 122-125.
- Vargas-Caro C, Bustamante C, Bennett MB, Ovenden JR (2017). Towards sustainable fishery management for skates in South America: The genetic population structure of *Zearaja chilensis* and *Dipturus trachyderma* (Chondrichthyes, Rajiformes) in the south-east Pacific Ocean. *PLoS One*, e0172255.
- Veríssimo A, Grubbs D, McDowell J, Musick J, Portnoy D (2011). Frequency of multiple paternity in the spiny dogfish *Squalus acanthias* in the Western North Atlantic. *Journal of Heredity*. 102, 88-93.



- Veríssimo A, Zaera-Perez D, Leslie R, Iglésias SP, Séret B, Grigoriou, P, Hernández S (2017). Molecular diversity and distribution of eastern Atlantic and Mediterranean dogfishes *Squalus* highlight taxonomic issues in the genus. *Zoologica Scripta*, 414-428.
- Veríssimo A, McDowell JR, Graves JE (2010). Global population structure of the spiny dogfish *Squalus acanthias*, a temperate shark with an antitropical distribution. *Molecular Ecology*, 19(8), 1651-1662.
- Vianna ST, de Carvalho MR & Gomes UL (2016). Taxonomy and morphology of species of the genus *Squalus* Linnaeus, 1758 from the Southwestern Atlantic Ocean (Chondrichthyes: Squaliformes: Squalidae). *Zootaxa*, 4133, 1–89.
- Waples RS (2016). Making sense of genetic estimates of effective population size.
- 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(3), 837-1037.
- Weir BS, Anderson AD, Hepler AB (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics*. 7: 771 – 780.
- White, Iglésias SP (2011). *Squalus formosus*, a new species of spurdog shark (Squaliformes: Squalidae), from the Western North Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology*, pp. 1-15.
- Wosnick N, Awruch CA, Adams KR, Gutierrez SMM, Bornatowski H, Prado AC, & Freire CA (2019). Impacts of fisheries on elasmobranch reproduction: high rates of abortion and subsequent maternal mortality in the shortnose guitarfish. *Animal Conservation*, 198-206.
- Zhang HW, Yin SW, Zhang LJ, Hou XY, Wang YY (2015). Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in *Odontobutis potamophila* from transcriptomic sequencing.

## **8. Produção bibliográfica e científica, desenvolvida durante o mestrado**

### **Premiação**

Menção honrosa ao prêmio Horácio Schneider na área de Genética Animal no 66º Congresso Brasileiro de Genética, com o trabalho intitulado “A part of the story of spiny dogfish (*Squalus*) told by molecular SNPs markers” realizado nos dias 13 à 16 de setembro de 2021.

### **Livro**

**Beatriz Rochitti Boza**, Ailton Amarante Ariza, Vanessa Paes da Cruz, Matheus Marcos Rotundo, Fausto Foresti e Claudio Oliveira. Tubarões e raias: um mergulho no

conhecimento/Beatriz Rochitti Boza. 1ª edição, Botucatu, 2021. ISBN: 978-65-89398-10-3.

### **Capítulos de livro**

**Beatriz Rochitti Boza**, Vanessa Paes da Cruz, Bruno de Campos Souza e Claudio Oliveira. As raias chicote. Capítulo do livro Encontros e Desencontros com tubarões e raias: uma história não contada por pesquisadores brasileiros/Hugo Bornatowski. 1ª edição. Pág. 69-71. Blumenau, 2021. ISBN: 978-65-00-15764-2.

Bruno de Campos Souza, **Beatriz Rochitti Boza**, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti. As raias ticonhas. Capítulo do livro Encontros e Desencontros com tubarões e raias: uma história não contada por pesquisadores brasileiros/Hugo Bornatowski. 1ª edição. Pág. 84-87. Blumenau, 2021. ISBN: 978-65-00-15764-2.

### **Artigos publicados**

Johnatas Adelir Alves, Daphne Spier, Leonardo Francisco Machado, **Beatriz Rochitti Boza**, Humberto Luiz Nadolny Gerum, Henry Louis Spach, Claudio Oliveira. *Plectorhinchus macrolepis* Boulenger, 1899 (Actinopterygii: Haemulidae) in the Western Atlantic. Publicado em Journal of Fish Biology, em agosto/2019.

### **Artigos publicados sem fator de impacto**

**Beatriz Rochitti Boza**, Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, Giovana da Silva Ribeiro, Bruno Campos Souza, Ailton Amarante Ariza, Matheus Marcos Rotundo, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira. *Hypanus guttatus* (Bloch e Schneider, 1801) foi publicado no Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia, na edição 132 – ISSN 1808-1436 de Junho/2020.

Ailton Amarante Ariza, **Beatriz Rochitti Boza**, Matheus Marcos Rotundo, Vanessa Paes da Cruz, Claudio Oliveira. *Eucinostomus argenteus* (Baird & Girard, 1855). Publicado em Boletim SBI – Sociedade Brasileira de Ictiologia, ISSN: 1808-1436, Edição nº133, em setembro/2020.

Bruno Campos Souza, Giovana da Silva Ribeiro, Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Matheus Marcos Rotundo, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti. *Rioraja agassizii* (Muller & Henle, 1841). Publicado em Boletim SBI – Sociedade Brasileira de Ictiologia, ISSN: 1808-1436, Edição nº133, em setembro/2020.

Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, Giovana da Silva Ribeiro, **Beatriz Rochitti Boza**, Bruno Campos Souza, Yghor Gloscof, Pablo Henrique de Oliveira, Matheus

Marcos Rotundo, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz, Fausto Foresti. *Aetobatus narinari* (Euphrasen, 1790). Publicado em Boletim SBI – Sociedade Brasileira de Ictiologia, ISSN: 1808-1436, Edição nº135, em março/2021.

**Beatriz Rochitti Boza**, Aisni M. C. L. Adachi, Ailton Amarante Ariza, Bruno Campos Souza, Giovana da Silva Ribeiro, Matheus Marcos Rotundo, Vanessa Paes da Cruz, Fausto Foresti e Claudio Oliveira. *Squalus albicaudus* Viana, Carvalho, Gomes, 2016. Publicado em Boletim SBI – Sociedade Brasileira de Ictiologia, ISSN: 1808-1436, Edição nº137, em setembro/2021.

**Beatriz Rochitti Boza**, Ailton Amarante Ariza, Vanessa Paes da Cruz, Fausto Foresti e Claudio Oliveira. *Potamotrygon falkneri* Castex, Maciel, 1963. Publicado em Boletim SBI – Sociedade Brasileira de Ictiologia, ISSN: 1808-1436, Edição nº138, em dezembro/2021.

#### **Artigos submetidos**

**Beatriz Rochitti Boza**, Vanessa Paes da Cruz, Gustavo Stabile, Matheus Marcos Rotundo, Fausto Foresti, Claudio Oliveira. DNA mini-barcodes revealed the foraging ecology of the largehead hairtail *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 from São Paulo, Brazil. Submetido em Neotropical Ichthyology, dezembro/2021.

#### **Resumos apresentados em eventos internacionais e nacionais**

Autoria no trabalho intitulado “A part of the story of spiny dogfish (*Squalus*) told by molecular SNP markers” no evento 66º Brazilian Congresso of Genetics, no período de 13 à 16 de setembro de 2021. Autores: **Beatriz Rochitti Boza**, Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, Giovana da Silva Ribeiro, Ailton Amarante Ariza, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Coautoría no trabalho intitulado “Amplificação do DNA mitocondrial completo de peixes de oceano profundo” no evento XVI Semana Temática de Oceanografia, no período de 30 de agosto à 03 de setembro de 2021. Autores: Mariana Kuranaka, **Beatriz Rochitti Boza**, Beatriz Ferreira Dorini, Marcelo Roberto Souto de Melo, Fausto Foresti e Claudio Oliveira.

Coautoría no trabalho intitulado “DNA mini-barcodes revealed the foraging ecology of the largehead hairtail *Trichiurus lepturus* from São Paulo, Brazil” no evento 66º Brazilian Congresso of Genetics, no período de 13 à 16 de setembro de 2021. Autores: Mariana Kuranaka, **Beatriz Rochitti Boza**, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Coautoría no trabalho intitulado “Identification of sharks of the genus *Carcharhinus* (Carcharhiniformes, Carcharhinidae) through barcode DNA” no evento 66º Brazilian

Congresso of Genetics, no período de 13 à 16 de setembro de 2021. Autores: Giovana da Silva Ribeiro, Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Ailton Amarante Ariza, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti.

Coautoria no trabalho intitulado “One for all, all for one: understanding the Squalus albicaudus shark population” no evento 66º Brazilian Congresso of Genetics, no período de 13 à 16 de setembro de 2021. Autores: Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Pollyana C. G. Roque, Marcelo Vianna, Matheus Marcos Rotundo, Giovana da Silva Ribeiro, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti.

Coautoria no trabalho intitulado “DNA metabarcoding protocol enhancement applied to extensive studies of ichthyoplankton” no evento 66º Brazilian Congresso of Genetics, no período de 13 à 16 de setembro de 2021. Autores: Gabriela Omura da Costa, André Batista Nobile, Bruno Cesar Rossini, Aline Teixeira, **Beatriz Rochitti Boza**, Fausto Foresti e Claudio Oliveira.

Autoria no trabalho intitulado “Investigando a diversidade genética do tubarão cação-bagre-espinhoso (Squalidae, Chondrichthyes) com SNPs, na costa da Argentina” no evento II ELASMulheres, no período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: **Beatriz Rochitti Boza**, Aisni Mayumi C. L. Adachi, Giovana da Silva Ribeiro, Ailton Amarante Ariza, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Autoria no trabalho intitulado “Estudo dos elementos repetitivos no genoma de raias viola brasileiras Pseudobatos (Batoidea, Rhinobatidae)” no evento II ELASMulheres, no período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: **Beatriz Rochitti Boza**, Francisco J. Ruiz Ruano, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Coautoria no trabalho intitulado “Delimitação de espécies de cação-bagre (Squalidae: Squalus) através do DNA barcode” no evento II ELASMulheres, no período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: Ailton Amarante Ariza, Aisni Mayumi C. L. Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Pollyana Christine Gomes Roque, Fábio Hissa Vieira Hazin, Marcelo Vianna, Sergio Matías Delpiani, Juan Martín Díaz de Astarloa, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Coautoria no trabalho intitulado “Identificação molecular e delimitação de espécies em raias do gênero *Hypanus* e *Dasyatis*” no evento II ELASMulheres, no período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: Mariana Kuranaka, **Beatriz Rochitti Boza**, Tathiana S. Dorini, Ailton Amarante Ariza, Matheus Marcos Rotundo, Alexandre Pires Marceniuk, Marcelo Vianna, Fausto Foresti, Vanessa Paes da Cruz e Claudio Oliveira.

Coautoria no trabalho intitulado “Identificação molecular de tubarões da família Carcharhinidae (Elasmobranchii, Carcharhiniformes)” no evento II ELASMulheres, no

período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: Giovana da Silva Ribeiro, Aisni Mayumi C. L. Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Najila C. Dantas Cerqueira, Ailton Amarante Ariza, Beatriz Ferreira Dorini, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti.

Coautoria no trabalho intitulado “Análise do status genético de espécies de tubarões martelo, gênero *Sphyrna* (Elasmobranchii, Sphyrnidae)” no evento II ELASMulheres, no período de 06 à 12 de novembro de 2021. Autores: Giovana da Silva Ribeiro, Aisni Mayumi C. L. Adachi, **Beatriz Rochitti Boza**, Najila C. Dantas Cerqueira, Ailton Amarante Ariza, Claudio Oliveira, Vanessa Paes da Cruz e Fausto Foresti.

## **9. Outras atividades acadêmicas**

### **Representação discente**

Realizado no período 11/2019 – 11/2020. Desenvolvimento de atividade de representação discente do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), participando em reuniões mensais junto ao Conselho do Programa, com estudo e resolução das questões discentes e promovendo os repasses aos alunos.

### **Organização de eventos**

Presidente da Comissão Organizadora do “XX Workshop de Genética” que, inicialmente, seria realizado no período de 3 a 5 de Abril de 2020, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, porém devido a Pandemia do novo Coronavírus, houve a necessidade de cancelar o evento.

Membro da Comissão Organizadora do XI Simpósio de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Genética, do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, realizado nos dias 5 e 6 de Novembro de 2020, de maneira remota, totalizando 12 horas.

Membro da Comissão Organizadora da 1ª edição do evento “WG week” realizado no período de 20 a 23 de Julho de 2021, de maneira remota, totalizando 40 horas.

### **Projetos de extensão**

Projeto cascudinho: Conservação da Fauna Aquática nos Riachos de Botucatu, realizado no período de 01/03/2019 à 31/12/2019, na cidade de Botucatu/SP, com as escolas EMEF Prof.<sup>a</sup> Nair Amaral e EE Manoel Patrício do Nascimento. O presente projeto foi desenvolvido na região de Botucatu-SP, onde se encontra uma vasta rede de rios e riachos com ocorrência de espécies endêmicas e visa realizar um programa de educação ambiental direcionado as jovens do ensino fundamental, visando à troca de saberes entre os alunos da UNESP e jovens das comunidades, afim de que estes conheçam melhor os recursos naturais da cidade, bem como os organismos que neles

habitam e sua relação com o ambiente. Foram desenvolvidas atividades práticas com alunos do ensino fundamental de escolas públicas em riachos do município com o intuito de que estes se aproximassem dos recursos naturais da região conhecendo os organismos que neles vivem e sua importância para as comunidades locais.