

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 26/02/2028.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Variação genética e história populacional da raia *Potamotrygon leopoldi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) endêmica da bacia do Rio Xingu, com base em marcadores genéticos moleculares

Giovana da Silva Ribeiro

Botucatu, SP

2026



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Variação genética e história populacional da raia *Potamotrygon leopoldi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) endêmica da bacia do Rio Xingu, com base em marcadores genéticos moleculares

Discente: Me. Giovana da Silva Ribeiro

Orientadora: Dra. Vanessa Paes da Cruz

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

Botucatu, SP

2026

R484v

Ribeiro, Giovana da Silva

Variação genética e história populacional da raia *Potamotrygon leopoldi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) endêmica da bacia do Rio Xingu, com base em marcadores genéticos moleculares / Giovana da Silva Ribeiro. -- Botucatu, 2026

59 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Vanessa Paes da Cruz

1. Conservação. 2. Elasmobrânquios. 3. Genética. 4. SNPs. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Variação genética e história populacional da raia *Potamotrygon leopoldi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) endêmica da bacia do Rio Xingu, com base em marcadores genéticos moleculares

AUTORA: GIOVANA DA SILVA RIBEIRO

ORIENTADORA: VANESSA PAES DA CRUZ ORIENTADOR DE MOBILIDADE: MANUEL VERA RODRÍGUEZ (Internacional)

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. VANESSA PAES DA CRUZ (Participação Presencial)
Departamento de biologia estrutural e funcional / Instituto de Biociências - UNESP Botucatu

Profa. Dra. DANIELA CRISTINA FERREIRA (Participação Presencial)
Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências - UNESP Botucatu

Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP Bauru

Pesquisador VITO ANTONIO MASTROCHIRICO FILHO (Participação Presencial)
Equipe Aquagenômica / Embrapa Pesca e Aquicultura

Botucatu, 26 de fevereiro de 2026.

Willian Gabriel Miranda

Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação

Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu

Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689

<https://www.ibb.unesp.br/#/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/ciencias-biologicas-zoologia/> - CNPJ: 48031918002259.

Dedico a todos que são resistência e mantêm-se desenvolvendo educação e ciência no Brasil.

É muito bom ser latina.

Agradecimentos

Eu continuo agradecendo à minha família, mais que especialmente à minha mãe (Simone) e à minha vó (Eugênia), que sempre me apoiaram, me deram forças e me mantiveram firme no caminho. Sem vocês ao meu lado, eu não teria concluído nem o primeiro semestre da Biologia, então dedico a vocês essa conquista.

À minha orientadora e amiga, Vanessa, pela infinita disponibilidade, por todo o tempo despendido e por todos os momentos até aqui, de aprendizados e muitos ensinamentos. Agradeço por me estimular e por ser um exemplo de como ser uma cientista.

Ao Professor Fausto, pela confiança e suporte desde o princípio, por todos os ricos ensinamentos e pelos conselhos que levarei para a vida. Muito obrigada por estar presente na minha jornada científica e por todo o carinho depositado. Seus ensinamentos sempre serão eternos. Ao professor Claudio, que se mostra paciente com todos e se faz sempre presente, agregando seu conhecimento independentemente do tamanho da nossa dúvida, o meu muito obrigada por fazer parte da minha jornada científica.

À Patricia Charvet, agradeço a colaboração e por toda dedicação. Durante esse período tivemos conversas muito enriquecedoras, as quais, com toda certeza, levarei para toda a vida.

Aos companheiros do LBGP, especialmente aos amigos que me fortaleceram, me impulsionaram e me levantaram todas as vezes que precisei, Bia B., Bia D., Gabi Omura, Helo, Lucas (Canarinho); aos meus amigos da “eterna equipe dos IC’s”, Bruno e Pablito, que esteve comigo na minha maior jornada profissional e pessoal, morar com você na Espanha foi muito massa; às minhas amigas do “Mi Jay e amigas”, Naná e Sil, que mesmo distantes seguimos unidas; à AnaJu, sempre presente e atuante; à minha amiga que ao longo dos anos se tornou minha irmã, May; e ao meu amigo da vida inteira, Ri.

Agradezo as miñas estadías en España, unha experiencia extremadamente enriquecedora, principalmente por permitirme coñecer persoas tan maravillosas. Agradezo enormemente aos profesores Manuel e Paulino, que me acolleron, puxeron á miña disposición tempo e coñecemento, e foron xenerosos durante os períodos nos que me recibiron. O meu agradecemento especial tamén para Soni e Moni, polo seu cariño, coidado e hospitalidade, que me fixeron sentir coma na casa. Agradezo tamén a Chiclana pola disposición para ensinar, pola paciencia dedicada e por todo o coñecemento compartido. Ao persoal do laboratorio Marina, Pablo Hurzos, Oscar, Amanda e Fernando, agradézolles a convivencia diaria, as risas e os xantares compartidos. Aos amigos brasileiros que ficaram para a vida, Tábata e Gabriel, obrigada por tanto.

Por fim, agradeço aos funcionários da UNESP Botucatu, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da UNESP de Botucatu, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsas de estudo (CAPES nº 88887.696130/2022-00) e mobilidade internacional (CAPES-PRINT nº 88887.899734/2023-00 e CNPq nº 201055/2025-2), que tornaram possível a realização do meu doutorado.

Resumo

A bacia do rio Xingu, um dos principais tributários do rio Amazonas, abriga elevada biodiversidade aquática, atualmente sujeita a pressões antrópicas crescentes, incluindo superexploração pesqueira e alterações hidrológicas associadas à Usina Hidrelétrica de Belo Monte. Entre as espécies afetadas destaca-se a raia endêmica *Potamotrygon leopoldi*, classificada como “Vulnerável” e incluída no Apêndice II da CITES devido à intensa exploração pelo comércio ornamental. Este estudo teve como objetivo investigar a variabilidade genética e a história demográfica de *P. leopoldi* por meio de uma abordagem integrativa, combinando marcadores mitocondriais (COI) e genômicos (SNPs). Os resultados mitocondriais indicaram diversidade haplotípica moderada ($H_d = 0,624 \pm 0,046$) e baixa diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00150 \pm 0,00015$), com rede haplotípica em padrão estrelado compatível com expansão populacional recente após possível gargalo genético. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que parcela substancial da variação genética ocorre entre populações (45,59%), indicando forte estruturação espacial entre Altamira e São Félix do Xingu, corroborada por índice de fixação elevado ($F_{ST} = 0,45588$). Após filtragem e processamento bioinformático, foi obtido um painel de 8.061 SNPs. Em contraste com os resultados mitocondriais, a análise nuclear evidenciou estabilidade da diversidade genética ao longo da escala temporal comparando amostras de 2003–2005 e 2021. Coeficientes de endogamia negativos (F_{is} médio entre $-0,0261$ e $-0,0451$) e manutenção da heterozigosidade indicam ausência de inbreeding detectável e manutenção da variabilidade nuclear, mesmo sob pressões ambientais e pesca seletiva associada a morfotipos. O índice de diferenciação temporal genômica foi baixo ($F_{ST} = 0,0017$), e análises de estrutura identificaram dois agrupamentos principais com fluxo gênico parcial, consistentes com a divergência fenotípica observada na espécie. Conclui-se que *P. leopoldi* apresenta dinâmica populacional complexa, na qual estruturação espacial e diferenciação morfológica coexistem com conectividade genética suficiente para preservar a variabilidade genômica. Esses resultados fornecem subsídios para estratégias de manejo e conservação, ressaltando a importância da manutenção da conectividade hidrológica no rio Xingu para a persistência da espécie em longo prazo.

Abstract

The Xingu River basin, one of the main tributaries of the Amazon River, harbors high aquatic biodiversity that is currently subject to increasing anthropogenic pressures, including overexploitation by fisheries and hydrological alterations associated with the Belo Monte Hydroelectric Dam. Among the affected species is the endemic freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*, classified as “Vulnerable” and listed in Appendix II of CITES due to intense exploitation for the ornamental trade. This study aimed to investigate the genetic variability and demographic history of *P. leopoldi* through an integrative approach combining mitochondrial (COI) and genomic (SNP) markers. Mitochondrial results indicated moderate haplotype diversity ($H_d = 0.624 \pm 0.046$) and low nucleotide diversity ($\pi = 0.00150 \pm 0.00015$), with a star-like haplotype network consistent with recent population expansion following a possible genetic bottleneck. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that a substantial portion of genetic variation occurs among populations (45.59%), indicating strong spatial genetic structuring between Altamira and São Félix do Xingu, supported by a high fixation index ($F_{ST} = 0.45588$). After filtering and bioinformatic processing, a panel of 8,061 SNPs was obtained. In contrast to mitochondrial findings, nuclear genomic analyses indicated stability in genetic diversity across a temporal scale comparing samples from 2003–2005 and 2021. Negative inbreeding coefficients (mean F_{is} ranging from -0.0261 to -0.0451) and maintained heterozygosity indicate no detectable inbreeding and preservation of nuclear variability despite environmental impacts and selective harvesting of specific morphotypes. Temporal genomic differentiation was low ($F_{ST} = 0.0017$), and structure analyses identified two main clusters with partial gene flow, consistent with phenotypic divergence observed in the species. We conclude that *P. leopoldi* exhibits complex population dynamics in which spatial structuring and morphological differentiation coexist with sufficient genetic connectivity to maintain genomic diversity. These findings provide support for management and conservation strategies and highlight the importance of preserving hydrological connectivity in the Xingu River to ensure long-term species persistence.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Elasmobranchii	1
1.2	Bacia do rio xingu	2
1.3	História evolutiva de raia de água doce na bacia do Rio Xingu	4
1.4	Metodologias e aspectos genéticos nos estudos de conservação	7
1.4.1	Metodologias de estudo populacional	7
1.4.2	Abordagem genética nos estudos de conservação	8
2	Objetivos	11
	Hipóteses	11
3	Material e Métodos	12
3.1	Obtenção das amostras	12
3.2	Extração de DNA, sequenciamento Sanger e análises mitocondriais	17
3.3	Desenvolvimento de SNPs	19
3.3.1	Elaboração das bibliotecas ddRAD para SNPs	19
3.4	Análises de bioinformática	20
3.4.1	Marcadores moleculares do Tipo SNPs	20
3.5	Análises genômicas	22
4	Resultados	23
4.1	Mitochondrial results	23
4.2	Genomic results	26
5	Discussion	33
	Referências	33
	Material suplementar	45

1 Introdução

1.1 Elasmobranchii

A Classe Chondrichthyes é caracterizada por peixes de esqueleto cartilagenoso, dentre os quais podem ser listados os tubarões e as raias, que fazem parte da Subclasse Elasmobranchii (Bigelow & Schroeder, 1953; Nelson, 1994; Compagno, 2005). Ao longo da sua história evolutiva, os elasmobrânquios já sobreviveram a cinco extinções em massa e são considerados um dos grupos mais antigos vivos na atualidade, com cerca de 420 milhões de anos (Cappetta, 1987; Sibert & Rubin, 2021; Gayford & Jambura, 2025). Com isso, alcançaram os mais diferentes nichos aquáticos, encontrando-se distribuídos em ambientes marinhos, estuarinos e dulcícolas (Pimiento et al., 2020; Dedman et al., 2024).

O grupo Elasmobranchii é representado atualmente por cerca de 1.261 espécies válidas, sendo descritas 565 de tubarões e 696 de raias (Pollerspöck & Straube, 2026). Este grupo apresenta aspectos biológicos únicos, sendo organismos k-estrategistas (Stevens et al., 2000) que apresentam como características gerais maturidade sexual tardia (Thorson et al., 1983), um período de gestação longo (Sheldon et al., 2018) e poucos filhotes por prole (Remya et al., 2025). Essas características implicam em maior sensibilidade desses organismos às ações antrópicas (Simões, 2020), que podem influenciar nas taxas de manutenção das espécies ao longo do tempo, uma vez que apresentam atualmente níveis de ameaça superiores aos observados em peixes marinhos e dulcícolas (Dulvy et al., 2024).

De acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), mais de um terço de todas as espécies de tubarões e raias estão globalmente ameaçadas de extinção, tornando-os o segundo grupo de vertebrados mais ameaçado da atualidade. A sobrepesca (incluindo a captura acidental) é a principal causa deste declínio, afetando 99,6% das espécies ameaçadas (Dulvy et al., 2021; IUCN, 2024). Em resposta, um relatório global recente identificou mais de 750 Áreas Importantes para Tubarões e Raias (ISRAs), fornecendo uma ferramenta científica para guiar a conservação de habitats críticos para a sobrevivência do grupo (Jabado, 2025).

Especificamente no Brasil, segundo o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias (PAN Tubarões), são indicados registros da ocorrência de 203 espécies, que habitam tanto o ambiente marinho como de água doce (Kotas et al., 2023).

Dentro da ordem Myliobatiformes, encontramos a família Potamotrygonidae é composta por duas subfamílias: Styracurinae e Potamotrygoninae. A subfamília Styracurinae inclui raias marinhas do gênero *Styracura*, com apenas duas espécies descritas (Carvalho, Loboda & da Silva, 2016; Carvalho et al., 2016a; Fontenelle et al., 2017; Pollerspöck & Straube, 2026). Enquanto a subfamília Potamotrygoninae constitui um grupo monofilético de raias totalmente adaptadas ao ambiente dulcícola neotropical, representando um evento evolutivo singular entre os elasmobrânquios (Torres et al., 2022), e é dividida em quatro gêneros, com *Paratrygon* (Duméril, 1865), que abrange três espécies (Loboda et al., 2021; Pollerspöck & Straube, 2026); os gêneros *Plesiotrygon* (Rosa, Castello & Thorson, 1987) e *Heliotrygon* (Carvalho & Lovejoy, 2011), com duas espécies cada um (Carvalho et al., 2016b; Last et al., 2016; Pollerspöck & Straube, 2026) e *Potamotrygon* (Garman, 1877), que se caracteriza como o gênero com distribuição mais ampla e mais especioso, com 33 espécies (Pollerspöck & Straube, 2026). Os membros da subfamília Potamotrygoninae são raias viventes nas águas neotropicais dos principais rios da América do Sul (Rosa, 1985). Esses peixes apresentam elevado grau de endemismo, uma vez que muitas espécies tendem a ocupar componentes de uma única bacia hidrográfica (Rosa et al., 1985; Lasso et al., 2016).

Referências

- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, 2018.
- ANG, L. P. et al. Hybrid capture resolves the phylogeny of Tetradium (Rutaceae) and supports the inclusion of a species from Sulawesi. *Journal of Systematics and Evolution*, v. 63, n. 2, p. 416-430, 2025.
- ANTONIOU, A.; MAGOULAS, A. Application of mitochondrial DNA in stock identification. In: *Stock Identification Methods*. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2014. p. 257-295.
- ARAÚJO, M. L. G. et al. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. *Information Document AC*, v. 20, n. 8, p. 1-6, 2004.
- ASHIKAGA, F. Y. et al. The endangered species *Brycon orbignyanus*: Genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, v. 98, n. 3, p. 1845-1855, 2015.

- BANDELT, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BARBOSA, S. et al. Integrative approaches to guide conservation decisions: Using genomics to define conservation units and functional corridors. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 17, p. 3452-3465, 2018.
- BEEMELMANN, A. et al. Development of SNP panels from low-coverage whole genome sequencing (lcWGS) to support indigenous fisheries for three salmonid species in Northern Canada. *Molecular Ecology Resources*, v. 25, n. 3, e14040, 2025.
- BIGELOW, H. B.; SCHROEDER, W. C. *Fishes of the Gulf of Maine*. US Government Printing Office, 1953.
- BLACK, A. N. et al. Rapid vertebrate speciation via isolation, bottlenecks, and drift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 121, n. 22, e2320040121, 2024.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BUSHNELL, B. *BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*. Berkeley: Lawrence Berkeley National Laboratory, 2014. (LBNL-7065E).
- CADRIN, S. X.; KERR, L. A.; MARIANI, S. Stock identification methods: An overview. In: CADRIN, S. X.; KERR, L. A.; MARIANI, S. (Eds.). *Stock Identification Methods*. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2014. p. 1–5.
- CAMPOS, M. et al. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 1-8, 2017.
- CAPPETTA, H. Extinctions and faunic renewals on post-Jurassic Selachians. *Mémoires de la Société Géologique de France*, v. 150, p. 113-131, 1987.
- CARVALHO, M. R. Description of two extraordinary new species of freshwater stingrays of the genus *Potamotrygon* endemic to the Rio Tapajós basin, Brazil (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), with notes on other Tapajós stingrays. *Zootaxa*, v. 4167, n. 1, p. 1-63, 2016b.
- CARVALHO, M. R.; LOBODA, T. S.; SILVA, J. P. C. B. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, Styracura, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941) (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Zootaxa*, v. 4175, n. 3, p. 201-221, 2016a.
- CATCHEN, J. M. et al. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 1, n. 1, p. 171-182, 2011.
- CHARVET, P. *Potamotrygon leopoldi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T39403A2923696. 2022. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T39403A2923696.en>.

- CHARVET, P. et al. Age and growth of the endemic Xingu River stingray *Potamotrygon leopoldi* validated using fluorescent dyes. *Journal of Fish Biology*, v. 92, n. 6, p. 1985-1999, 2018.
- CHARVET, P. et al. *Potamotrygon leopoldi*. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. 2023. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br>. DOI: <https://doi.org/10.37002/salve.ficha.9946.2>.
- CHARVET-ALMEIDA, P. História natural e conservação das raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no médio Rio Xingu, área de influência do Projeto Hidroelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil). 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, v. 35, p. 165-171, 2005.
- CHEN, H. et al. Population structure of Blue Marlin, *Makaira nigricans*, in the Pacific and Eastern Indian Oceans. *Zoological Studies*, v. 55, n. 33, p. 1-16, 2016.
- CHEVRIER, T. et al. Population structure of the swordfish, *Xiphias gladius*, across the Indian Ocean using next-generation sequencing. *ICES Journal of Marine Science*, v. 82, n. 5, fsae179, 2025.
- CHOLLETI, P.; CHITRA, K. Y. Gene sequencing study of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) in *Aedes aegypti* mosquito. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, v. 45, n. 20, p. 17-25, 2024.
- CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III. 2025. Disponível em: <https://cites.org/>.
- COMPAGNO, L. J. V. Checklist of living Chondrichthyes. In: HAMLETT, W. C. (Ed.). *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras*. [S.l.]: Science Publishers, 2005. p. 503-548.
- COWEN, R. K.; PARIS, C. B.; SRINIVASAN, A. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, v. 311, n. 5760, p. 522-527, 2006.
- DE LANES, Eder Cristian Malta et al. Unveiling the genetic mysteries of Amazonian aquatic species: exploring the catfish genome through sequencing for SNP discovery in rheophilic species. *Conservation Genetics Resources*, v. 17, n. 4, p. 265-268, 2025.
- DE PAULA silva, juliana; rodrigues, cleide; pereira, diamantino insua. Mapping and analysis of geodiversity indices in the Xingu River basin, Amazonia, Brazil. *Geoheritage*, v. 7, n. 4, p. 337-350, 2015.
- DEDMAN, S. et al. Ecological roles and importance of sharks in the Anthropocene Ocean. *Science*, v. 385, n. 6708, adl2362, 2024.
- DO, C. et al. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, v. 14, n. 1, p. 209-214, 2014.

- DRILLER, M. et al. Achieving high-quality ddRAD-like reference catalogs for non-model species: the power of overlapping paired-end reads. Preprint, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.03.024331>.
- DULVY, N. K. et al. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife*, v. 3, e00590, 2014.
- DULVY, N. K. et al. Ecological erosion and expanding extinction risk of sharks and rays. *Science*, v. 386, n. 6726, eadn1477, 2024.
- ESCODA, L. et al. Genomic analysis of geographical structure and diversity in the capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Conservation Genetics*, v. 25, n. 1, p. 277-290, 2024.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FEARNSIDE, P. M. Belo Monte: actors and arguments in the struggle over Brazil's most controversial Amazonian dam. *Die Erde - Journal of the Geographical Society of Berlin*, v. 148, n. 1, p. 14-26, 2017.
- FITZGERALD, D. B. et al. Diversity and community structure of rapids-dwelling fishes of the Xingu River: Implications for conservation amid large-scale hydroelectric development. *Biological Conservation*, v. 222, p. 104-112, 2018.
- FONTENELLE, J. P. et al. Angular cartilage structure and variation in Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with comments on their function and evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 183, n. 1, p. 121-142, 2018.
- FONTENELLE, J. P. et al. Biogeography of the Neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. *Journal of Biogeography*, v. 48, n. 6, p. 1406-1419, 2021.
- FRANKHAM, R.; BRADSHAW, C. J. A.; BROOK, B. W. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, v. 170, p. 56-63, 2014.
- GANDOMKAR, H. et al. Characterization of novel genotyping-by-sequencing (GBS)-based simple sequence repeats (SSRs) and their application for population genomics of *Capoeta aculeata* (Valenciennes, 1844). *Molecular Biology Reports*, v. 48, n. 9, p. 6471-6480, 2021.
- GAYFORD, J. H.; JAMBURA, P. L. Drivers of diversification in sharks and rays (Chondrichthyes: Elasmobranchii). *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 12, 2025.

GRETGRIX, L. J. et al. Genetic diversity of a short-ranged endemic terrestrial snail. *Ecology and Evolution*, v. 13, n. 11, e10785, 2023.

GÜLMEZ, M.; KORKMAZ, E. M.; BUDAK, M. Determination of the species boundaries of genus *Dolerus* (Hymenoptera: Tenthredinidae) using the COI gene. *Scientific Reports-A*, p. 23-35, 2023.

HAUSDORF, B. A holistic perspective on species conservation. *Biological Conservation*, v. 264, 109375, 2021.

HELLBERG, M. E. Gene flow and isolation among populations of marine animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 40, p. 291-310, 2009.

HERCOS, Alexandre Pucci et al. Checklist of the ichthyofauna of Mamirauá Sustainable Development Reserve, Middle Solimões, Amazonas, Brazil: high richness in a large protected area of Western-Central Amazonia. *Biota Neotropica*, v. 21, p. e20211207, 2021.

HOARAU, G. et al. Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 272, n. 1562, p. 497-503, 2005.

HRBEK, T. et al. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon Basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, v. 8, p. 297-308, 2005.

IUCN. The global status of sharks, rays and chimaeras. Gland, Switzerland: IUCN, 2024. DOI: 10.59216/ssg.gsrsrc.2024.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBio. PAN Tubarões: Primeiro Ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção. 2013. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/destaques-eeventos/195-pan-tubaroes.html>.

JABADO, R. et al. Ocean Travellers: A Global Assessment of Important Shark and Ray Areas. Gland, Switzerland: IUCN SSC Shark Specialist Group, 2025.

JENNINGS, W. B. et al. Barcoding the Neotropical freshwater fish fauna using a new pair of universal COI primers with a discussion of primer dimers and M13 primer tails. *Genome*, v. 62, n. 2, p. 77-83, 2019.

JIANG, S. et al. Analysis of genetic diversity and structure of eight populations of *Nerita yoldii* along the coast of China based on mitochondrial COI gene. *Animals*, v. 14, n. 5, p. 718, 2024.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2008.

JOMBART, T.; AHMED, I. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genomewide SNP data. *Bioinformatics*, v. 27, n. 21, p. 3070-3071, 2011.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.

JÖNSSON, J.; MÅRALD, E.; LUNDMARK, T. The shifting society syndrome: Values, baselines, and Swedish forest conservation in the 1930s and 2010s. *Conservation Science and Practice*, v. 3, n. 10, e506, 2021.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KEENAN, K. et al. Diversity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 4, n. 8, p. 782-788, 2013.

KEEPING, J. et al. Trends in sightings of the stingrays of southern Mozambique. *Marine and Freshwater Research*, v. 72, n. 12, p. 1824-1837, 2021.

KOPELMAN, N. M. et al. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, n. 6, p. 1179-1191, 2015.

KOTAS, J. E. et al. PAN Tubarões: Primeiro Ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção. Brasília (DF): ICMBio/CEPSUL, 2023.

KRAFT, F.; KURTH, I. Long-read sequencing to understand genome biology and cell function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 126, 105799, 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, v. 34, n. 2, p. 111-119, 2005.

LANDÍNEZ-GARCÍA, R. M.; MÁRQUEZ, E. J. Population genetics of the fish *Brycon henni* (Characiformes: Bryconidae) using species-specific polymorphic microsatellite loci. *Revista de Biología Tropical*, v. 68, n. 3, p. 847-861, 2020.

LAST, P. et al. (Eds.). *Rays of the World*. [S.l.]: CSIRO Publishing, 2016.

LI, Y.-L.; LIU, J.-X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, v. 18, n. 1, p. 176-177, 2018.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LINN, A. K. et al. Assessment of multiple paternity in spinner shark (*Carcharhinus brevipinna*) litters from eastern Australian waters. *Marine and Freshwater Research*, v. 76, n. 11, e. 2025.

LOBODA, T. S. et al. Two new species of freshwater stingrays of the genus *Paratrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Orinoco basin, with comments on the taxonomy of *Paratrygon aiereba*. *Neotropical Ichthyology*, v. 19, 2021.

LOUREIRO, L. O.; ENGSTROM, M. D.; LIM, B. K. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) provide unprecedented resolution of species boundaries, phylogenetic relationships, and genetic diversity in the mastiff bats (*Molossus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 143, 106690, 2020.

LUTZ-CARRILLO, D. J. et al. Hybridization and genetic structure in phenotypic spotted bass in Texas. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 147, n. 5, p. 891-905, 2018.

MAGALHÃES, K. X. et al. Phylogeography of *Baryancistrus xanthellus* (Siluriformes: Loricariidae), a rheophilic catfish endemic to the Xingu River basin in eastern Amazonia. *PLOS ONE*, v. 16, n. 8, e0256677, 2021.

MARTÍNEZ, José Gregorio et al. SNPs markers for the heavily overfished tambaqui *Colossoma macropomum*, a Neotropical fish, using next-generation sequencing-based de novo genotyping. *Conservation Genetics Resources*, v. 9, n. 1, p. 29-33, 2017.

NELSON, J. S. *Fishes of the World*. 3. ed. [S.l.]: Wiley, 1994.

NICOL, S. et al. A general optimal adaptive framework for managing a threatened species. *Ecological Solutions and Evidence*, v. 3, n. 4, e12186, 2022.

OTHMAN, Nursyuhada et al. A review on next-generation wildlife monitoring using environmental DNA (eDNA) detection and next-generation sequencing in Malaysia. *Sains Malaysiana*, v. 52, n. 1, p. 17-33, 2023.

PEMBLETON, L. W.; CABLE, K. O.; VOLK, R. J. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Molecular Ecology Resources*, v. 13, n. 5, p. 946-952, 2013.

PÉREZ-PEREIRA, N. et al. Prediction of the minimum effective size of a population viable in the long term. *Biodiversity and Conservation*, v. 31, n. 11, p. 2763-2780, 2022.

PETERSON, B. K. et al. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e37135, 2012.

PIMIENITO, C. et al. Functional diversity of marine megafauna in the Anthropocene. *Science Advances*, v. 6, n. 16, eaay7650, 2020.

POLLERSPÖCK, J.; STRAUBE, N. Bibliography database of living/fossil sharks, rays and chimaeras (Chondrichthyes: Elasmobranchii, Holocephali) - List of Valid Extant

- Species; List of Described Extant Species; Statistic. 2026. Disponível em: www.shark-references.com. (World Wide Web electronic publication, Version 01/2026; ISSN: 2195-6499).
- PORTNOY, D. S. et al. Effective size closely tracks census size in a heavily exploited shark species. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 15, p. 381–391, 2015.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.
- REEVES, I. M. et al. Admixture increases genetic diversity and adaptive potential in Australasian killer whales. *Molecular Ecology*, e17689, 2025.
- REISS, H. et al. Genetic population structure of marine fish: Mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, v. 10, n. 4, p. 361-395, 2009.
- REMYA, L. et al. Incidence of pregnant endangered devil rays (Elasmobranchii: Mobulidae) from the Gulf of Mannar and Palk Bay, southeast coast of India. *Current Science*, v. 129, n. 4, p. 362-369, 2025.
- ROCHETTE, N. C.; RIVERA-COLÓN, A. G.; CATCHEN, J. M. Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, v. 28, n. 21, p. 4737-4754, 2019.
- ROSA, R. D. S. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) (Batoidei, Myliobatiformes): phylogeny, biogeography. 1985. Tese (Doutorado) - The College of William and Mary, Williamsburg, 1985.
- ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n.
- ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.
- SALE, P. F. et al. Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, n. 2, p. 74-80, 2005.
- SANCHES, D. et al. Mitochondrial DNA suggests hybridization in freshwater stingrays Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) from the Xingu River, Amazonia and reveals speciation in Paratrygon aireba. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, 2021.

- SEIJO, J. C.; PÉREZ, E. P.; CADDY, J. F. A simple approach for dealing with dynamics and uncertainty in fisheries with heterogeneous resource and effort distribution. *Marine and Freshwater Research*, v. 55, n. 3, p. 249-256, 2004.
- SHELDON, J. D. et al. Reproductive hormone patterns in male and female cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in an aquarium setting and correlation to ultrasonographic staging. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 49, n. 3, p. 638-647, 2018.
- SIBERT, E. C.; RUBIN, L. D. An early Miocene extinction in pelagic sharks. *Science*, v. 372, n. 6546, p. 1105-1107, 2021.
- SILVA, T. J. et al. Genetic variability and population structure of *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) in the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 23, n. 2, e240085, 2025.
- SOARES, O. D. S. R.; RODRIGUES, B. L.; SHIMABUKURO, P. H. F. Accessing the sand fly diversity of Tocantins, Northern Brazil: species delimitation using COI DNA barcoding. *Biota Neotropica*, v. 24, n. 4, e20241680, 2024.
- SOLTAN-ALINEJAD, P. et al. Molecular analysis of the mitochondrial markers COI, 12S rDNA and 16S rDNA for six species of Iranian scorpions. *BMC Research Notes*, v. 14, n. 1, p. 40, 2021.
- STEVENS, J. D. et al. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, v. 57, n. 3, p. 476-494, 2000.
- SUNDQVIST, L. et al. Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, v. 6, n. 11, p. 3461-3475, 2016.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 15, n. 5, p. 199-203, 1998.
- SUPPLE, M. A.; SHAPIRO, B. Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biology*, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2018.
- THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 9, n. 1, p. 3-24, 1983.
- TIMM, V. F. et al. The efficiency of the COI gene as a DNA barcode and an overview of Orthoptera (Caelifera and Ensifera) sequences in the BOLD System. *Canadian Journal of Zoology*, v. 100, n. 11, p. 710-718, 2022.
- TOEWS, D. P. L.; BRELSFORD, A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 16, p. 3907-3930, 2012.
- TORATI, L. S. et al. Genetic diversity and population structure of *Arapaima gigas* in the Amazon. *Genetics and Molecular Research*, v. 18, n. 2, gmr18234, 2019.
- TORRES, Y. et al. Evidence of multiple paternity for the endemic Xingu River stingray. *Journal of Fish Biology*, v. 100, n. 6, p. 1503-1512, 2022.

TORRES, Y. et al. Dots in the dark: dorsal polychromatism in the endemic Xingu Freshwater Stingray. *Journal of Zoology*, v. 321, n. 2, p. 106-116, 2023.

TORRES-ROMERO, E. J.; PÉREZ JIMÉNEZ, J. C. Extinction risk of the world's chondrichthyan fishes: a global assessment of the interplay between anthropogenic factors and marine protected areas. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 34, n. 2, p. 685-701, 2024.

UTSUNOMIYA, R. et al. Dewatering the Xingu River: hydrological alterations and biocultural connections among the Arara Indigenous People in the Volta Grande region, Brazilian Amazon. *Regional Environmental Change*, v. 24, n. 2, p. 85, 2024.

WALDMAN, J. R. The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research*, v. 43, n. 1-3, p. 237-246, 1999.

WAPLES, R. S. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium*, v. 17, p. 8-27, 1995.

WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, v. 89, n. 5, p. 438-450, 1998.

WAPLES, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked loci. *Conservation Genetics*, v. 7, n. 2, p. 167-184, 2006.

WAPLES, R. S. The idiot's guide to effective population size. *Molecular Ecology*, e17670, 2025.

WAPLES, R. S.; DO, C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.

WEI, H. et al. Comparison of genetic diversity and population structure of four *Pseudaspisus leptocephalus* populations in Heilongjiang River Basin based on mitochondrial COI gene. *Frontiers in Marine Science*, v. 10, 1158845, 2023.

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag, 2016.

WORM, B. et al. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, v. 314, n. 5800, p. 787-790, 2006.

Zhou, J., Liu, A., He, F., Zhang, Y., Shen, L., Yu, J., & Zhang, X. (2023). Draft genome of white-blotched river stingray provides novel clues for niche adaptation and skeleton formation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 21(3), 501-514.