



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

RAONY CÉSAR SILVA BELÉM

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE ARRAIA CURURU
(*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), UMA ESPÉCIE DE IGARAPÉ

MANAUS - AM

2020

RAONY CÉSAR SILVA BELÉM

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE ARRAIA CURURU
(*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), UMA ESPÉCIE DE IGARAPÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos - CPET, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração: Uso sustentável de recursos aquáticos.

Orientador: Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

MANAUS - AM

2020

RAONY CESAR BELÉM

Diversidade morfológica e genética de arraia Cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2006), uma espécie de igarapé

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

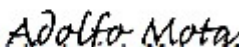
Aprovado em 19 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

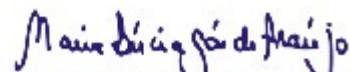


Wallice L. Paxiúba Duncan
Universidade Federal do Amazonas

Doutor Wallice Luiz Paxiúba Duncan - Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Doutor Adolfo José da Mota - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Doutora Maria Lúcia Góes de Araújo - Membro
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Belém, Raony César Silva
B454d Diversidade morfológica e genética de arraia Cururu
(*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), uma
espécie de igarapé / Raony César Silva Belém . 2020
54 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wallice Luiz Paxiúba Duncan
Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Estrutura populacional. 2. Arraia de água doce. 3. Igarapés. 4.
Morfometria geométrica. 5. SNPs. I. Duncan, Wallice Luiz Paxiúba.
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Evandro Belém e Mirlanda Silva, aos meus irmãos Kauai Belém e Isabela Belém, à minha avó Zeneide Silva e à minha querida Andressa Chagas

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan pela orientação, suporte e amizade ao longo do trabalho;

À Dra. Izeni Pires Farias pela colaboração e valiosíssimas contribuições nessa produção;

Ao Dr. Tomas Hrbck pelo suporte técnico laboratorial desse trabalho;

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão pela ausência nas datas festivas;

À UFAM pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação;

Às coordenadoras do Programa de Pós-graduação, professoras Flávia Siqueira Souza e Sanny Maria Andrade Porto do programa Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (CARP) pela constante busca de melhorias no curso;

Aos Professores do Curso Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (CARP) que através dos seus ensinamentos pude aprimorar os meus conhecimentos e hoje concluir esse ciclo;

Às minhas companheiras de laboratório Maria Glaucinei e Rebeca Fontenele pelo companheirismo e suporte técnico;

Aos colegas de turma em especial ao Otavio Matos, Marcos Mereles e Diego Valente pelo apoio e companheirismo ao longo desses dois anos de jornada;

À Dra. Valéria Machado pelo suporte técnico durante a extração do DNA;

Ao Msc Fabrício Bertuol pelo suporte técnico durante a construção da biblioteca genômica;

Ao Msc. Gerson Lopes pelas contribuições do texto;

Ao Dr. Fábio Muniz pelas contribuições com as análises estatísticas da genética;

À Msc. Hallana da Silva pelo suporte técnico em alguns procedimentos laboratoriais;

À Dra. Akemi Shibuya pelas contribuições do texto;

À Dra. Eliana Feldberg pelas valiosas contribuições sobre aspectos genéticos da espécie investigada nesse estudo;

Aos pescadores de Barcelos Francisco Freitas e João Freitas pelo suporte logístico na coleta das arraias no médio rio Negro;

Ao Sr. Francisco Roberto Rodrigues pelo suporte logístico nas amostragens na região do Tupé no baixo rio Negro;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado;

À Deus, por me permitir estar aqui concluindo essa etapa.

AGRADEÇO

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”

Dalai Lama

RESUMO GERAL

A arraia cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) é um elasmobrânquio de água doce endêmico da bacia do rio Negro, cuja distribuição atualmente conhecida abrange as imediações do arquipélago de Mariuá (médio rio Negro) e a região do baixo curso deste rio nas imediações de Manaus, sendo restrita às planícies inundáveis como igapós e igarapés em ambas as margens do rio Negro. Este comportamento sedentário pode contribuir para a ocorrência de estruturação morfológica e genética intraespecífica. Por essa razão, nesse estudo investigamos as diferenças na forma das cartilagens, escapular e sinarcual cérvico-torácica, e a estrutura genética da arraia cururu ao longo do curso do rio Negro, utilizando morfometria geométrica e polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs). Encontramos diferenças significativas nas estruturas analisadas entre localidades, margens e áreas do rio (meio e baixo rio Negro), entretanto, essas variações não estão associadas ao isolamento por distância, mas ao tipo de substrato dos igapós que podem ser argilo-arenosos ou com trocos e galhos submersos. As análises genômicas sugerem que a espécie é hierarquicamente estruturada, com uma diferença genética maior entre o médio e o baixo rio Negro possivelmente em função de isolamento por distância, e uma subestrutura entre localidades do médio rio Negro causada pelo isolamento parcial entre margens. Desse modo, os diferentes padrões de variações intraespecíficas da arraia cururu observados nesse estudo ocorrem em função de diferentes pressões ambientais.

Palavras-chave: Estrutura populacional, arraia de água doce, igarapés, morfometria geométrica, SNPs.

ABSTRACT

Cururu stingray is a freshwater elasmobranch endemic to the Negro River basin, whose distribution is currently known to encompass the vicinity of the Mariuá archipelago and the region of the lower course of the Negro river near Manaus, being restricted to floodplains such as igapós and igarapés both sides of the Negro River. This sedentary behavior can contribute to the occurrence of significant intraspecific morphological and genetic variations. For this reason, in this study we investigated the differences in the shape of the cartilage, scapular and cervical-thoracic synarcual, and the genetic structure of the cururu stingray along the course of the Negro River, using geometric morphometry and nucleotide polymorphism (SNPs). We found significant differences in the analyzed structures between locations, banks and areas of the river (middle and lower Negro river), however, these variations are not related to distance isolation, but seem to be associated with the type of substrate of igapós that can be sandy-clay or with change and submerged branches. Genomic analysis suggests that the species is hierarchically structured, with a greater genetic difference between the middle and lower Rio Negro possibly due to distance isolation, and a substructure between locations in the middle Rio Negro caused by partial isolation between banks. Thus, the different patterns of intraspecific variations of the cururu stingray observed in this study occur due to different environmental pressures.

Key words: Population structure, freshwater stingray, streams, geometric morphometry, SNPs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa da área de estudo. Os círculos indicam os locais de coleta no médio e baixo rio Negro..... 24
- Figura 2:** Representação dos marcos anatômicos digitalizados no TpsDig. Em (a) Exemplar macho de *P. wallacei* com indicação da região corporal onde se encontram as estruturas esqueléticas analisadas. Em (b) coordenadas inseridas na cartilagem escapular e em (c) coordenadas inseridas na cartilagem sinarcual cervicotorácica..... 26
- Figura 3:** Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre sexos. (a) O histograma da função discriminante mostra que não houve diferença na forma da cartilagem escapular entre os sexos. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. (b) O wireframe corrobora ausência de variação na forma. Em (c) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem escapular. 31
- Figura 4:** Variação de forma da cartilagem sinarcual cervicotorácica de *P. wallacei* entre sexos. (a) o histograma da função discriminante mostra que não houve diferença na forma dessa estrutura entre os sexos. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. (b) o wireframe corrobora ausência de variação na forma. Em (c) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem sinarcual..... 32
- Figura 5:** Diagrama de dispersão da análise de variáveis canônicas (CVA). Em (a) é ilustrada a separação entre grupos com base nas variações de forma da cartilagem escapular. E em (b) observa-se a separação de grupos a partir da morfologia da cartilagem sinarcual..... 33
- Figura 6:** Histograma representando as coordenadas anatômicas no eixo 1 da análise de variáveis canônicas (CVA). Em (a) cartilagem escapular e (b) cartilagem sinarcual..... 34
- Figura 7:** Variação de forma da cartilagem escapular entre localidades. (a) Comparações par a par demonstram a variação de formas médias significativas ($P < 0,05$) da cartilagem escapular entre os indivíduos coletados em diferentes localidades. Sobre cada representação de forma estão indicados os locais comparados, a distâncias de Procrustes (PD) e os respectivos valores de *P* do teste de Monte Carlo. Em (b) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem escapular. E em (c) uma representação das coordenadas anatômicas analisadas. 35
- Figura 8:** Variação de forma entre locais. O Wireframe representando as variações de forma média da cartilagem sinarcual entre pares de localidades. Sobre cada representação de forma estão indicados os locais comparados, a distâncias de Procrustes (PD) e os respectivos valores de *P* do teste de Monte Carlo..... 36
- Figura 9:** Análise de agrupamento entre as localidades. Dendograma da análise de agrupamento utilizando a distância de Procrustes das cartilagens, escapular e sinarcual respectivamente (a) e (b) com o Tupé, e (c) e (d) sem o Tupé. 37
- Figura 10:** Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre as margens do rio. Em (a) o histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos, porém com sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P*

para o teste de Monte Carlo. Em (b) o wireframe representa diferenças da forma dos grupos das margens. E em (c) representação anatômica da cartilagem escapular..... 38

Figura 11: Variação de forma da cartilagem sinarcual de *P. wallacei* entre as margens do rio. a) O histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos com pouca sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. b) O wireframe representa a forma média dos grupos. c) Representação anatômica da cartilagem sinarcual por meio de dissecação. 39

Figura 12: Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre médio e baixo rio Negro. Em (a) O histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos, com pouca sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidade de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. Em (b) O wireframe representa a forma média de cada grupo. E em (c) é ilustrada uma peça anatômica da cartilagem escapular dissecada. 40

Figura 13: Variação de forma da cartilagem sinarcual de *P. wallacei* entre médio e baixo rio Negro. Em (a) o histograma da função discriminante mostra grande separação entre os grupos sem sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidade de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. Em (b) o wireframe representa diferenças da forma dos grupos. E em (c) está representada anatomicamente a cartilagem sinarcual. 41

Figura 14: Estrutura populacional determinada no programa STRUCTURE mediante inferência Bayesiana. Foram analisados 2089 loci com um SNP cada de 23 indivíduos de cinco localidades do médio e do baixo rio Negro. Em (a) o gráfico do método de Evanno e o histograma de mistura ilustram os possíveis grupos com o Tupé. Em (b) é demonstrada a estruturação populacional sem o Tupé..... 43

Figura 15: Dendograma das estruturas genéticas. Em (a) é demonstrada uma estruturação com o Tupé apresentando-se como grupo externo ao médio rio Negro. E em (b) estrutura das localidades entre margens do médio rio Negro..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de amostras por locais na morfometria geométrica e na análise genômica.....	25
Tabela 2: Identificação das coordenadas anatômicas e estruturas correspondentes.....	27
Tabela 3: Número de indivíduos por grupos comparáveis. Valores médios \pm desvio padrão (DP), mínimo (Min) e máximo (Max) de largura de disco (LD) e comprimento de disco (CD).....	30
Tabela 4: Índices de diversidade genética estimados no Arlequin.....	42
Tabela 5: Número de migrantes entre populações	42
Tabela 6: Valores de Fst entre pares de localidades.....	43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO I.....	20
Diversidade morfológica e genética de arraia Cururu (<i>Potamotrygon wallacei</i> Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), uma espécie de igarapé	20
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
Morfometria geométrica.....	25
Análise de DNA genômico	28
RESULTADOS.....	30
Variações morfológicas da espécie	30
Diversidade genética da arraia Cururu	42
DISCUSSÃO.....	44
Variabilidade intraespecífica de arraia Cururu.....	45
CONCLUSÃO	48
CONSIDERAÇÕES.....	48
AGRADECIMENTOS.....	48
REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO GERAL

A variabilidade intraespecífica é uma questão chave para a biologia, pois se trata de um importante fator para manutenção de espécies frente às adversidades, e são os parâmetros básicos para modelar a dinâmica populacional (HARTL e CLAK, 1997). Essa variabilidade pode ser compreendida pelas variações fenotípicas em função da genética. Os padrões de diversidade são resultados da evolução dos organismos, seja por plasticidade fenotípica, fluxo gênico e em muitos casos isolamento por distância ou colonização de habitat (BLANCK e LAMOUREUX, 2007; HUGHES et al., 2008; BECKS et al., 2010).

Diferentes estratégias de vida de uma espécie podem favorecer o polimorfismo como resposta ao ambiente (SCHLUTER, 1993). Vários fatores podem ser responsáveis pelos padrões de variabilidade morfológica e genética de uma espécie, como aspectos de desenvolvimento, fisiologia ou história de vida que, em geral, estão relacionados a pressões ambientais (STEARNS, 1976; CIANCIARUSO et al., 2009).

Na Amazônia, essas pressões costumam ser intimamente relacionadas ao mosaico ambiental que caracteriza as bacias (SIOLI, 1991). Essas características por sua vez são reflexos de eventos geológicos ocorridos nos primórdios de sua formação, que foram responsáveis pela significativa diversificação de vertebrados de água doce na região neotropical (LUNDBERG et al., 1998; MONTOYA-BURGOS, 2003). Um dos eventos mais importantes na diversificação da ictiofauna durante este período envolveu transgressões marinhas no continente. Essas incursões deram origem a organismos de água doce derivados de grupos marinhos, como anchovas, peixes-agulha e as arraias (LOVEJOY et al., 1998).

As arraias de água doce são exclusivas da região neotropical e pertencem à subfamília Potamotrygoninae (senso CARVALHO et al., 2016a). Este grupo é monofilético e compreende quatro gêneros *Paratrygon* Duméril, 1865; *Plesiotrygon* Rosa, Castelo e Thorson, 1987; *Heliotrygon* Carvalho e Lovejoy, 2011 e *Potamotrygon* Garman, 1877, com pelo menos 40 espécies descritas (BROOKS, 1981; ROSA, 1985; LOVEJOY, 1996; LOVEJOY et al., 1998; CARVALHO et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; ROSA et al., 2010).

A maioria desses animais é restrita a um único sistema (CARVALHO e LOVEJOY, 2011; SILVA e CARVALHO, 2011; FONTENELLE et al., 2014; CARVALHO et al., 2016b; FONTENELLE e CARVALHO, 2017). Algumas espécies *Potamotrygon motoro* Müller e Henle, 1841, *Potamotrygon orbignyi* Castelnau 1855 e *Paratrygon aiereba* Müller e Henle, 1841 têm ampla distribuição e são encontradas em mais de uma bacia hidrológica e diferentes

tipos de água, com estruturação genética nesses complexos fluviais (FREDERICO et al., 2012; RENZA-MILLÁN et al., 2019). A diversificação de características desses animais entre bacias é relativamente bem conhecida (SILVA e CARVALHO, 2015; FONTENELLE e CARVALHO, 2017; SILVA e LOBODA, 2019), entretanto, o comportamento da diversidade intraespecífica de espécies endêmicas dentro dessas bacias ainda não foi investigado.

Os cenários internos desses sistemas são bastante heterogêneos (SIOLI, H, 1984; 1991). A bacia do rio Negro, por exemplo, é resultado de uma série de eventos orogênicos, que podem ter causado capturas fluviais e deposição de sedimentos originando uma complexa gama de ambientes como os arquipélagos de Mariuá e Anavilhanas que caracterizam terrenos alagáveis em meio aos canais anabranching (trecho do rio que se divide em vários canais) (LATRUBESSE e FRANZINELLI, 2005; LATRUBESSE e STEVAUX, 2015). Além disso, também apresenta áreas de planícies em sua região periférica caracterizadas por sub-bosques inundados (igapós) e pequenos cursos d'água como os igarapés (SIOLI, 1991; DUNCAN e FERNANDES, 2010), que constituem o habitat de espécies endêmicas como *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016.

Essa espécie apresenta características de vida *k* estrategista (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005), ou seja, vive em um habitat constante e previsivelmente estacionário no tempo (PIANKA, 1970), comum em Elasmobranchii (FRISK, 2010; DULVY et al., 2014; LIGHTEN et al., 2016). Sua distribuição abrange pequenos sistemas hídricos nas planícies inundáveis do rio Negro (CARVALHO et al., 2016b; OLIVEIRA, 2008). Esses fatores associados podem contribuir para diferentes padrões de estruturas populacionais em organismos aquáticos (ANDRES et al., 2019).

Para compreender a estrutura de populações destes animais, abordagens integrativas entre morfologia e genética têm sido amplamente utilizadas (WESTHAFER, 2015; BERNATCHEZ et al., 2016). Avaliações morfológicas geralmente são feitas a partir morfometria linear (biometria tradicional) (CARVALHO et al., 2003; 2004) ou morfometria geométrica (baseada em marcos de referências anatômicas), este último mais informativo e preciso pela capacidade de descrever os pontos exatos de diferenciação e intensidade das variações (BOOKSTEIN, 1984; MONTEIRO e REIS, 1999)

Quanto à estrutura genética, índices como heterozigosidade esperada (proporção de genótipos heterozigotos esperados sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg) e heterozigosidade observada (média das proporções observadas de heterozigotos) podem ser estimados para compreender a diversidade genética das populações (NEI, 1973), enquanto

as estatísticas F ou índices de fixação (Fit , Fis , Fst) descrevem o nível estatisticamente esperado de heterozigosidade em uma população, podem ser compreendidos como uma medida da correlação entre genes em diferentes níveis de uma população subdividida hierarquicamente. Por exemplo: Fit é o coeficiente de endogamia de um indivíduo em relação à população total; Fis compreende o coeficiente de endogamia de um indivíduo em relação à subpopulação; e o Fst é o efeito das subpopulações em comparação com a população total (WRIGHT, 1950).

Estruturação populacional em espécies especialistas de distribuição restrita, associada à degradação de habitat pode predispor à maior risco de extinção (MUNDAY, 2004; ANRES et al., 2019), sobretudo em grupos com potencial pesqueiro como a arraia Cururu que já foi intensamente explorada pela pesca para aquariofilia (ARAÚJO et al., 2004; DUNCAN et al., 2010). Por essas razões, esse trabalho investiga os padrões de diversidade intraespecífica de *Potamotrygon wallacei*.

REFERÊNCIAS

- ANDRES, K.; CHIEN, H.; KNOUFT, J. H. **Hydrology induces intraspecific variation in freshwater fish morphology under contemporary and future climate scenarios**. Science of The Total Environment, v. 671, p. 421–430, 2019.
- ARAÚJO, M. L. G., CHARVET-ALMEIDA, P., ALMEIDA, M. P., E PEREIRA, H. **Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges**. Information document AC, v. 20, p. 1–6, 2004.
- BECKS L.; ELLNER S. P.; JONES L. E.; HAIRSTON N. G. **Reduction of adaptive genetic diversity radically alters eco-evolutionary community dynamics**. Ecology letters, v. 13, n. 8, p. 989–997, 2010.
- BERNATCHEZ, S. et al. **Investigating genomic and phenotypic parallelism between piscivorous and planktivorous lake trout (*Salvelinus namaycush*) ecotypes by means of RAD seq and morphometrics analyses**. Molecular Ecology, v. 25, n. 19, p. 4773–4792, 2016.
- BLANCK, A.; LAMOUREUX, N. **Large-scale intraspecific variation in life-history traits of European freshwater fish**. Journal of Biogeography, v. 34, n. 5, p. 862–875, 2007.
- BOOKSTEIN, Fred L. **A statistical method for biological shape comparisons**. Journal of Theoretical Biology, v. 107, n. 3, p. 475–520, 1984.
- BROOKS, D. R. **Fresh-water stingrays (Potamotrygonidae) and their helminth parasites: testing hypothesis of evolution and coevolution**. Advances in cladistics, 1981.

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, 2016.

CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R S. **Family Potamotrygonidae (river stingrays).** Check list of the freshwater fishes of South and Central America, p. 22–28, 2003.

CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R. **Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin.** *Zootaxa*, v. 48, p. 5326, 2011.

CARVALHO, M. R.; MAISEY, J. G.; GRANDE, L. **Freshwater stingrays of the Green River Formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes).** *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 2004, n. 284, p. 1–136, 2004.

CARVALHO, M. R.; RAGNO, M. P. **An unusual, dwarf new species of neotropical freshwater stingray, Plesiotrygon nana sp. nov., from the upper and mid amazon basin: the second species of Plesiotrygon (chondrichthyes: potAmotrygonidae) marcelo.** *Papeis Avulsos de Zoologia*, v. 51, n. 7, p. 101–138, 2011.

CARVALHO, M. R. D.; ROSA, R.; ARAÚJO, M. L. G. **A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon.** *Zootaxa*, v. 4107, n. 4, p. 566–586, 2016.

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.

CIANCIARUSO, M. V. ; SILVA, I. A.; BATALHA, M. A. **Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a Ecologia de comunidades.** *Biota Neotropica*, v. 9, n. 3, p. 93–103, 2009.

DULVY, N.K.; PARDO, S. A.; SIMPFENDORFER, C. A.; CARLSON, J. K. **Diagnosing the dangerous demography of manta rays using life history theory.** *PeerJ*, v. 2, p. e400, 2014.

DUNCAN, W. L. P.; FERNANDES, M. N. **Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae).** *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 5, n. 3, p. 454–464, 2010.

DUNCAN, W. L. P.; INOMATA, S. O.; FERNANDES, M. Narciso. **Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil.** *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 5, n. 2, p. XIII–XXII, 2010.

FONTENELLE, J. P.; CARVALHO, M.R. **Systematic revision of the Potamotrygon scobina Garman, 1913 species-complex (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with the description of three new freshwater stingray species from Brazil and comments on their distribution and biogeography.** *Zootaxa*, v. 4310, n. 1, p. 1,

2017.

FONTENELLE, J. P.; SILVA, J. P.; CARVALHO, M. R. **Potamotrygon limai, sp. nov., a new species of freshwater stingray from the upper Madeira River system, Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. *Zootaxa*, v. 3765, n. 3, p. 249–268, 2014.

FREDERICO, R. G et al. **Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 1, p. 71–80, 2012.

FRISK, M. G. Life history strategies of batoids. *Sharks and their Relatives. II. Biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, Florida., 2010. p. 283–318.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 4. ed. Sunderland: Sinauer associates, MA, 1997.

HUGHES, A. et al. **Ecological consequences of genetic diversity**. *Ecology Letters*, v. 11, n. 6, p. 609–623, Jun 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>>.

LATRUBESSE, E. M; FRANZINELLI, E. **The late Quaternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: implications for island and floodplain formation in large anabranching tropical systems**. *Geomorphology*, v. 70, n. 3–4, p. 372–397, 2005.

LATRUBESSE, E. M; STEVAUX, J. Cândido. **The anavilhanas and mariuá archipelagos: fluvial wonders from the Negro River, Amazon Basin**. *Landscapes and Landforms of Brazil*, p. 157–169, 2015.

LIGHTEN, J. et al. **Adaptive phenotypic response to climate enabled by epigenetics in a K-strategy species, the fish *Leucoraja ocellata* (Rajidae)**. *Royal Society Open Science*, v. 3, n. 10, p. 160299, 2016.

LOBODA, T. S. **Revisão taxonômica e morfológica de *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) na bacia Amazônica (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)**. 2014. 1–323 f. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia., 2014.

LOVEJOY, N. R. **Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes)**. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 117, n. 3, p. 207–257, 1996.

LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. **Marine incursion into South America**. *Nature*, v. 396, n. 6710, p. 421–422, 1998.

LUNDBERG, J. Get al. **The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers**. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, v. 27, p. 13–48, 1998.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Holos, 1999.

MONTOYA-BURGOS, J. I. **Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus***

(Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, v. 12, n. 7, p. 1855–1867, 2003.

MUNDAY, P. L. **Habitat loss, resource specialization, and extinction on coral reefs.** *Global Change Biology*, v. 10, n. 10, p. 1642–1647, 2004.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

OLIVEIRA, A T. **Caracterização hematológica de *Potamotrygon cf. histrix*: subsídios ao manejo e conservação da espécie.** 2008. Tese (Doutorado em Diversidade biológica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

PIANKA, E. R. **On r-and K-selection.** *The american naturalist*, v. 104, n. 940, p. 592–597, 1970.

QUIJADA, C. C. Diban; CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R. S. *Biology of the South American potamotrygonid stingrays.* CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. *Sharks and their relatives II.* Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 249–289.

RENZA-MILLÁN, M. et al. **Mitochondrial DNA diversity and population structure of the ocellate freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the Colombian Amazon and Orinoco Basins.** *Mitochondrial DNA Part A*, p. 1–8, 7 Jan 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/24701394.2018.1546300>>.

ROSA, R. S. **A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** 1985. 523 f. The Faculty of the School of Marine Science The College of William and Mary in Virginia, 1985.

SCHLUTER, D. **Adaptive radiation in sticklebacks: size, shape, and habitat use efficiency.** *Ecology*, v. 74, n. 3, p. 699–709, 1993.

SILVA, J.P.C.B.; CARVALHO, M. R. **A taxonomic and morphological redescription of *potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae).** *Neotropical Ichthyology*, v. 9, n. 1, p. 209–232, 2011.

SILVA, J. P. C. B.; CARVALHO, M. R. **Systematics and morphology of *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) and allied forms (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae).** *Zootaxa*, v. 3982, n. 1, p. 1, 2015.

SILVA, C. J. P.; LOBODA, T. ***Potamotrygon marquesi*, a new species of neotropical freshwater stingray (Potamotrygonidae) from the Brazilian Amazon Basin.** *Journal of fish biology*, v. 95, n. 2, p. 594–612, 2019.

SIOLI, H. **The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin (Monographiae Biologicae).** Dordrecht, Pub. Junk, 1984.

SIOLI, H. **Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.** 2. ed. Petrópolis: Vozes, 1991.

STEARNS, S. C. **Life-history tactics: a review of the ideas.** *The Quarterly review of biology*, v. 51, n. 1, p. 3–47, 1976.

WESTHAFER, E. D. **Population Genomic SNP Sampling and Geometric Morphometrics of the Black Spotted Topminnow in the Ozark Highlands**. Southern Illinois University at Edwardsville. 2015.

WRIGHT, S. **The genetical structure of populations**. *Annals of eugenics*, v. 15, n. 1, p. 323–354, 1949.

CAPÍTULO I

Diversidade morfológica e genética de arraia Cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), uma espécie de igarapé

Artigo elaborado conforme normas do periódico *Journal of Fish Biology*. ISSN eletrônico: 1095-8649

Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10958649/homepage/ForAuthors.html>

**Diversidade morfológica e genética de arraia Cururu (*Potamotrygon wallacei*
Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), uma espécie de igarapé**

R. C. S. Belém¹, T. Hrbck², I. P. Farias², W. L. P. Duncan^{1, 2, 3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade
Federal do Amazonas

² Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas

³ Autor correspondente: wduncan@edu.com.br

Resumo: Aqui investigamos pela primeira vez a estruturação morfológica e genética da arraia Cururu por meio de morfometria geométrica (das cartilagens, escapular e sinarcual) e SNPs. Encontramos variações morfológicas significativas entre localidades, margens e áreas, mas não entre os sexos. As diferenças morfológicas não são associadas ao isolamento por distância, por isso, atribuímos essas variações ao tipo de substrato dos ambientes de ocorrência da espécie (que podem ser areno-argilosos ou com troncos e foliços submersos) e a possíveis influências de outras estruturas relacionadas. Nossas análises genômicas identificaram estruturação genética hierárquica, a primeira mais expressiva entre áreas, relacionada com a distância geográfica e a segunda explicada pelo isolamento parcial entre as margens. Portanto, os padrões de diversidade morfológica e genética da arraia Cururu ocorrem em função de diferentes pressões seletivas.

Palavras-chave: estrutura populacional, Potamotrygoninae, arraia de água doce, igarapés, morfometria geométrica, SNPs.

INTRODUÇÃO

A arraia Cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) é a menor espécie dentre os Elasmobranchii de água doce neotropical, podendo medir até 31 cm de largura de disco, caráter geralmente maior nas fêmeas (Duncan *et al.*, 2016). Além do tamanho e forma corporal, a presença do clasper que é o órgão genital masculino (Carvalho *et al.*, 2016) parecem ser as únicas características que expressam dimorfismo sexual.

Além do dimorfismo sexual e uma variação cariomórfica encontrado por (Valentim *et al.*, 2019) atualmente não são conhecidas outras fontes de variações intraespecíficas em *P. wallacei*, a não ser a segregação ambiental entre indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (Oliveira, 2008). No entanto, esta espécie apresenta características que contribuem para a ocorrência desse tipo de variação. Por exemplo, seu endemismo à bacia do rio Negro, nas planícies inundáveis como igapós e igarapés (Carvalho *et al.*, 2016; Duncan *et al.*, 2016).

Com pouca mobilidade e fidelidade a esses ambientes caracterizados por baixa velocidade de corrente, baixa turbidez, pH ácido e substrato areno-argiloso ou com serapilheira (Carvalho *et al.*, 2016; Duncan & Fernandes, 2010), a arraia Cururu vivencia seus aspectos ecológicos de estratégia *k* (Charvet-Almeida *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2016) que são característicos dos Elasmobranchii (Dulvy *et al.*, 2014; Frisk, 2010; Lighten *et al.*, 2016). Tais hábitos são evidentes no ciclo reprodutivo que se inicia a partir de dois ou três anos de idade, influenciado pelo ciclo hidrológico, com ocorrência de parto durante as águas baixas e início do período de chuvas, baixo número de prole entre três e cinco filhotes por gestação (Charvat-Almeida *et al.*, 2005), e longevidade alta entre 14 a 16 anos (Freire, 2015).

Apesar do hábito residente em pequenos cursos d'água marginais, a distribuição conhecida da espécie abrange o médio e o baixo rio Negro até próximo da foz nas imediações de Manaus, no médio curso ocorre em ambas as margens (Carvalho *et al.*, 2016; Duncan *et al.*, 2016). Devido a sua história de vida e suas áreas de ocorrência marcadas por vários cenários ambientais de complexa hidrologia, separados pela calha com multicanais (abramching) nas regiões de Mariuá e de Anavilhanas e longas distâncias geográficas (Latrubesse & Franzinelli, 2005; Latrubesse & Stevaux, 2015; Tricart, 1977), é possível que a arraia Cururu apresente significativas variações intraespecíficas na morfologia das cartilagens, escapular e sinarcual cérvico-torácica entre os sexos, localidades (igapós e igarapés), margens

e áreas (médio e baixo curso do rio), além de estrutura genética da população ao longo do curso do rio.

Essas hipóteses são suportadas em função do polimorfismo no esqueleto dessas estruturas ser comum em Batoidea e geralmente associados ao movimento natatório assim como a funções estruturais (Afonso & Gallo, 2001; Stepanek & Kriwet, 2015). Enquanto a cartilagem escapular sustenta o propterígio, mesopterígio e metapterígio, que são estruturas esqueléticas intimamente relacionadas aos raios das nadadeiras peitorais, a cartilagem sinarcual cervico-torácica suporta o escapulocoracoide, articula-se aos ceratobranquiais (esqueleto dos arcos branquiais) e forma os limites com o crânio e a coluna vertebral (Bini-Júnior *et al.*, 2015). Além disso, o estilo de vida sedentário em ambientes específicos, associado ao pequeno tamanho corporal (Farrugia *et al.*, 2016; Wearmouth & Sims, 2009) contribui para uma dispersão lenta com potencial estruturação genética (Borsa *et al.*, 2012).

Os estudos populacionais com esse tipo de questão têm cada vez mais suporte em abordagens integrativas de morfologia e genética, o que permite a observação de diferentes pressões de seleção exercidas sobre as populações (Bernatchez *et al.*, 2016; Petean *et al.*, 2020). Nesse sentido, a morfometria geométrica (MG), uma técnica baseada em coordenadas anatômicas que são avaliadas em duas ou três dimensões, capaz de informar os locais exatos e a magnitude da variação de forma (Bookstein, 1983; Monteiro & Reis, 1999), pode ser muito informativa. Essa ferramenta tem sido utilizada em investigações filogenéticas (Franklin *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2016) e de dinâmica populacional (Martinez *et al.*, 2019) em arraiais marinhas, porém, ainda não foi aplicada a estudos com arraiais de água doce.

Os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), por sua vez, têm grande potencial resolutivo, sobre tudo em questões populacionais, já que são as formas mais frequentes de variações genéticas, amplamente distribuídos no genoma (Baird *et al.*, 2008). São geralmente identificados por meio de ddRAD, um método que utiliza duas enzimas de restrição para isolar os fragmentos de DNA em diferentes faixas de tamanho (Peterson *et al.*, 2012). Em arraiais de água doce foram utilizados como marcador molecular para identificação de hibridismo entre duas espécies da bacia do Paraná (Cruz *et al.*, 2017). Assim, neste estudo investigamos o dimorfismo sexual, a diversidade morfológica e genética de *Potamotrygon wallacei* entre diferentes localidades ao longo de sua distribuição no médio e baixo rio Negro por meio de morfometria geométrica e SNPs.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao comitê de ética de estudos com animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM) sob o processo 007/2019. As coletas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (autorização nº 72927-1). A área de estudo (Figura 1) compreende o médio e o baixo rio Negro. O médio curso corresponde a uma região de grande importância, pois é de onde se conhece a maior parte dos registros de ocorrência da arraia Cururu e onde ocorreu por muito tempo a pesca ornamental (Araújo *et al.*, 2004), pela qual entre 1998 a 2008 foram retiradas em média de 8,8 mil exemplares da natureza (Duncan *et al.*, 2010). O baixo curso apresenta poucos registros da espécie (Carvalho *et al.*, 2016), mas a compreensão de aspectos populacionais nessa área pode ampliar o conhecimento sobre sua distribuição e comportamento.

No médio rio Negro as áreas amostradas na margem esquerda foram os igarapés Coibi ($0^{\circ}34'07''\text{S}$ $63^{\circ}16'25''\text{W}$) e Irauaú ($1^{\circ}07'59''\text{S}$ $62^{\circ}12'47''\text{W}$). Na margem direita foram coletados exemplares em igarapés do rio Cuiuni ($0^{\circ}55'53''\text{S}$ $63^{\circ}20'37''\text{W}$) (afluente do rio Negro), e no lago do Cubá ($0^{\circ}45'18''\text{S}$ $63^{\circ}05'55''\text{W}$). No baixo rio Negro, o igarapé do Tupé ($3^{\circ}02'59''\text{S}$ $60^{\circ}16'05''\text{W}$) na margem esquerda foi amostrado.

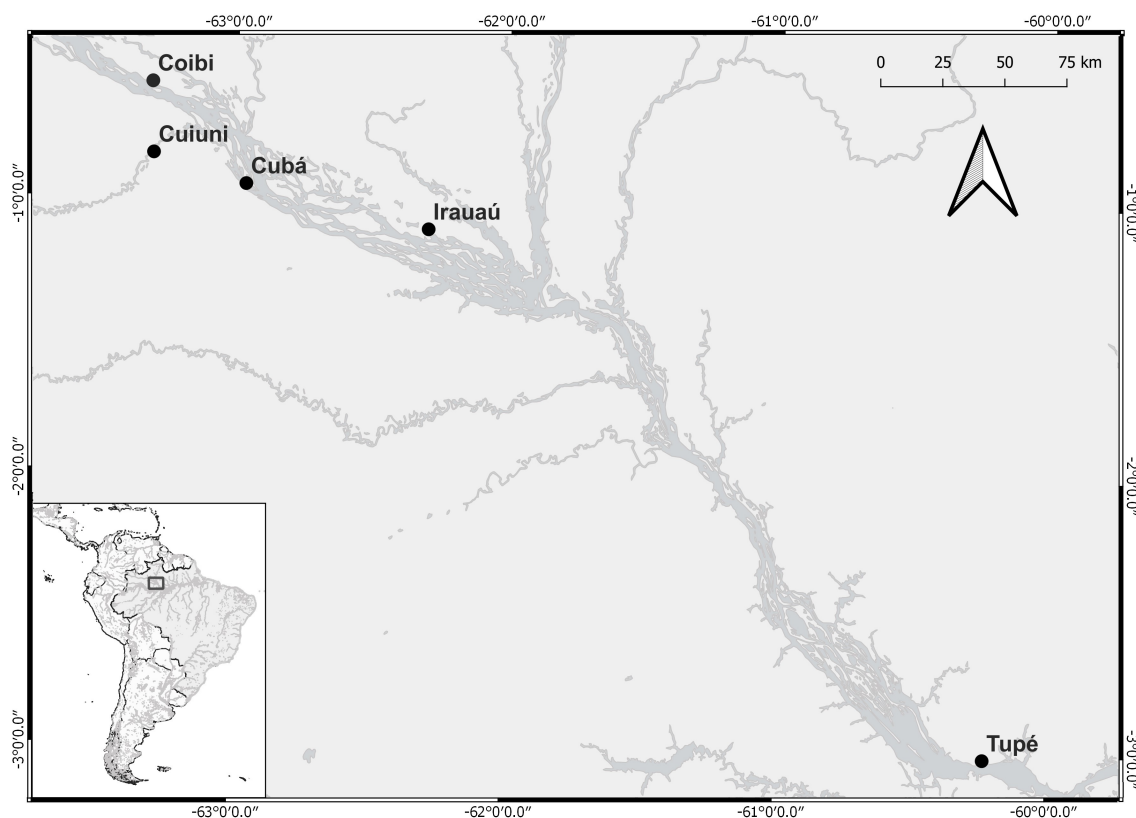


Figura 1: Mapa da área de estudo. Os círculos indicam os locais de coleta no médio e baixo rio Negro.

Os exemplares foram coletados entre janeiro de 2018 e outubro de 2019 durante o período de águas baixas, utilizando puçás (redes de mão) e lanternas de cabeça como apetrechos de pesca. Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de imersão em 1,0 g/L de 4-aminobenzoato de etilo cristalino (benzocaína). Em seguida foi realizada a biometria dos animais (Rosa, 1985).

Posteriormente, uma amostra de tecido muscular da região ventral da nadadeira peitoral esquerda de cada indivíduo foi coletada e armazenada em álcool P.A 95% e mantidos em freezer a -26°C para análises moleculares. Por fim, os animais foram fixados em formol 10%. Para a análise do DNA genômico foram utilizados cinco (5) indivíduos de cada localidade (Tabela 1).

Tabela 1: Número de amostras por locais na morfometria geométrica e na análise genômica.

Localidade	Localidade Cartilagem escapular - cartilagem sinarcual	Sexo por localidade (Macho - Fêmea)	Número de amostras				Análise genômica
			Margem direita	Margem esquerda	Médio rio Negro	Baixo rio Negro	
Coibi	26-26	16 - 10	-	26	4	-	5
Cuiuni	28-28	16 - 12	28	-	4	-	5
Cubá	13-13	6 - 7	13	-	4	-	5
Irauaú	18-18	12 - 6	-	18	4	-	5
Tupé	15-15	5 - 10	-	-	-	15	5

Nota: O Tupé não foi incluído nas análises entre margens

Morfometria geométrica

Realizamos radiografias de 100 exemplares em posição dorsal, com largura de disco igual ou superior a 13 cm. As imagens foram transformadas em um arquivo tps através do software tpsUtil1.74 (Rohlf, 2012) para inserção (digitalização) de 12 coordenadas anatômicas (landmarks) na cartilagem escapular e 16 na cartilagem sinarcual cervico-torácica (Figura 2) por meio do software tpsDigs 2.3.2. (Rohlf, 2010). Cada estrutura foi analisada independentemente e, a nomenclatura das estruturas anatômicas foi baseada em Silva & Loboda (2019) (Tabela 2). Utilizamos apenas dois semimarcos neste estudo, o primeiro situado na região interna do metacôndilo localizado na cartilagem escapular (coordenadas 6 - 12) e o segundo na base do processo escapular (5 - 12) da cartilagem sinarcual.

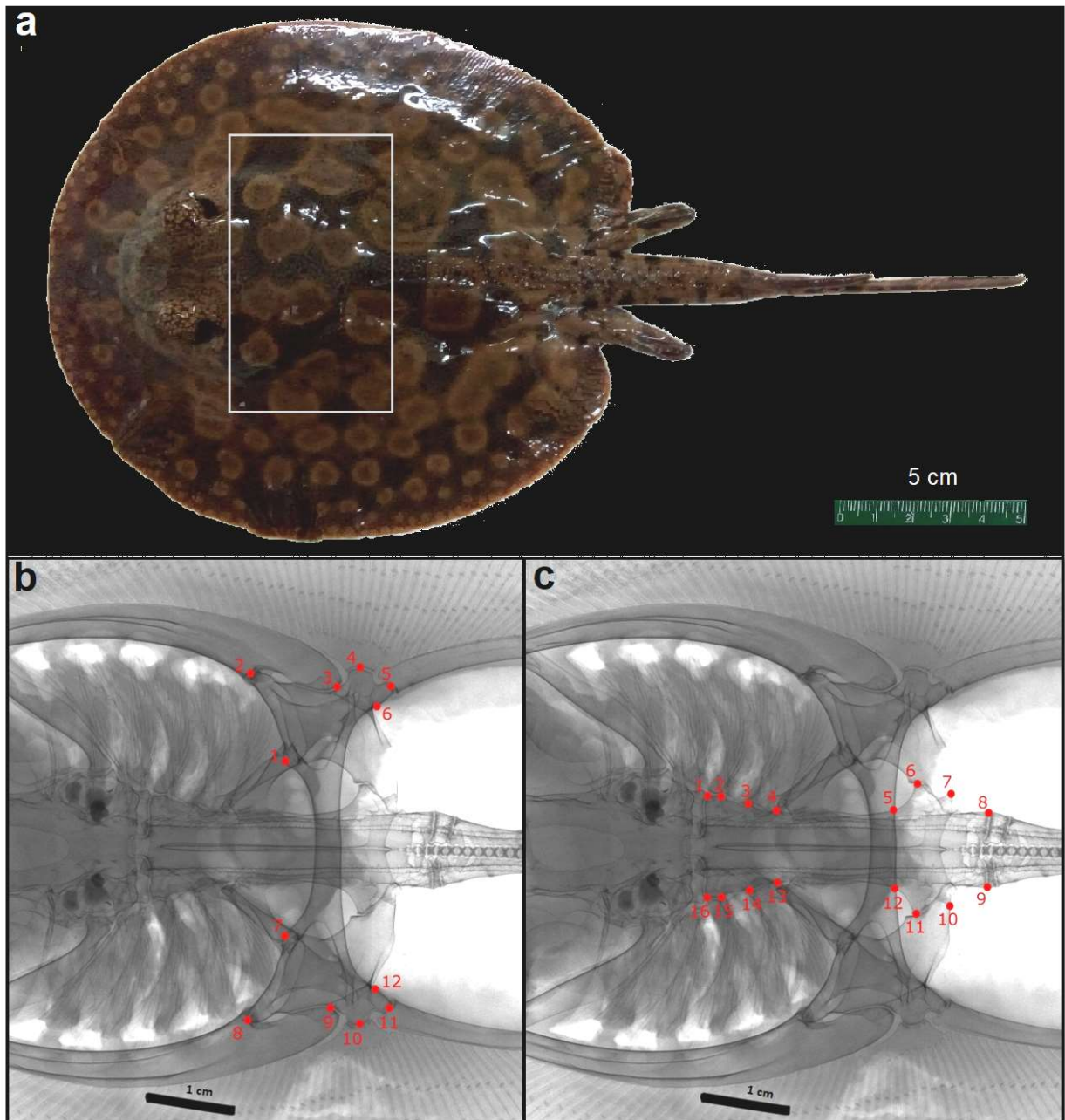


Figura 2: Representação dos marcos anatômicos digitalizados no TpsDig. Em (a) Exemplar macho de *P. wallacei* com indicação da região corporal onde se encontram as estruturas esqueléticas analisadas. Em (b) coordenadas inseridas na cartilagem escapular e em (c) coordenadas inseridas na cartilagem sinarcual cervico-torácica.

Tabela 2: Identificação das coordenadas anatômicas e estruturas correspondentes.

Nº landmarks	Cartilagem escapular - Nome das estruturas correspondentes	Sigla das coordenadas
1 - 7	Articulação do 5º epibrânquial e ceratobrânquial	feb 5; fcb 5
2 - 8	Procôndilo	pc
3 - 9	Faceta do propterígio	fct
4 - 10	Mesocôndilo	msc
5 - 11	Metacôndilo	mtc
6 - 12	Base da supraescapula	sb
Nº landmarks	Cartilagem sinarcual - Nome das estruturas correspondentes	Sigla das coordenadas
1 - 16	Limite da cartilagem sinarcual com o crânio	lco
2 - 15	Articulação do Ceratobrânquial 2	acb 2
3 - 14	Articulação do Ceratobrânquial 3	acb 3
4 - 13	Articulação do Ceratobrânquial 4	acb 4
5 - 12	Base de o côndilo do processo escapular	bca
6 - 11	Côndilo articular do processo escapular	asp-1
7 - 10	Cavidade articular do processo escapular	asp-2
8 - 9	Articulação da sinarcual com a coluna vertebral	lsc

As coordenadas obtidas por digitalização foram submetidas à superimposição de Procrustes, para alinhamento e remoção do efeito de posição, escala e orientação. Além disso, realizamos uma regressão das coordenadas de Procrustes com o tamanho do centroide para identificação de efeito do tamanho, que quando significativo foi corrigido por meio da realização das análises estatísticas sobre os resíduos da regressão (Klingenberg, 2016).

Após a superimposição de Procrustes, executamos uma análise de componentes principais (PCA), para exploração de possíveis padrões causados por diferenças de forma. Verificamos se havia dimorfismo sexual por meio da função discriminante com validação cruzada. Diferenças entre os grupos pré-determinados foram avaliadas por meio de uma análise de variáveis canônicas (CVA), a partir da qual foi extraída a distância de Procrustes (PD), unidade utilizada para testar a hipótese de diferenciação morfológica entre os grupos das localidades, por meio do teste de permutação de Monte Carlo (Bookstein, 1996; Henriques *et al.*, 2020; Sequeira *et al.*, 2011; Zelditch *et al.*, 2012). Variações morfológicas da cartilagem escapular e da cartilagem sinarcual entre margens e áreas (médio e baixo rio Negro) foram analisadas mediante função discriminante (com validação cruzada). O teste de permutação de Monte Carlo foi utilizado para testar a significância das variações em todas as comparações (sexo, localidades, margens e áreas).

Apenas para a análise entre margens, o grupo do Tupé foi removido em função de sua grande distância geográfica. Para a comparação entre médio e baixo rio Negro, foi criado um

banco de dados com 16 indivíduos do médio curso (quatro animais de cada local selecionados ao acaso) devido à discrepância do N amostral entre as áreas. Todas as comparações de forma foram visualizadas por meio de wireframe (gráfico de arame). Realizamos o teste de Mantel utilizando as matrizes de distâncias morfológicas (PD) e de distância geográfica, a fim de verificar se as variações de forma entre localidades são resultado de isolamento por distância (Grassi-Sella *et al.*, 2018; Mouludi-Saleh *et al.*, 2020; Quintela *et al.*, 2016). Por fim, uma análise de agrupamento pareado (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*, UPGMA) foi executada para observação de padrões das relações de similaridade entre os grupos.

Neste estudo foram respeitados os pressupostos da CVA (distribuição normal multivariada; compartilhamento de estruturas similares de matrizes de variância-covariância entre os grupos; e homogeneidade de variância). As análises estatísticas da MG foram executadas nos programas MORPOJ 1.06 (Klingenberg, 2011) e PAST 4.01. (Hammer, 2012).

Análise de DNA genômico

O gDNA foi extraído por meio do protocolo CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987). Para a descoberta dos SNPs das arraiais foram obtidas sequências genômicas de representação reduzida usando o protocolo RAD de digestão dupla (ddRADseq) (Peterson *et al.* 2012) modificado (Vargas-Ramírez *et al.*, 2020). Vinte e cinco (25) amostras com alta qualidade de DNA de cinco localidades foram selecionadas. Duzentos (200) ng de DNA foram digeridos com as enzimas de restrição *SdaI* e *Csp6*, e os produtos da digestão foram simultaneamente ligados aos adaptadores A1 e P1 em uma reação a 37 ° C por 2 h. Os produtos digeridos foram amplificados por PCR, visualizados em gel de agarose a 1%, purificados em esferas magnéticas e quantificados por fluorometria em um Qubit 2.0 (Life Technologies). A seleção e tamanho dos fragmentos foi feita no Pippin Prep entre 300-400 bp. Uma vez que essa fração de tamanho foi coletada, uma amplificação clonal foi realizada com o kit Ion PGM OT2 400 (Life Technologies). O produto da amplificação clonal foi então sequenciado com o kit de sequenciamento Ion PGM 400 em um chip 316 Ion PGM (Life Technologies).

As leituras obtidas a partir do sequenciamento foram processadas pelo software TorrentSuite (da plataforma IonTorrent) em formato BAM. O arquivo foi transformado em formato FASTAQ usando SAMtools v1.3.1 (Li *et al.*, 2009), posteriormente processado,

retirando-se as leituras menores de 200 pb mediante um script na linguagem de programação Python. O arquivo FASTAQ foi analisado no pipeline DiscoSnp-RAD (Gauthier *et al.*, 2020) para descobrir pequenas variantes nos dados de sequenciamento do tipo RAD.

Em seguida, foram calculados índices de diversidade genética como heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o). A diferenciação genética entre indivíduos, entre e dentro das populações determinadas a priori, foi testada mediante a análise de variância molecular (AMOVA). O índice F_{st} foi determinado entre pares de localidade para identificar o nível de estrutura populacional. Para conhecer os padrões espaciais de fluxo gênico, o isolamento por distância foi testado através de correlação da distância genética em função da distância geográfica (calculada ao longo do rio) por meio do teste de Mantel com e sem o Tupé, devido a grande distância dessa área em relação às demais localidades. As análises foram implementadas no software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A análise Bayesiana de populações foi realizada no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) para identificar padrões de estrutura populacional no banco de dados. Atribuindo-se os indivíduos em um número mais provável de populações a partir de grupos predefinidos empregando as frequências alélicas dos loci. Foram realizadas 10 execuções para cada número predeterminado de grupos biológicos ($K = 1$ a 5), com 1.000.000 de cadeias MCMC (Markov e Monte Carlo) com as primeiras 100.000 cadeias descartadas como queima. Foram utilizados os modelos de “mistura” e “frequências alélicas correlacionadas”. O primeiro modelo assume que a herança genética pode ser derivada de mais de uma população, enquanto o segundo modelo considera que as frequências alélicas de populações relacionadas, são similares (Falush *et al.*, 2003).

A análise Bayesiana também foi realizada com e sem as amostras do Tupé. No segundo caso o número pré-determinado de grupos foi $K = 1$ a 4 . Os resultados do STRUCTURE foram importados para o programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & Von Hold, 2012) onde o número mais provável de grupos foi determinado pelo método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005). Esses resultados foram visualizados no programa CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015). Uma análise de agrupamento pareado (UPGMA) foi realizada para observação dos padrões hierárquicos de estrutura genética baseados no índice F_{st} . Por fim, as matrizes de distância genética e de distância morfológica foram comparadas mediante teste de Mantel para testar a congruência entre elas (Beyene *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2015). As duas últimas análises também foram realizadas no software PAST 4.01.

RESULTADOS

Variações morfológicas da espécie

Os animais utilizados nesse estudo apresentaram largura de disco (LD) entre 13 cm a 26,6 e comprimento de disco de 14 cm a 29 cm. (Tabela 3). O efeito do tamanho não foi significativo na cartilagem escapular para locais, margem e sexo, porém, foi significativo e precisou ser corrigido na comparação entre áreas (médio e baixo rio Negro) (regressão das coordenadas Procrustes vs o tamanho do centróide $P < 0,05$). O efeito do tamanho também foi corrigido em todas as comparações da cartilagem sinarcual.

Não houve diferença significativa entre os sexos, tanto na cartilagem escapular (Figura 3a-b) quanto na cartilagem sinarcual (Figura 4a-b). As validações cruzadas de ambas as estruturas classificaram corretamente pouco mais de 50% dos indivíduos.

Tabela 3: Número de indivíduos por grupos comparáveis. Valores médios \pm desvio padrão (DP), mínimo (Min) e máximo (Max) de largura de disco (LD) e comprimento de disco (CD).

Sexo/Localidade/Margem/Área	LD (cm)		CD (cm)	
	Média \pm DP	Min - Ma	Média \pm DP	Min - Ma
Macho	17,8 \pm 3,17	13 - 23,8	19,7 \pm 3,47	15,8 - 25,5
Fêmea	18,5 \pm 3,12	13 - 26,5	20,5 \pm 3,44	15 - 29
Coibi	19,8 \pm 2,95	16,9 - 26,5	21,8 \pm 3,39	17,5 - 29
Cuiuni	16,5 \pm 2,04	13,1 - 20,2	18,2 \pm 2,41	14,1 - 23
Cubá	16,3 \pm 3,13	13,1 - 22	18,5 \pm 3,23	14,2 - 24
Irauaú	19,3 \pm 3,70	13 - 23,5	21,0 \pm 3,97	14 - 25,5
Tupé	18,1 \pm 2,70	13,9 - 23,5	20,4 \pm 2,96	16,5 - 26,2
Margem Direita	17,5 \pm 3,03	13 - 22	18,3 \pm 2,66	14,1 - 24
Margem Esquerda	18,3 \pm 3,11	13 - 26,5	21,5 \pm 3,61	14 - 29
Médio rio Negro	18,1 \pm 3,15	13,9 - 23,5	19,9 \pm 3,55	16,5 - 26,2
Baixo rio Negro	18,1 \pm 2,70	13 - 26,5	20,4 \pm 2,96	14 - 29

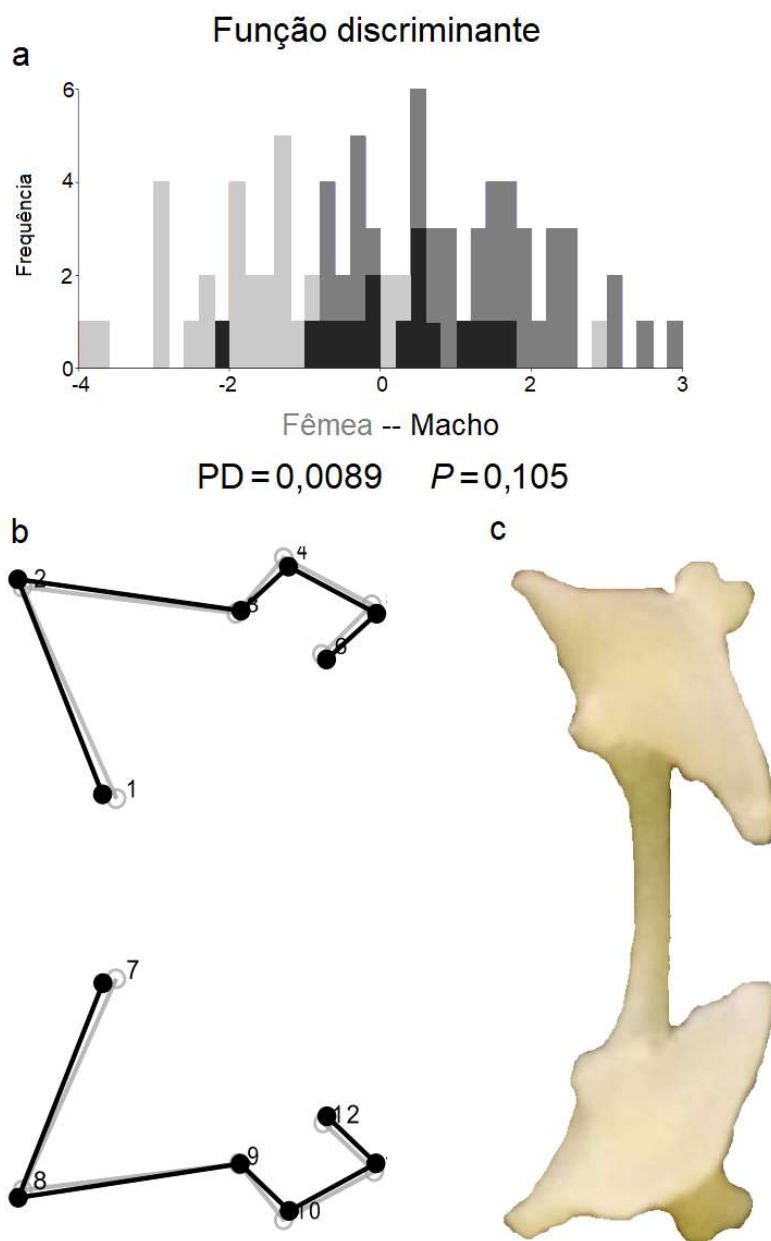


Figura 3: Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre sexos. (a) O histograma da função discriminante mostra que não houve diferença na forma da cartilagem escapular entre os sexos. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. (b) O wireframe corrobora ausência de variação na forma. Em (c) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem escapular.

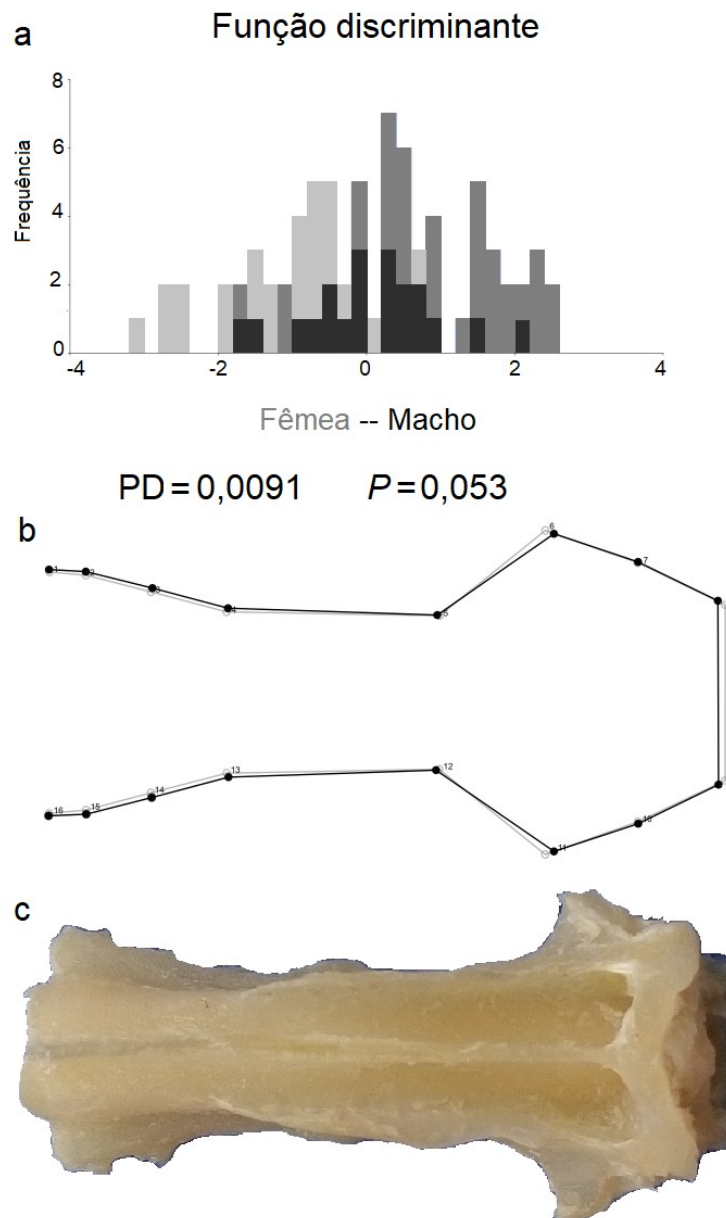


Figura 4: Variação de forma da cartilagem sinarcual cervicotorácica de *r. wallacei* entre sexos. (a) o histograma da função discriminante mostra que não houve diferença na forma dessa estrutura entre os sexos. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de P para o teste de Monte Carlo. (b) o wireframe corrobora ausência de variação na forma. Em (c) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem sinarcual.

Os dois primeiros eixos da PCA da cartilagem escapular explicaram 49,2% da variação (PC1 = 33,5% e PC2 = 15, 7%), com acúmulo de 87,8% nos primeiros sete PCs. Enquanto na cartilagem sinarcual os dois primeiros PCs explicaram 46,4% (PC1 26,2% e PC2 20,2%) acumulando 86,8% nos sete primeiros eixos.

A CVA da cartilagem escapular (Figura 5a) mostrou separação entre os indivíduos de Tupé, Coibi, e Cuiuni, com grande sobreposição dos espécimes de Cuba e Irauaú sobre Cuiuni e Coibi (CV1 = 60, 6% e CV2 = 31,4%, acumulativo de variação de 92% nos dois primeiros CVs). Um padrão semelhante foi observado na CVA da cartilagem sinarcual

(Figura 5b), porém, com maior sobreposição entre os indivíduos de Coibi, Irauaú e Cubá. Na cartilagem escapular o procôndilo que se articula ao propterígio (coordenadas 2 – 8) e o metacôndilo que é o cômulo articular do metapterígio (landmarks 5 – 11) são os marcos anatômicos que contribuem para a maior parte das variações morfológicas nessa estrutura (Figura 6a).

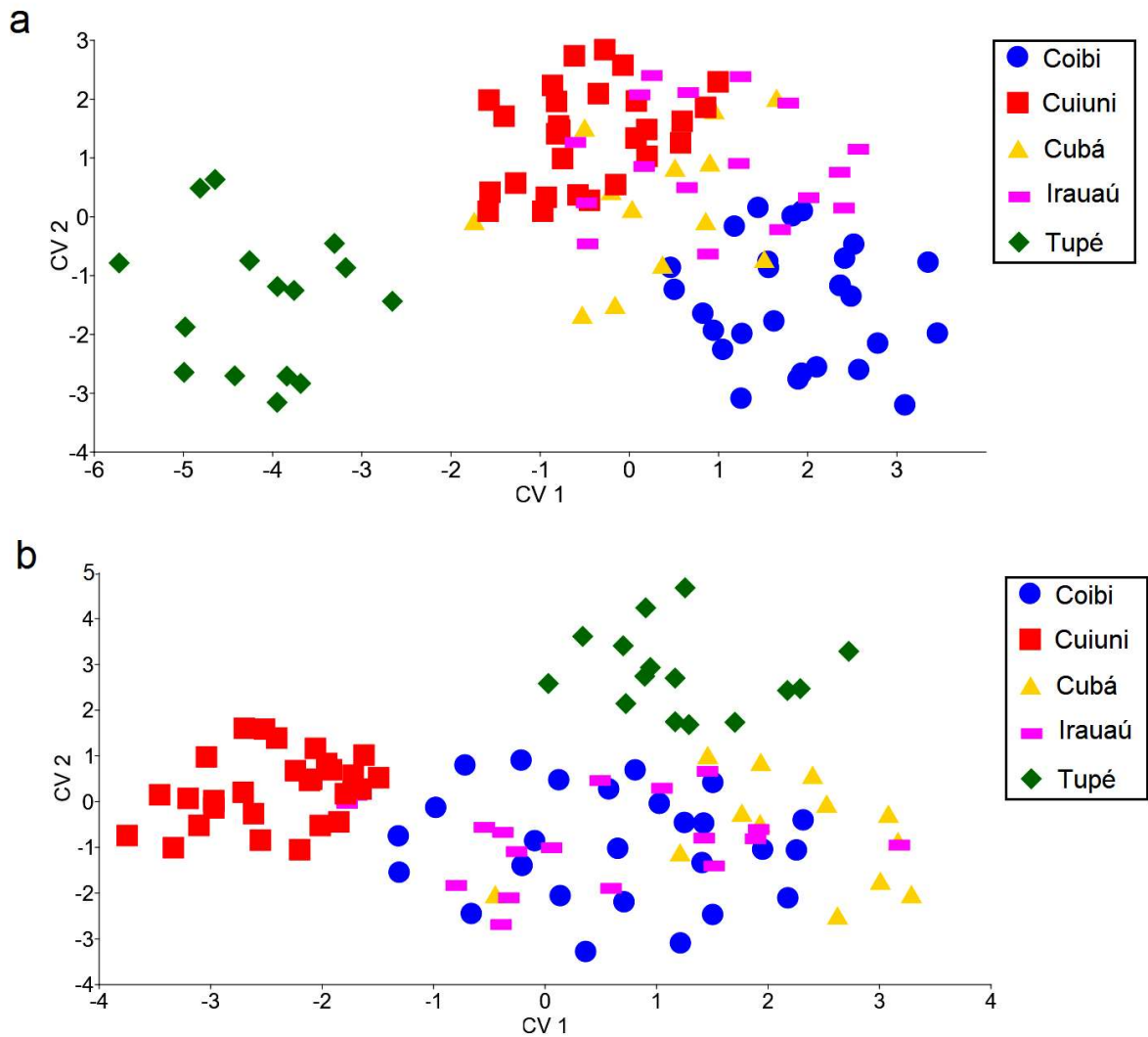


Figura 5: Diagrama de dispersão da análise de variáveis canônicas (CVA). Em (a) é ilustrada a separação entre grupos com base nas variações de forma da cartilagem escapular. E em (b) observa-se a separação de grupos a partir da morfologia da cartilagem sinarcual.

As coordenadas anatômicas que tiveram maior contribuição para as variações da CVA na cartilagem sinarcual foram os limites com o cômulo occipital (1 – 16), articulações dos ceratobranquiais 2, 3 e 4 (2 - 15, 3 -14 e 4 – 13), cômulo articular do processo escapular,

cavidade articular do processo escapular (6 - 11, 7 - 10), e limites articulares com a coluna vertebral (8 - 9) (Figura 6b).

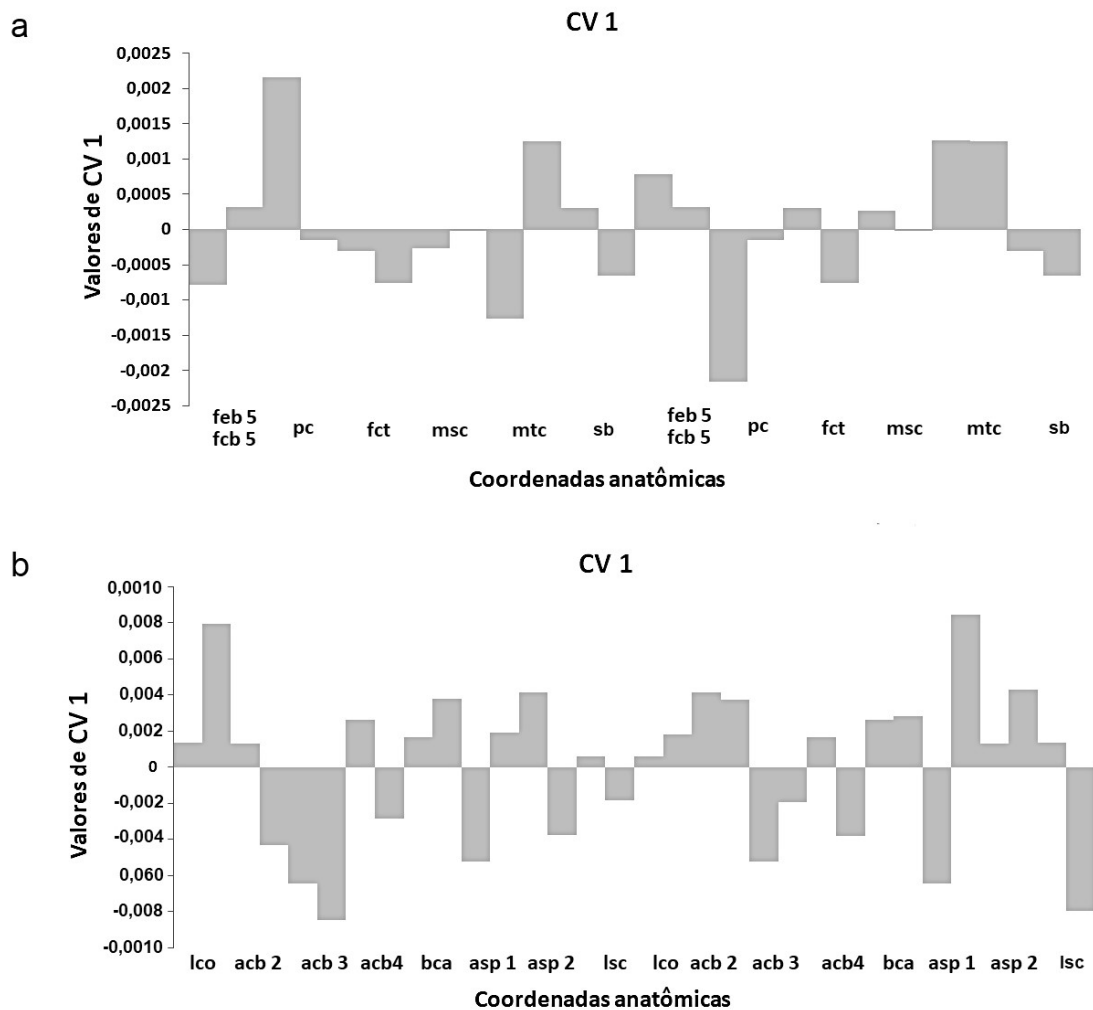


Figura 6: Histograma representando as coordenadas anatômicas no eixo 1 da análise de variáveis canônicas (CVA). Em (a) cartilagem escapular e (b) cartilagem sinarcual.

As diferenças morfológicas da cartilagem escapular foram menores entre as formas médias de Cuba e Irauaú, e maiores entre as formas médias de Coibi e Tupé (Figura 7a). Os indivíduos de Tupé apresentaram diferenças significativas em relação às outras localidades, sua forma média possui maior alinhamento vertical do procôndilo e metacôndilo ao eixo corporal. Já a forma média do Cuiuni diferencia-se por possuir maior expansão vertical da cartilagem escapular, enquanto as formas médias de Coibi, Cuba e Irauaú apresentam menor espessura com sutil projeção frontolateral dessa estrutura.

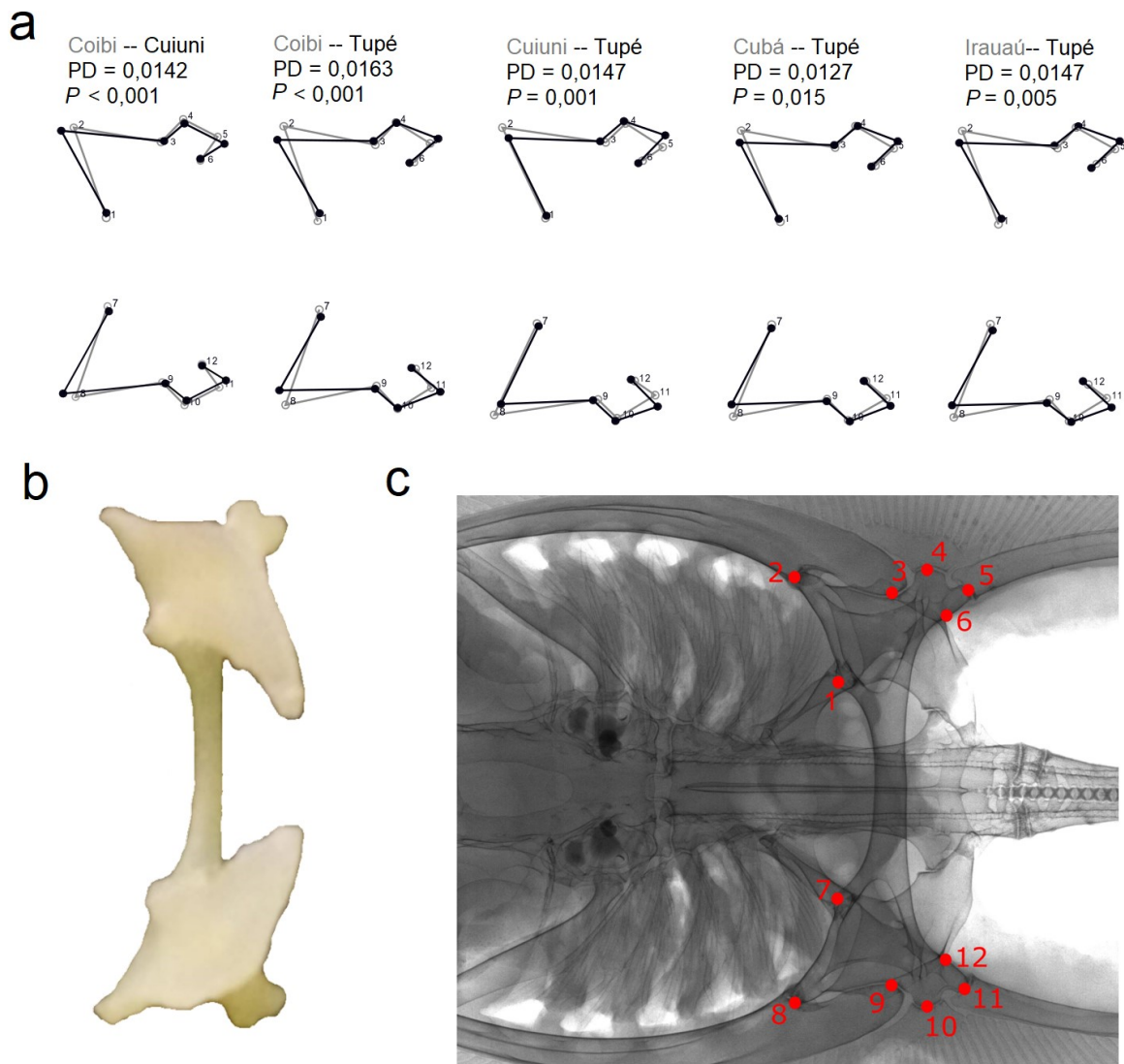


Figura 7: Variação de forma da cartilagem escapular entre localidades. (a) Comparações par a par demonstram a variação de formas médias significativas ($P < 0,05$) da cartilagem escapular entre os indivíduos coletados em diferentes localidades. Sobre cada representação de forma estão indicados os locais comparados, a distâncias de Procrustes (PD) e os respectivos valores de P do teste de Monte Carlo. Em (b) é ilustrada uma representação anatômica da cartilagem escapular. E em (c) uma representação das coordenadas anatômicas analisadas.

A morfologia da cartilagem sinarcual dos animais de Tupé também foi diferente de todos os outros grupos (Figura 8a), principalmente no formato afunilado da porção anterior correspondente aos ceratobranquiais, além do côndilo e cavidade do processo escapular alongados. Os índices de diversidade morfológica foram menores entre Coibi e Irauaú e maiores entre Cuiuni e Cubá. O teste de Mantel da cartilagem escapular ($r = 0,456$ e $P = 0,189$) e da Cartilagem sinarcual ($r = 0,100$ e $P = 0,639$) com o Tupé e sem o Tupé (

respectivamente $r < 0,100$ e $P = 0,679$; $r < 0,100$ e $P 0,958$) assim como a análise de cluster (pares de grupos UPGMA), realizadas com as distâncias de Procrustes de ambas as cartilagens (Figura 9a e Figura 9b) mostraram que o isolamento por distância e o isolamento por margem não explicam os padrões de variações morfológicas aqui observados.

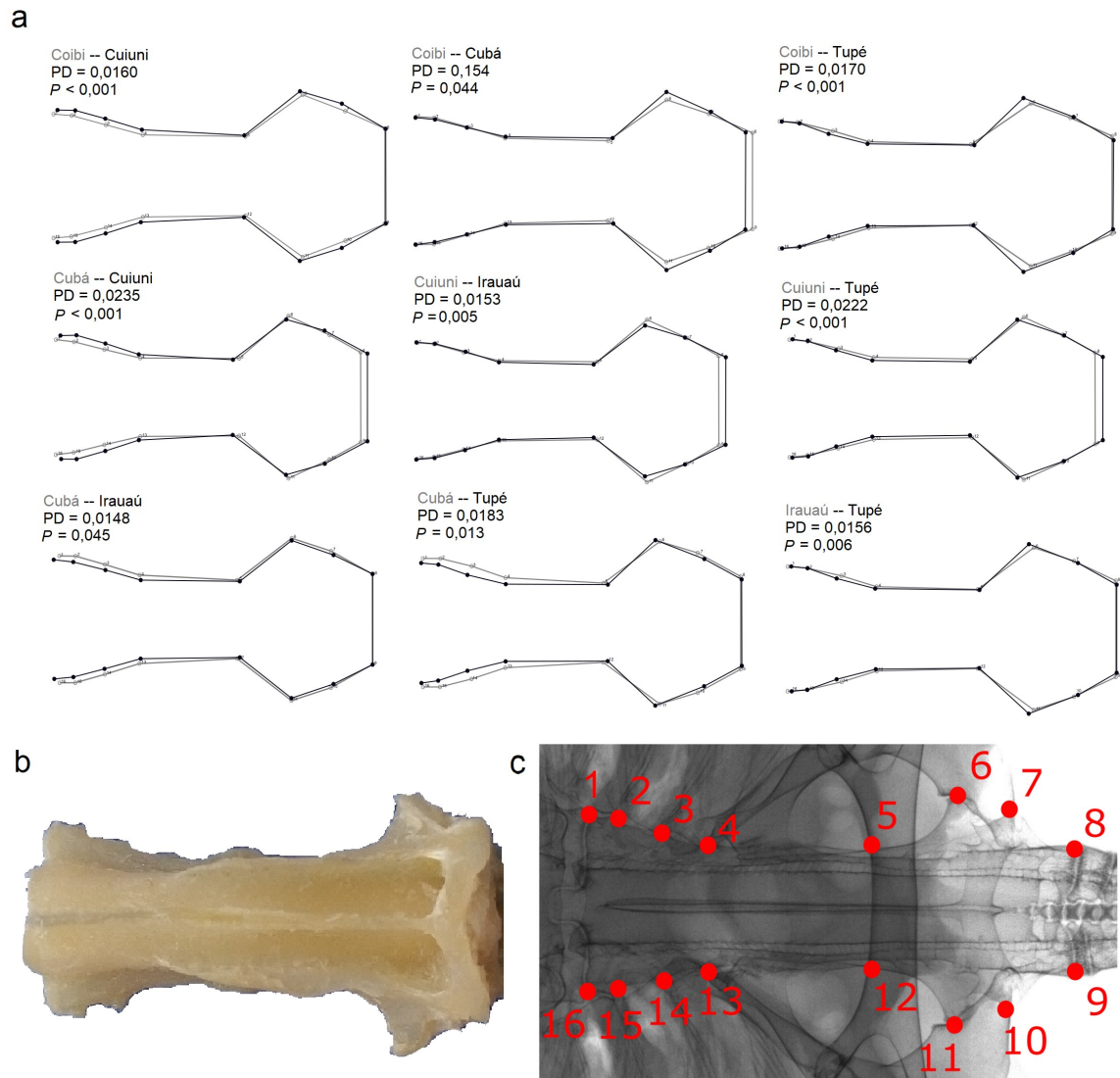


Figura 8: Variação de forma entre locais. O Wireframe representando as variações de forma média da cartilagem sinarcual entre pares de localidades. Sobre cada representação de forma estão indicados os locais comparados, a distâncias de Procrustes (PD) e os respectivos valores de P do teste de Monte Carlo.

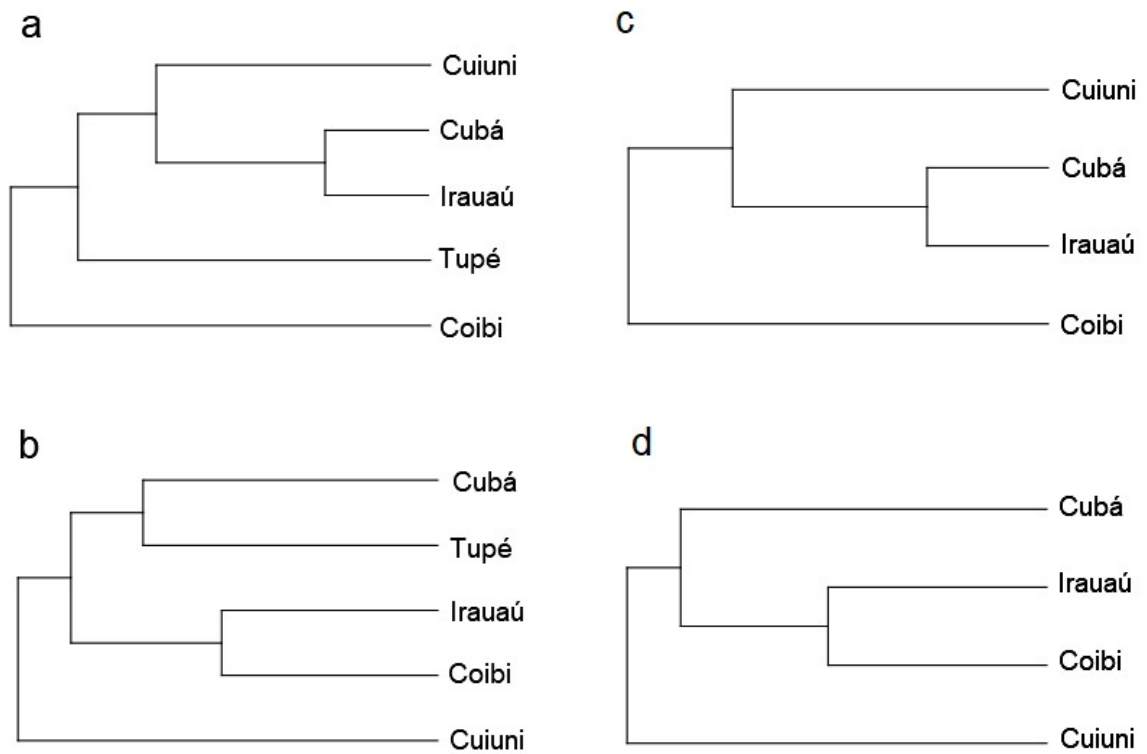


Figura 9: Análise de agrupamento entre as localidades. Dendograma da análise de agrupamento utilizando a distância de Procrustes das cartilagens, escapular e sinarcual respectivamente (a) e (b) com o Tupé, e (c) e (d) sem o Tupé.

Na comparação entre margens (Figura 10a), a cartilagem escapular apresentou baixa variação, porém, significativa com a validação cruzada classificando corretamente 76,1% dos indivíduos ao seu grupo de origem. O wireframe (Figura 10b) mostra que o grupo da margem direita possui o escapulocoracoide verticalmente mais alongado em relação à margem esquerda.

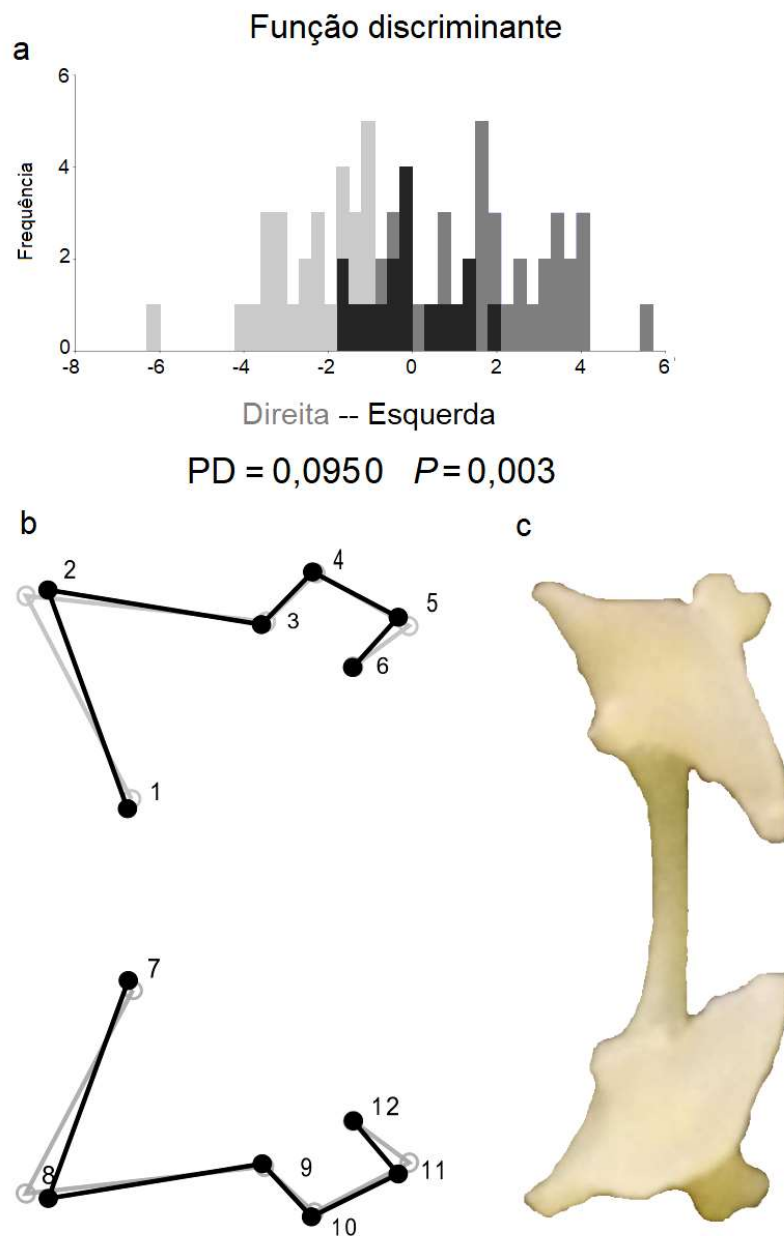


Figura 10: Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre as margens do rio. Em (a) o histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos, porém com sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de *P* para o teste de Monte Carlo. Em (b) o wireframe representa diferenças da forma dos grupos das margens. E em (c) representação anatômica da cartilagem escapular.

A variação de forma da cartilagem sinarcual entre margens (Figura 11a) também foi significativa, com 71,5% dos indivíduos classificados corretamente pela validação cruzada. Os indivíduos da margem direita possuem maior expansão da região vinculada aos

ceratobranquiais e do côndilo articular da cartilagem escapular. Enquanto os indivíduos da margem esquerda apresentam maior alongamento vertical da cartilagem sinarcual.

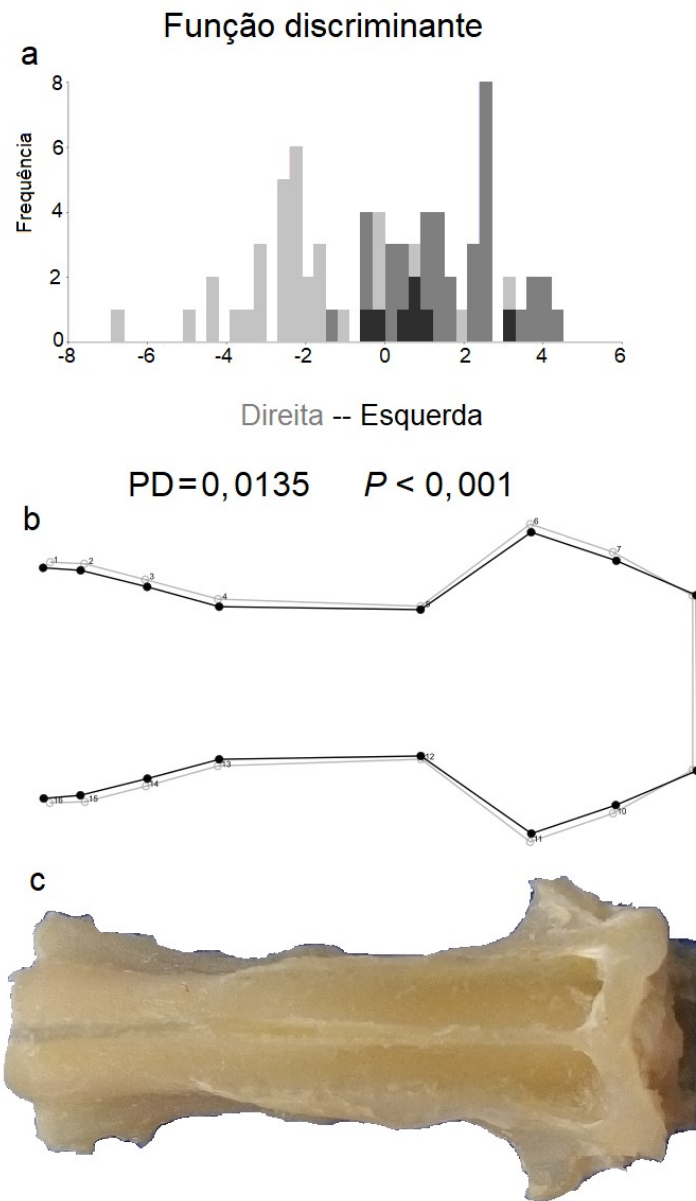


Figura 11: Variação de forma da cartilagem sinarcual de *P. wallacei* entre as margens do rio. a) O histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos com pouca sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidades de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de P para o teste de Monte Carlo. b) O wireframe representa a forma média dos grupos. c) Representação anatômica da cartilagem sinarcual por meio de dissecação.

Entre áreas, a forma da cartilagem escapular é diferente no grupo do médio rio Negro por uma grande projeção frontolateral do procôndilo (Figura 12a-b). A validação cruzada

classificou corretamente 90,4 % dos indivíduos. Enquanto na cartilagem sinarcual (Figura 13a-b) 94,1% dos indivíduos foram classificados corretamente ao seu grupo de origem pela validação cruzada. A forma média dos animais do baixo rio Negro possui uma curvatura afunilada na região de articulação dos ceratobranquiais.

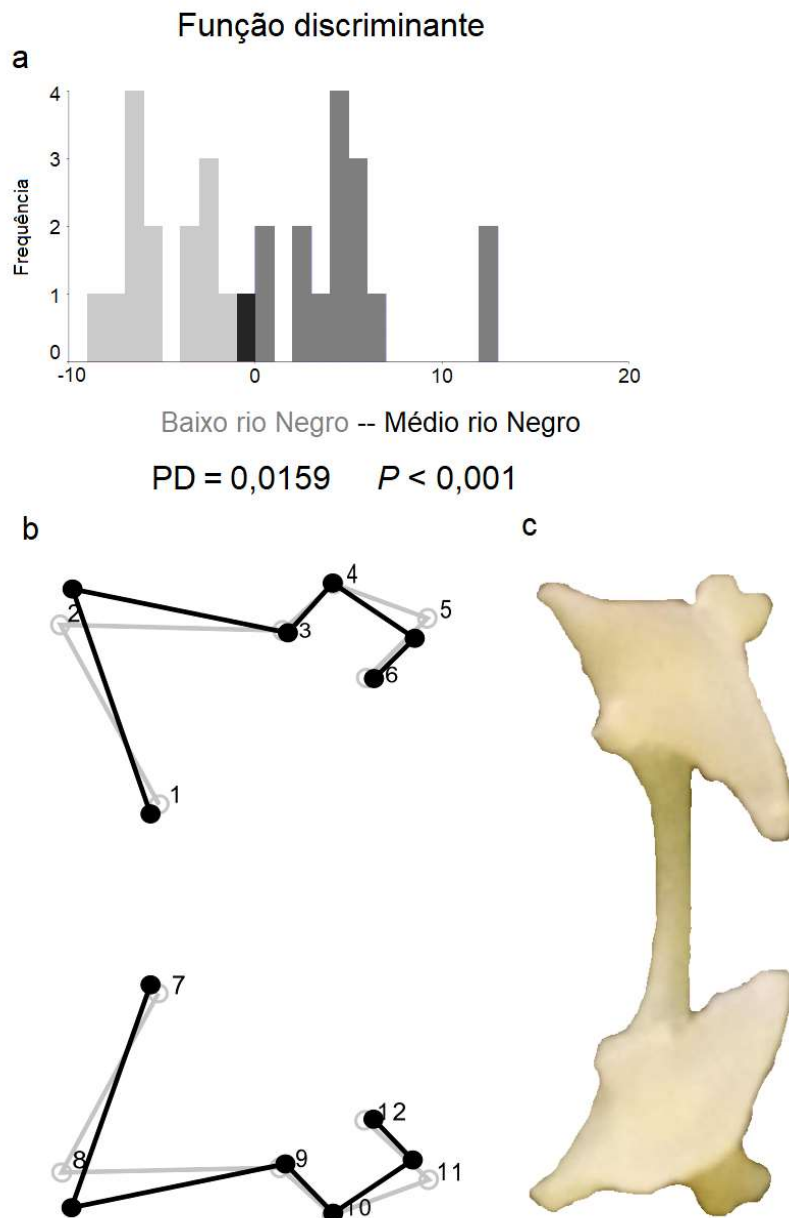


Figura 12: Variação de forma da cartilagem escapular de *P. wallacei* entre médio e baixo rio Negro. Em (a) O histograma da função discriminante mostra a separação entre os grupos, com pouca sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidade de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de P para o teste de Monte Carlo. Em (b) O wireframe representa a forma média de cada grupo. E em (c) é ilustrada uma peça anatômica da cartilagem escapular dissecada.

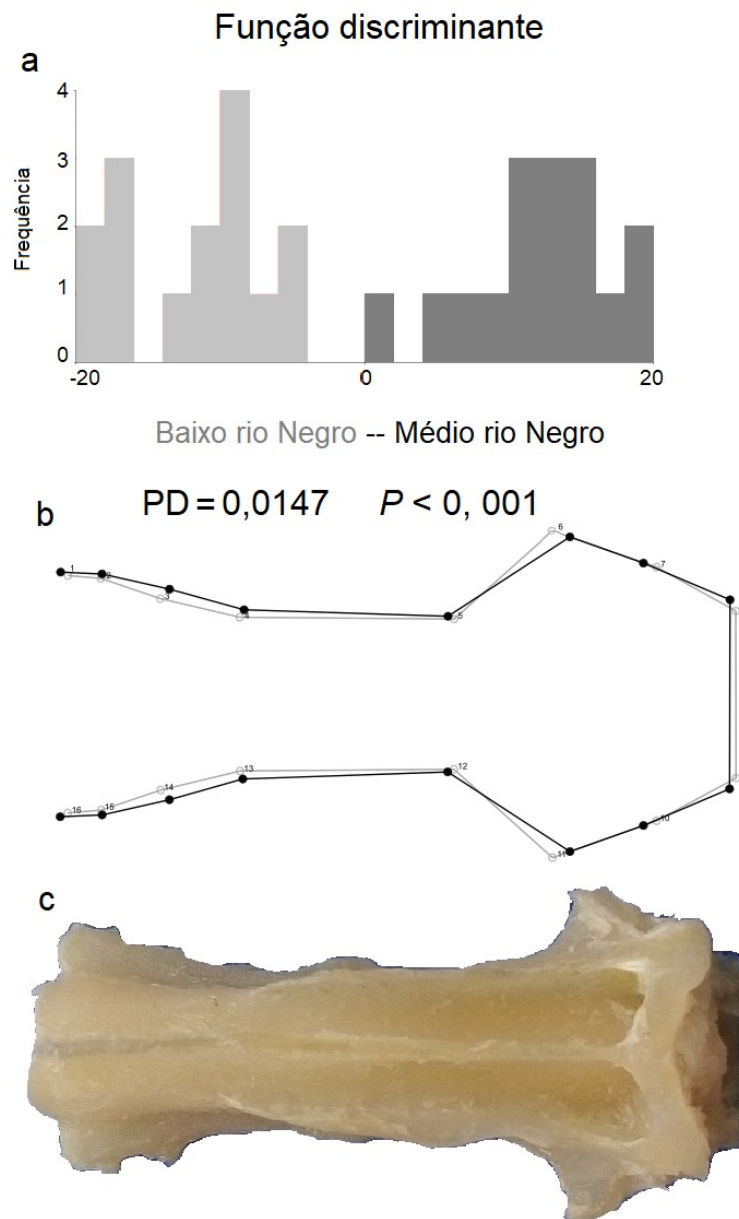


Figura 13: Variação de forma da cartilagem sinarqual de *P. wallacei* entre médio e baixo rio Negro. Em (a) o histograma da função discriminante mostra grande separação entre os grupos sem sobreposição. A magnitude da diferença é expressa em unidade de distância de Procrustes (PD) seguido do valor de P para o teste de Monte Carlo. Em (b) o wireframe representa diferenças da forma dos grupos. E em (c) está representada anatomicamente a cartilagem sinarqual.

Diversidade genética da arraia Cururu

Durante o controle de qualidade das leituras duas amostras da localidade Coibi precisaram ser removidas devido a grande quantidade de missing data (dados ausentes). Foram identificados nesse estudo 2089 loci com um SNP cada. Todas as populações apresentaram baixo índice de consanguinidade (*Fis*) (Tabela 4). A heterozigosidade esperada (*He*) foi menor em Irauaú e maior em Coibi. Já a Heterozigosidade observada (*Ho*) foi menor em Cuiuni e maior em Coibi. Enquanto o número de migrantes (*Nm*) entre as populações (Tabela 5) foi maior entre Coibi e Irauaú, e menor entre Tupé e Cubá.

Tabela 4: Índices de diversidade genética estimados no Arlequim.

Local	N	Ho - He	Fis	Substituição
Coibi	3	0,48545 - 0,45251	-0,09539	951
Cuiuni	5	0,36198 - 0,36823	0,04551	1189
Cubá	5	0,38095 - 0,37273	-0,00720	1092
Irauaú	5	0,36418 - 0,36677	0,03206	1234
Tupé	5	0,37685 - 0,38231	0,00082	838

Nota: N=Número de amostras; H_o = Heterozigosidade observada; H_e = Heterozigosidade esperada; Fis= Índice de consanguinidade.

Tabela 5: Número de migrantes entre populações.

Local	Coibi	Cuiuni	Cubá	Irauaú
Coibi	0	--	--	--
Cuiuni	12,536	0	--	--
Cubá	9,443	14,805	0	--
Irauaú	51,685	12,015	7,204	0
Tupé	2,224	2,222	1,845	2,171

A AMOVA mostrou que existe diferença genética entre os grupos dos locais amostrados (F_{st} 0,098 e $P < 0,001$). O índice de diferença genética entre pares de populações (F_{st}) foi menor em Coibi – Irauaú e maior em Tupé – Cubá. A maioria das distâncias genéticas (estruturação) entre populações foi significativa, com exceção de Coibi – Irauaú (margem esquerda) (tabela 6). O teste de Mantel mostrou que os processos de isolamento por distância podem ser a causa dos padrões das diferenças genéticas encontradas no conjunto abrangendo o Tupé ($r = 0,9301$ e $P = 0,040$). No entanto, utilizando-se apenas as amostras do

médio rio Negro o teste de Mantel mostrou correlação desprezível ($r = 0,1302$) não significativa ($P = 0,360$).

Tabela 6: Valores de F_{st} e respectiva significância (P) entre pares de localidades.

Local	Coibi	Cuiuni	Cubá	Irauaú
Coibi	0	--	--	--
Cuiuni	0,0485 - 0,034*	0	--	--
Cubá	0,0506 - < 0,001*	0,0350 - 0,018*	0	--
Irauaú	0,0099 - 0,207	0,0422 - 0,009*	0,0646 - 0,009*	0
Tupé	0,1835 - 0,018*	0,1834 - < 0,001*	0,2133 - 0,018*	0,1876 - 0,009*

Nota: Os asteriscos indicam $P < 0,05$.

A análise Bayesiana mostrou probabilidade posterior de ocorrência de dois grupos biológicos (Figura 14a), Coibi, Cuiuni, Cubá, e Irauaú pertencem ao mesmo grupo ($q > 0,99$) no médio rio Negro, nas imediações de Barcelos. Enquanto o Tupé compõe o segundo grupo no baixo rio Negro, nos arredores de Manaus. Na mesma análise, porém, sem o grupo do Tupé foi identificado quatro grupos biológicos ($q > 0,98$), Cuiuni (cor azul), Cubá (azul escuro), Coibi (verde) e Irauaú (laranja) com grande mistura entre os dois últimos (Figura 14b).

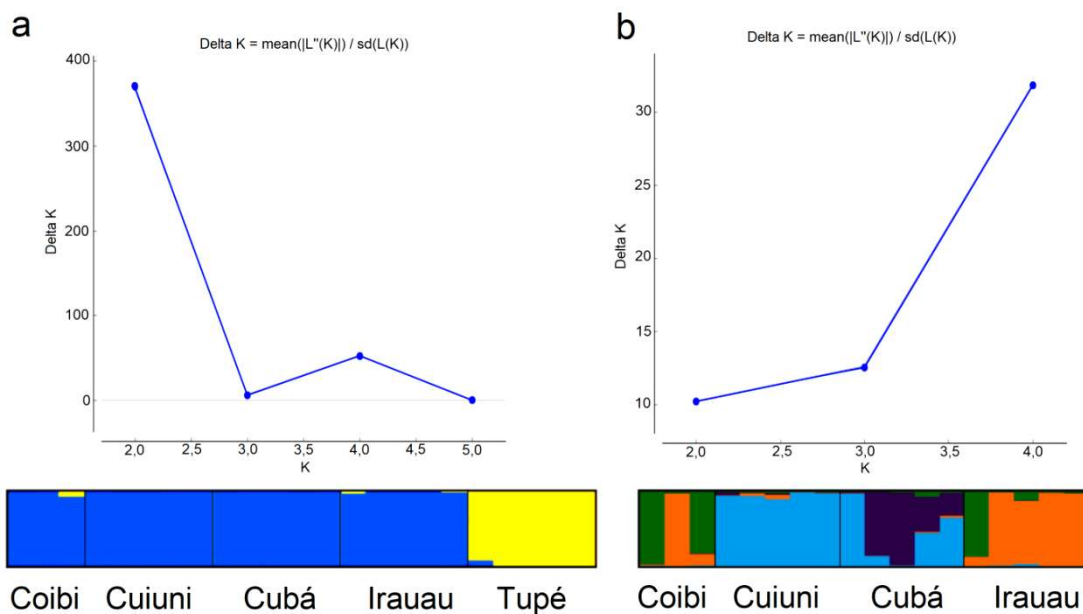


Figura 14: Estrutura populacional determinada no programa STRUCTURE mediante inferência Bayesiana. Foram analisados 2089 loci com um SNP cada de 23 indivíduos de cinco localidades do médio e do baixo rio Negro. Em (a) o gráfico do método de Evanno e o histograma de mistura ilustram os possíveis grupos com o Tupé. Em (b) é demonstrada a estruturação populacional sem o Tupé.

As análises de agrupamento (UPGMA) entre localidades a partir das distâncias genéticas (F_{st}) (Figura 15a-b) corroboram a estruturação hierárquica demonstrada pelo STRUCTURE. Por fim, o Teste de Mantel não mostrou correlação entre as matrizes de morfologia e genética ($r < 0,2$ e $P > 0,5$), sugerindo diferentes padrões de distribuição da diversidade entre as abordagens.

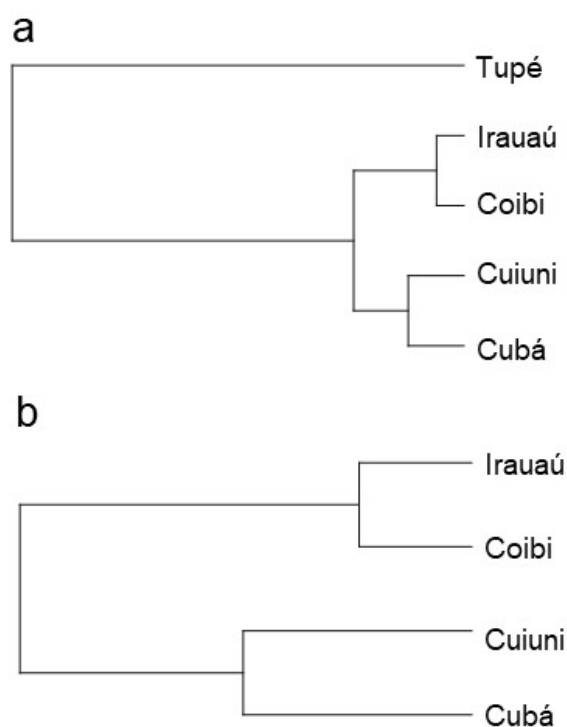


Figura 15: Dendograma das estruturas genéticas. Em (a) é demonstrada uma estruturação com o Tupé apresentando-se como grupo externo ao médio rio Negro. E em (b) estrutura das populações entre margens do médio rio Negro.

DISCUSSÃO

Aqui investigamos pela primeira vez os padrões da diversidade morfológica e genética de arraia Cururu no médio e baixo rio Negro. Não encontramos diferenciação de forma na cintura escapular entre os sexos, porém essa diferença já foi observada por meio de morfometria geométrica em outros grupos como espécies da família Rajidae (Martinez *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2019). Além disso, embora haja diferenças morfológicas nas cartilagens, escapular e sinarcual essas variações não coincidem com os padrões esperados de isolamento por distância entre as localidades. Os dados genéticos por sua vez apresentaram padrões bem

definidos de estrutura, com maior expressividade entre o médio e o baixo curso do rio, além de diversidade genética elevada na região à montante. Também foi observado um baixo número de migrantes entre os grupos do médio e do baixo rio Negro, com valores mais elevados entre localidades situadas à mesma margem. Embora estruturadas, o fluxo genético dentro das populações parece ocorrer ao acaso como visto no coeficiente de endogamia.

Variabilidade intraespecífica de arraia Cururu

O fato de as variações morfológicas da cintura peitoral da arraia Cururu não seguirem um padrão de isolamento por distância entre as localidades, ou um padrão explicável pela separação entre margens, sugere que outros fatores além do fluxo gênico estejam atuando sobre a morfologia desses animais. Os estudos mais recentes envolvendo morfometria geométrica da cintura peitoral de *Batoidea* atribuem as explicações de variações significativas aos contextos filogenéticos (Claeson, 2011; Flanklin *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2016; Orlando *et al.*, 2015) e, as diferenças intraespecíficas geralmente associadas ao dimorfismo sexual ou a aspectos ontogenéticos (Matinez *et al.*, 2019). No entanto, é possível que as variações na cintura peitoral encontradas na arraia Cururu sejam associadas a fatores como exploração de habitat e às relações que as cartilagens analisadas possam ter com outras estruturas.

Fatores ambientais são frequentemente responsáveis por variações fenotípicas em espécies neotropicais. Geralmente esses fatores correspondem a variações físico-químicas das águas como as diferenças intraespecíficas na forma do corpo em peixes da espécie *Hemigrammus coeruleus* Durbin, 1908 na sub-bacia do rio Unini, afluente do rio Negro (Lazzarotto *et al.*, 2017), ou outras respostas à sazonalidade como a grande variação na profundidade do corpo da espécie *Cichla temensis* Humboldt, 1821 causada por variações no estágio reprodutivo (Reiss & Grothues, 2015).

O polimorfismo da cintura escapular da arraia Cururu encontrado aqui parece estar mais associado a fatores físicos como o tipo de substrato existente nos ambientes de ocorrência da espécie. Uma vez que a bacia do rio Negro é notoriamente heterogênea em sua região periférica e de seus afluentes (Duncan & Fernandes, 2010; Latrubesse, 2015). Assim, os igapós e igarapés onde vive a arraia Cururu podem variar de areno-argiloso a ambientes com serapilheira (Carvalho *et al.*, 2016). Os ambientes do Tupé, por exemplo, aparentam ser muito mais argilosos, lamacentos, e com áreas de campinarana (Belém, observação pessoal).

Em contraste com outros locais como o lago do Cubá, que possui ambientes repletos de galhos e troncos submersos (Belém, observação pessoal) que podem impor maior dificuldade de movimentação. Isso justificaria a cartilagem sinarcual mais curta e o cômulo escapular mais robusto, promovendo diferenças na forma do corpo para transitar entre os entulhos do substrato. Coibi e Irauaú também apresentam grande intensidade de gralhadadas submersas, esse caráter comum de habitat pode estar associado a pouca variação morfológica da cartilagem escapular entre essas localidades.

Enquanto isso, o polimorfismo da cartilagem sinarcual, (mais variado do que na cartilagem escapular) por sua vez, pode ser associado além da necessidade de adaptação ao substrato, a interferência ou influência de outras estruturas anatômicas a qual esteja associada, como por exemplo, o crânio, os ceratobranquais, o escapulocoracoide e as vértebras intersinarcuais. (Afonso & Galo, 2001; Bini-Júnior *et al.*, 2012; Stepanek & Kriwet, 2012; 2015). Nesse caso, análises morfológicas de outras estruturas deveriam ser realizadas e correlacionadas com a morfologia da cartilagem sinarcual para responder melhor essa questão. As variações morfológicas observadas em *P. wallacei* podem também ser associadas como o fato de que espécies com menor mobilidade podem responder de maneira local às pressões seletivas ambientais (Andres *et al.*, 2019; Hällfors *et al.*, 2016).

Em contraste com a diversidade morfológica, os parâmetros genéticos de *P. wallacei* apresentam padrões aparentemente bem definidos, com estruturação genética com fluxo gênico restrito, apesar de ausência de amostragem na região a jusante do Irauaú. A estrutura genética demonstra ser hierárquica, isto é, uma mais intensa entre áreas (médio e baixo curso do rio), associada ao isolamento por distância como indicado pelo teste de Mantel quando incluídas todas as amostras. E outra menor entre as margens ao remover-se os animais do Tupé, nesse caso, de acordo com o teste de Mantel o isolamento por distância deixa de ser fator determinante da diversidade genética observada.

Esse padrão é ainda mais evidenciado pelas análises realizadas no STRUCTURE que com o Tupé identificou apenas dois grupos biológicos. Ao remover as amostras do Tupé o programa passou a reconhecer quatro populações. Isso acontece devido ao software reconhecer as estruturas genéticas mais intensas (Pritchard *et al.*, 2000). O aspecto hierárquico de estrutura genética sugerida por análises no ARLEQUIM e no STRUCTURE é corroborado por análises de cluster usando-se as distâncias genéticas (F_{st}) com e sem as amostras do Tupé. No entanto, uma amostragem abrangendo desde a área da foz do rio Branco até as imediações do Tupé é necessária para melhor esclarecer se o padrão observado nesse estudo é causado

por eventos de isolamento por distância, ou por algum outro evento de isolamento histórico resultado de eventos geológicos que possam ter modificado as áreas de drenagens da bacia do rio Negro ao longo do tempo, como por exemplo, eventos de capturas fluviais (Filho *et al.*, 2005).

A diversidade genética na arraia Cururu é maior a montante (Coibi). A diminuição da diversidade geralmente ocorre o longo de rotas de colonização nas populações fundadoras (Altermatt, 2013; Taberlet *et al.*, 1998), o que sugere que *P. wallacei* tenha se dispersado e colonizado novos habitats em direção à foz do rio Negro.

Efeito de subsidências na região da Amazônia central causada por eventos orogênicos em detrimento do soerguimento dos Andes, culminando com a quebra do arco de Purus promovendo conexão entre as porções do rio Negro, anteriormente isoladas (Lundberget *et al.*, 1998), delineariam o cenário em que o ancestral de *P. wallacei* possivelmente iniciou a colonização do baixo curso do rio Negro. Esse movimento de dispersão em detrimento de eventos morfogeológicos corrobora o cenário histórico biogeográfico do grupo atualmente em consenso em que os potomotrygonídeos irradiaram para as demais bacias da América do Sul (Carvalho *et al.*, 2004; Lovejoy *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2010).

O baixo coeficiente de consanguinidade (Fis) observado no grupo do Tupé (apesar de ser o grupo mais geograficamente distante e consideravelmente distinto morfológica e geneticamente) sugere que essa população está interagindo com populações vizinhas não amostradas nesse estudo, ou se trata de uma população panmítica (Keller & Waller, 2002). No entanto, é necessário investigar se a geografia da região demanda alta densidade demográfica. De qualquer modo, o estabelecimento de populações estáveis com menor diversidade genética em relação às populações a montante corrobora a colonização rio abaixo como explicação dos padrões de diversidade genética encontrados nesse estudo.

Outra explicação é que essa população possua diferentes origens, nesse caso, deve-se averiguar o histórico de solturas de exemplares produtos da pesca ornamental de Barcelos realizadas indiscriminadamente ao longo de décadas nas imediações da cidade de Manaus. Uma amostragem mais abrangente incluindo áreas do alto rio Negro e o arquipélago de Anavilhanas (regiões não amostradas nesse estudo) com análises moleculares, de morfologia do disco e estimativas de captura por unidade de esforço de pesca poderia esclarecer o real tamanho, e dinâmica populacional de *P. wallacei*.

CONCLUSÃO

Abordagens morfológicas mostraram que *P. wallacei* possui diferenças de forma intraespecíficas nas cartilagens, escapular e sinarcual entre localidades (igapós e igarapés), margens, e áreas do rio, que parecem estar associadas ao tipo de substrato de suas áreas de ocorrência. Não foram observadas diferenças morfológicas entre os sexos. A análise genômica identificou estruturação genética hierárquica da espécie, a primeira com maior expressividade e possivelmente associada a eventos de isolamento por distância entre médio e baixo rio Negro, e uma subestrutura no médio curso, influenciada pela pouca mobilidade entre margens opostas, causada provavelmente pelo fluxo do rio e fidelidade de habitat.

CONSIDERAÇÕES

A manutenção do fluxo gênico entre as populações estruturadas é um caráter importante em caso da necessidade de recuperação da espécie. A variabilidade morfológica e genética observadas nas populações de arraia “Cururu” indica que mais estudos devem ser realizados em outras áreas do rio Negro para ampliar o conhecimento sobre sua distribuição. Embora a espécie não esteja atualmente sob forte ameaça antrópica, seu status de conservação deve ser constantemente monitorado. Elaboraões de planos de manejo ou quaisquer outros meios de normatização de possíveis futuras exploraões do grupo devem considerar sua dinâmica populacional para sua manutenção.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Morfologia Funcional pelo suporte nas atividades de campo.

Ao Laboratório de Evolução e Genética Animal pelo suporte nas análises genômicas.

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia por disponibilizar o equipamento **LX-60 FAXITRON** para realização das radiografias.

REFERÊNCIAS

Afonso, A. F., & Gallo, V. (2001). Estudo do escápulo-coracóide e da cartilagem sinarcual

- cérvico-torácica de *Rhinoptera brasiliensis* Müller & Henle e *Rhinoptera bonasus* (Mitchill) Elasmobranchii, Rhinopteridae. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18, 319–331.
- Altermatt, F. (2013). Diversity in riverine metacommunities: a network perspective. *Aquatic Ecology*, 47, 365–377.
- Andres, K. J., Chien, H., & Knouft, J. H. (2019). Hydrology induces intraspecific variation in freshwater fish morphology under contemporary and future climate scenarios. *Science of The Total Environment*, 671, 421–430.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., ... Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS one*, 3, e3376.
- Bernatchez, S., Laporte, M., Perrier, C., Sirois, P., & Bernatchez, L. (2016). Investigating genomic and phenotypic parallelism between piscivorous and planktivorous lake trout (*Salvelinus namaycush*) ecotypes by means of RAD seq and morphometrics analyses. *Molecular Ecology*, 25, 4773–4792.
- Beyene, Y., Botha, A.-M., & Myburg, A. A. (2005). A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. *African Journal of Biotechnology*, 4, 586–595.
- Bini Junior, Í. R., Dos Santos, C. M. H., & Fazzano Gadig, O. B. (2015). Anatomical Description of Scapulocoracoid and Gill Arches of *Benthobatis krefftii*. *Universitas Scientiarum*, 20, 305–312.
- Bookstein, F. L. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics. *Advances in morphometrics* (pp. 131–151). Springer.
- Borsa, P., Arlyza, I. S., Laporte, M., & Berrebi, P. (2012). Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438, 32–40.
- Capretz Batista da Silva, J. P., & Silva Loboda, T. (2019). *Potamotrygon marquesi*, a new species of neotropical freshwater stingray (Potamotrygonidae) from the Brazilian Amazon Basin. *Journal of fish biology*, 95, 594–612.
- CARVALHO M. R.; ROSA R. S., G. D. A. (2016). A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon. *Zootaxa*, 4107.
- Carvalho, M. R., Maisey, J. G., & Grande, L. (2004). Freshwater stingrays of the Green River Formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2004, 1–136.
- Charvet-Almeida, P., Araújo, M. L. G. de, & Almeida, M. P. de. (2005). Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 165–171.
- Claeson, K. M. (2011). The synarcual cartilage of batoids with emphasis on the synarcual of

- Rajidae. *Journal of Morphology*, 272, 1444–1463.
- Cruz, V. P., Vera, M., Pardo, B. G., Taggart, J., Martinez, P., Oliveira, C., & Foresti, F. (2017). Identification and validation of single nucleotide polymorphisms as tools to detect hybridization and population structure in freshwater stingrays. *Molecular ecology resources*, 17, 550–556.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*.
- Dulvy, N. K., Pardo, S. A., Simpfendorfer, C. A., & Carlson, J. K. (2014). Diagnosing the dangerous demography of manta rays using life history theory. *PeerJ*, 2, e400.
- Duncan, W. P., & Fernandes, M. N. (2010). Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5, 454–464.
- Duncan, W. P., Inomata, S. O., & Fernandes, M. N. (2010). Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 5, XIII–XXII.
- Duncan, W. P., Shibuya, A., de Araújo, M. L. G., & Zuanon, J. (2016). BIOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE *Potamotrygon wallacei* (CARVALHO, ROSA E ARAÚJO, 2016) NA BACIA DO RIO NEGRO, AMAZÔNIA CENTRAL, BRASIL. *XV. RAYAS DE AGUA DULCE (POTAMOTRYGONIDAE) DE SURAMÉRICA*, 289.
- Earl, Dent A., VonHold, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10, 564–567.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Farrugia, T. J., Goldman, K. J., Tribuzio, C., & Seitz, A. C. (2016). First use of satellite tags to examine movement and habitat use of big skates *Beringraja binoculata* in the Gulf of Alaska. *Marine Ecology Progress Series*, 556, 209–221.
- Franklin, O., Palmer, C., & Dyke, G. (2014). Pectoral fin morphology of batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea): explaining phylogenetic variation with geometric morphometrics. *Journal of morphology*, 275, 1173–1186.
- Frisk, M. G. (2010). Life history strategies of batoids. *Sharks and their Relatives. II. Biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, Florida

(pp. 283–318).

- Gauthier, J., Mouden, C., Suchan, T., Alvarez, N., Arrigo, N., Riou, C., Peterlongo, P. (2020). DiscoSnp-RAD: de novo detection of small variants for RAD-Seq population genomics. *PeerJ*.
- Grassi-Sella, M. L., Garófalo, C. A., & Francoy, T. M. (2018). Morphological similarity of widely separated populations of two Euglossini (Hymenoptera; Apidae) species based on geometric morphometrics of wings. *Apidologie*, *49*, 151–161.
- Hällfors, M. H., Liao, J., Dzurisin, J., Grundel, R., Hyvärinen, M., Towle, K., Hellmann, J. J. (2016). Addressing potential local adaptation in species distribution models: implications for conservation under climate change. *Ecological Applications*, *26*, 1154–1169.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, *4*, 9.
- Henriques, D., Chávez-Galarza, J., SG Teixeira, J., Ferreira, H., J Neves, C., Francoy, T. M., & Pinto, M. A. (2020). Wing Geometric Morphometrics of Workers and Drones and Single Nucleotide Polymorphisms Provide Similar Genetic Structure in the Iberian Honey Bee (*Apis mellifera iberiensis*). *Insects*, *11*, 89.
- Keller, L. F., & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in ecology & evolution*, *17*, 230–241.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, *11*, 353–357.
- Klingenberg, C. P. (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development genes and evolution*, *226*, 113–137.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, *15*, 1179–1191.
- L. Bookstein, F. (1983). The geometry of craniofacial growth invariants. *American Journal of Orthodontics*, *83*, 221–234.
- Latrubesse, E. M., & Franzinelli, E. (2005). The late Quaternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: implications for island and floodplain formation in large anabranching tropical systems. *Geomorphology*, *70*, 372–397.
- Latrubesse, E. M., & Stevaux, J. C. (2015). The anavilhanas and mariuá archipelagos: fluvial wonders from the Negro River, Amazon Basin. *Landscapes and Landforms of Brazil*, 157–169.
- Lazzarotto, H., Barros, T., Louvise, J., & Caramaschi, É. P. (2017). Morphological variation among populations of *Hemigrammus coeruleus* (Characiformes: Characidae) in a Negro River tributary, Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, *15*.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*, 2078–2079.
- Lighten, J., Incarnato, D., Ward, B. J., van Oosterhout, C., Bradbury, I., Hanson, M., &

- Bentzen, P. (2016). Adaptive phenotypic response to climate enabled by epigenetics in a K-strategy species, the fish *Leucoraja ocellata* (Rajidae). *Royal Society Open Science*, *3*, 160299.
- Lovejoy, N. R., Bermingham, E., & Martin, A. P. (1998). Marine incursion into South America. *Nature*, *396*, 421–422.
- Martinez, C. M., Rohlf, F. J., & Frisk, M. G. (2016). Re-evaluation of batoid pectoral morphology reveals novel patterns of diversity among major lineages. *Journal of Morphology*, *277*, 482–493.
- Martinez, C. M., Kao, B. H., Sparks, J. S., & Wainwright, P. C. (2019). Pectoral Dimorphism Is a Pervasive Feature of Skate Diversity and Offers Insight into their Evolution. *Integrative Organismal Biology*, *1*, obz012.
- Martinez Freire, G. (2015). Idade, crescimento e mortalidade natural da arraia-cururu (*Potamotrygon wallacei*) do médio Rio Negro (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Amazonas. <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6858>.
- Monteiro, L. R., & Reis, S. F. dos. (1999). *Princípios de morfometria geométrica*. Ribeirão Preto: Holos.
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Latif-Nejad, S., & Nasri, M. (2020). The morphological study of transcaspian marinka (*Schizothorax pelzami*) in Harirud and Dasht-e Kavir basins using the geometric morphometric technique. *Nova Biologica Reperta*, *7*, 185–191.
- Oliveira, A. T. (2008). Caracterização hematológica de *Potamotrygon* cf. *histrrix*: subsídios ao manejo e conservação da espécie (Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus). Obtido em: <https://www.bionorte.org.br/bionorte/ppg-numeros-producao.html?idp=52775>.
- Orlando, P., González-Castro, M., & Mabragaña, E. (2015). New insights to discriminate between *Sympterygia acuta* Garman 1877 and *Sympterygia bonapartii* Müller & Henle, 1841 (Rajidae) of the Southwest Atlantic Ocean: on the use of geometric morphometrics and spinulation patterns. *Journal of Applied Ichthyology*, *31*, 381–389.
- Pandey, S. K., Das, A., Rai, P., & Dasgupta, T. (2015). Morphological and genetic diversity assessment of sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions differing in origin. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *21*, 519–529.
- Petean, F. F., Naylor, G. J. P., & Lima, S. M. Q. (2020). Integrative taxonomy identifies a new stingray species of the genus *Hypanus* Rafinesque, 1818 (Dasyatidae, Myliobatiformes), from the Tropical Southwestern Atlantic. *Journal of Fish Biology*.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, *7*, e37135.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945–959.
- Quijada, C. C. D., Charvet-Almeida, P., & Rosa, R. S. (2010). Biology of the South American potamotrygonid stingrays. In J. C. Carrier, J. A. Musick, & M. R. Heithaus (Eds.),

Sharks and their relatives II (pp. 249–289). Boca Raton: CRC Press.

- Quintela, F. M., Fornel, R., & Freitas, T. R. O. (2016). Geographic variation in skull shape of the water rat *Scapteromys tumidus* (Cricetidae, Sigmodontinae): isolation-by-distance plus environmental and geographic barrier effects? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 451–466.
- Reiss, P., & Grothues, T. M. (2015). Geometric morphometric analysis of cyclical body shape changes in color pattern variants of *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae) demonstrates reproductive energy allocation. *Neotropical Ichthyology*, 13, 103–112.
- Rohlf, F. J. (2010). tpsDig2: Digitize Landmarks & Outlines from Image Files, Scanner or Video. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsdig2w32.exe/> (acessado em 5 de dezembro de 2018).
- Rohlf, F. J. (2012). tpsUtil: tps File Utility Program. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsutilw32.exe/> (acessado em 5 de dezembro de 2018).
- Sequeira, V., Rodríguez-Mendoza, R., Neves, A., Paiva, R., Saborido-Rey, F., & Gordo, L. S. (2011). Using body geometric morphometrics to identify bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) populations in the Northeastern Atlantic. *Hydrobiologia*, 669, 133–141.
- Stepanek, R., & Kriwet, J. (2012). Contributions to the skeletal anatomy of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Myliobatiformes): 1. Morphology of male *Potamotrygon motoro* from South America. *Zoosystematics and Evolution*, 88, 145–158.
- Stepanek, R., & Kriwet, J. (2015). Comparative morphology of the juvenile skeleton in freshwater stingrays with special focus on *Paratrygon aiereba* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 255, 7–24.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., WUST-SAUCY, A., & COSSON, J. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7, 453–464.
- Tricart, J. L. F. (1977). Types de lits fluviaux en Amazonie brésilienne. *Annales de géographie*, 1–54.
- Valentim, F. C. de S., Porto, J. I. R., & Feldberg, E. (2019). Chromosomal characterization of Amazonian freshwater stingrays with evidence for new karyomorphs and XX/XY sex chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 42, 578–593.
- Vargas-Ramírez, M., Caballero, S., Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Amaya, L., Martínez, J. G., Hrbek, T. (2020). Genomic analyses reveal two species of the matamata (Testudines: Chelidae: *Chelus* spp.) and clarify their phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106823.
- Wearmouth, V. J., & Sims, D. W. (2009). Movement and behaviour patterns of the critically endangered common skate *Dipturus batis* revealed by electronic tagging. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380, 77–87.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press.