

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LARISSA EMILY SANTOS DA SILVA

**Desenvolvimento de marcadores SNPs e relação de parentesco em
Potamotrygon wallacei (raia cururu) usando sequenciamento de próxima
geração**

MANAUS-AM

2023

LARISSA EMILY SANTOS DA SILVA

**Desenvolvimento de marcadores SNPs e relação de parentesco em
Potamotrygon wallacei (raia cururu) usando sequenciamento de próxima
geração**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos animais da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Izeni Pires Farias

Coorientador: Fábio de Lima Muniz

MANAUS-AM

2023

Ficha Catalográfica

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

S586d Silva, Larissa Emily Santos da
Desenvolvimento de marcadores SNPs e relação de parentesco em *Potamotrygon wallacei* (raia cururu) usando sequenciamento de próxima geração / Larissa Emily Santos da Silva . 2023
33 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Izeni Pires Farias
Coorientador: Fábio de Lima Muniz
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Raia cururu. 2. Sistema de acasalamento. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Diversidade genética. 5. Biologia reprodutiva.
I. Farias, Izeni Pires. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

LARISSA EMILY SANTOS DA SILVA

**Desenvolvimento de marcadores SNPs e relação de parentesco em
Potamotrygon wallacei (raia cururu) usando sequenciamento de
próxima geração**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos animais da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

APROVADA: 11/08/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof(a). Dr(a). Izeni Pires Farias

(Presidente/ Orientadora)



Prof(a). Dr(a). Maria das Neves Viana

(Membro)

Prof(a). Dr(a). Doriane Picanço Rodrigues

(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida e amada filha Laura Maria, com quem quero aproveitar mais a vida.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Dr. Fábio de Lima Muniz, que com toda paciência estava sempre disposto a tirar dúvidas e fazer sugestões e contribuições textuais;

Ao Msc. Pedro Senna, que por dias disponibilizou tempo nas rotinas laboratoriais e todo suporte técnico;

Ao Dr. Tomas Hrbek e ao Msc. Érico Polo pelo suporte técnico laboratorial desse trabalho em conjunto com os demais colaboradores;

À toda equipe do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), em especial ao Adriano, Sarah Ventura e Sandra Damasceno;

Ao Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan que cedeu as amostras para a realização deste estudo;

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

E aos meus familiares, pela compreensão devido inúmeras ausências.

RESUMO

A raia *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), conhecida popularmente como “cururu”, está entre as menores arraias de água doce conhecidas. O tamanho, forma corporal e a presença do cláster parecem ser as únicas características que expressam dimorfismo sexual. Esta espécie habita as águas escuras dos igapós e igarapés no estado do Amazonas, sendo endêmica da bacia do Rio Negro. Sua gestação é vivípara e pode se estender por três a seis meses, com maturidade sexual se iniciando a partir dos dois ou três anos de idade, apresenta baixo número de prole e longevidade alta. O conhecimento da biologia reprodutiva da raia cururu é limitado quanto ao parâmetro do sistema de acasalamento que é atualmente desconhecido. Este trabalho teve como objetivo, desenvolver marcadores moleculares do tipo SNP específicos para *Potamotrygon wallacei* utilizando sequenciamento de próxima geração e testar paternidade múltipla na espécie. As amostras utilizadas no trabalho foram de seis grupos familiares, em sua maioria compostos por provável mãe e prováveis filhotes, provenientes da localidade de Barcelos (Lago do Cubá), no Médio Rio Negro. As extrações de DNA dos tecidos dos indivíduos foram realizadas pelo método de CTAB 2% (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). A biblioteca genômica foi processada no sequenciador de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) Illumina, usando protocolo desenvolvido no laboratório. Os índices de diversidade genética foram inferidos no programa Arlequin e as análises de relação de parentesco foram feitas no software NGSRelate. A obtenção dos 1.664 marcadores SNPs via ddRAD usando protocolo caseiro para o sequenciador de próxima geração mostrou ser excelente para a obtenção dos níveis de diversidade genética para *P. wallacei*. Os resultados sobre análise de parentesco forneceram novos insights sobre a biologia reprodutiva da arraia cururu apresentando dois casos de sistemas de acasalamento, evidenciando um com indicativo de monogamia e outro com indicativo de contribuição extra-par.

Palavras-chave: Raia cururu; sistema de acasalamento; polimorfismo de nucleotídeo único; diversidade genética, biologia reprodutiva.

ABSTRACT

The stingray *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa and Araújo, 2016), popularly known as “cururu”, is among the smallest known freshwater stingrays. Size, body shape and the presence of the clasper seem to be the only characteristics that express sexual dimorphism. This species inhabits the dark waters of the igapós and igarapés in the state of Amazonas, being endemic to the Rio Negro basin. Its gestation is viviparous and can last for three to six months, with sexual maturity starting from two or three years of age, it has a low number of offspring and high longevity. Knowledge of the reproductive biology of the cururu ray is limited regarding the parameter of the mating system, which is currently unknown. This work aimed to develop molecular markers of the specific SNP for *Potamotrygon wallacei* using next generation sequencing and to test multiple paternity in the species. The sample used in the work consisted of six family groups, mostly composed of mothers and probable offspring, from the town of Barcelos (Lago do Cuba), on the Middle Rio Negro. DNA extractions from the tissues of the individuals were performed using the 2% CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) method. The genomic library was processed in the Next Generation Sequencing (NGS) Illumina, using protocol developed in the laboratory. Genetic diversity indices were impaired using the Arlequin program and parentage analyzes were performed using the NGSRelate software. A total of 1664 SNPs markers were obtained via ddRAD using an in-house protocol for the next generation sequencer and proved to be excellent to estimate the levels of genetic diversity for *P. wallacei*. The results on kinship analysis provided new insights into the reproductive biology of cururu stingray showing two cases of mating systems, one with an indication of monogamy and the other with an indication of extra-pair contribution.

Key-words: Cururu ray; mating system; single nucleotide polymorphism; genetic diversity, reproductive biology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Grupos familiares de prováveis mães e prováveis filhotes de <i>Potamotrygon wallacei</i>	17
Tabela 2: Número de loci e número de loci polimórficos por família	21
Tabela 3: Índice médio de Diversidade Genética de <i>Potamotrygon wallacei</i> estimados no Arlequin de todos os grupos	21
Tabela 4: Índice de Diversidade Genética de <i>Potamotrygon wallacei</i> estimados no Arlequin por família	21
Tabela 5: Número de SNPs por pareamento entre indivíduos separados por família.	24

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	16
Objetivo Geral	16
Objetivos Específicos	16
JUSTIFICATIVA.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

INTRODUÇÃO

As raias da subfamília Potamotrygoninae compõem o único clado de elasmobrânquios (peixes cartilaginosos da subclasse Elasmobranchii) que habita exclusivamente ambientes de água doce (Fontenelle et al., 2021; Torres et al., 2022). Atualmente, quatro gêneros são reconhecidos para esta subfamília: *Heliotrygon*, *Plesiotrygon*, *Paratrygon* e *Potamotrygon*, de modo que o gênero *Potamotrygon* comporta a maior parte da diversidade do grupo, com 34 espécies válidas (Ferreira, 2023).

Assim como diversos outros elasmobrânquios, as raias de ambientes dulcícolas têm baixa fecundidade, maturidade tardia, longa vida útil e fecundação interna, tais características as tornam vulneráveis à superexploração e às mudanças ambientais (Charvet-Almeida et al., 2005; Fontenelle et al., 2021). Apresentam desenvolvimento vivíparo, com gestação que se estende pelo período de três a seis meses e, dependendo da espécie, cuidado parental (Carvalho et al., 2016).

Os padrões de cores chamativos e distintos são características de algumas espécies, o que acaba tornando-as alvo para o mercado da pesca ornamental (Lucifora, 2022). Sua exploração insustentável é uma das principais ameaças para o grupo (Rosa et al., 2010; Fontenelle et al., 2021). Outros tipos de pesca ameaçam as arraias de água doce na América do Sul, incluindo pesca para consumo como alimento e mutilação, podendo levar à extinção local (“pesca negativa”). Como habitam ecossistemas de água doce, estão expostos a outros impactos, tais como fragmentação (barragens) e degradação (escoamento de produtos químicos agrícolas, assoreamento e mineração) de habitats (Fontenelle et al.; 2021). Até o presente momento pouco se sabe sobre a história natural das arraias de água doce, e isso dificulta a gestão da pesca e conservação do grupo.

Os Potamotrygoninae originaram-se de um ancestral marinho na América do Sul em algum momento durante o final do Cretáceo ou Mioceno inferior e médio (Fontenelle et al., 2021). Perderam a capacidade de concentrar uréia no sangue e adquiriram uma glândula retal vestigial, o que as tornou fisiologicamente restritas ao ambiente de água doce (Rosa et al., 2010). Com isso, irradiaram extensivamente em bacias hidrográficas tropicais e subtropicais, principalmente a leste dos Andes, diversificando em 37 espécies descritas e várias ainda não descritas (Lucifora, 2022).

Membro da subfamília Potamotrygoninae, a espécie *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) é conhecida desde a viagem de Alfred Russel Wallace a Amazônia em meados do século XIX (1848-1852). Wallace fez uma breve descrição morfológica da espécie, mas infelizmente, todos os seus materiais biológicos foram perdidos após o naufrágio do navio Helen durante seu retorno à Inglaterra (Carvalho et al., 2016).

Apesar da espécie ser comum na natureza e também no mundo do comércio de aquários, sendo ainda uma das primeiras espécies de Potamotrygoninae a ser ilustrada (Figura 1) por Wallace, a nova espécie teve seu *status* taxonômico negligenciado por um longo período de tempo. *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) como atualmente é descrita em homenagem a Alfred Wallace, foi retratada várias vezes em livros e revistas de peixes de aquário, sendo citada como *Potamotrygon sp.* (Géry, 1976), ou erroneamente identificada como *P. histrix* (Müller e Henle 1836), *P. laticeps* (Garman, 1913), *P. motoro* (Müller e Henle, 1841) ou *Disceus thayeri* (Garman, 1913) (Carvalho et al., 2016).

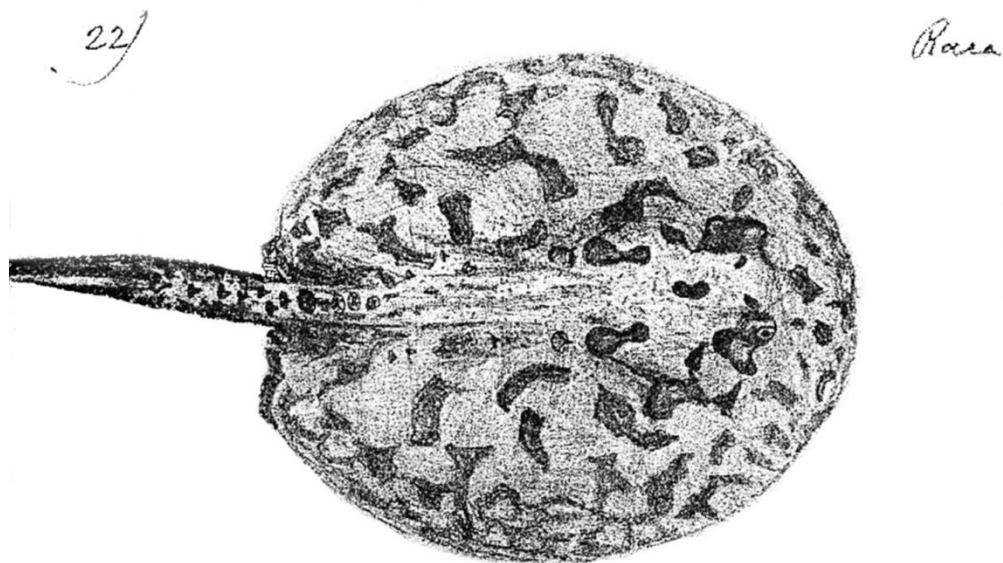


Figura 1: Primeira ilustração de *P. wallacei* produzida por Alfred Russel Wallace no século XIX (Fonte: reproduzido de Carvalho et al., 2016).

A arraia *P. wallacei* ou “cururu” como é popularmente conhecida na região de Barcelos, é uma espécie endêmica das águas pretas e ácidas do Rio Negro no Amazonas (Carvalho et al., 2016) e trata-se da menor arraia de água doce que se conhece do gênero *Potamotrygon* (Ferreira, 2023). Essa espécie pode medir de 24,5 cm a 28,6 cm de diâmetro de disco, mas já foi relatado espécimes com até 31 cm de diâmetro de disco, característica das

fêmeas que são geralmente maiores que os machos, devido ao espaço celômico para acomodar os embriões (Amazonas et al., 2021).

O tamanho e a forma corporal, além da presença do clássper, que é o órgão genital masculino, parecem ser as únicas características que expressam o dimorfismo sexual. As fêmeas possuem os ovários estruturalmente assimétricos, sendo o esquerdo maior que o direito, porém, apesar de menor, o ovário direito possui seis vezes mais epitélio germinativo, no entanto, somente o esquerdo é funcional (Duncan et al., 2016).

Potamotrygon wallacei é uma espécie que apresenta, assim como outros Potamotrygonidae, fecundação interna, possuindo dois úteros e dois ovários (Charvet-Almeida et al., 2005). A mãe fornece nutrição fetal por meio do processo de histotrofia matrotrofica, no qual a mucosa uterina, por meio de trofonemas, produz proteínas e secreções ricas em lipídios que nutrem os fetos durante o desenvolvimento embrionário (Amazonas et al., 2019). Possui crescimento lento, levando cerca de dois (02) anos para atingir seu tamanho mínimo de maturação, e longevidade entre 14 e 16 anos (Duncan et al., 2016). As fêmeas grávidas carregam de um a cinco (1-5) embriões (Amazonas et al., 2019) e a gestação dura cerca de três (03) meses (Chavet-Almeida et al., 2005; Amazonas et al., 2019). O parto ocorre durante a vazante e o início da enchente do Rio Negro, nesse período cerca de 40% das fêmeas adultas já estão grávidas (Duncan et al., 2016).

Os eventos do ciclo reprodutivo são regulados pelo pulso de inundação do Rio Negro (Araújo, 1998; Duncan et al., 2016). Morales-Gamba et al. (2021) avaliaram como os hormônios esteroides plasmáticos testosteronas (T) e 17β -estradiol (E 2) estão relacionados ao desenvolvimento folicular em fêmeas da arraia cururu, durante a estação de cheia da bacia do Médio Rio Negro. O peso relativo dos tecidos hepático e ovariano, bem como as alterações morfológicas nos folículos vitelogênicos, foram relacionados ao aumento do nível de água. Essas associações sustentam a ideia de que a reprodução dessa espécie é sincronizada com o ciclo hidrológico local da bacia do Médio Rio Negro. De fato, Marcon et al. (2021) descreveram que a atividade reprodutiva dos machos de *P. wallacei* também é concomitante ao período de cheia das águas na bacia do Médio Rio Negro, e é regulada pela ação de esteróides gonadais, principalmente a testosterona.

Um ponto importante, é que o número de estudos genéticos disponíveis para esta espécie é consideravelmente baixo. Valentim et al. (2013) realizaram estudos citogenéticos para a espécie ainda denominada como *Potamotrygon sp.* Neste estudo, cromossomos mitóticos e

meióticos foram analisados usando técnicas convencionais de coloração, bandeamento C e detecção das regiões organizadoras do nucléolo (NOR) com nitrato de prata (Ag-NOR). Os autores descobriram que o número diplóide é distinto entre os sexos, de modo que os machos apresentam $2n = 67$ cromossomos e as fêmeas apresentam $2n = 68$ cromossomos. Um cromossomo grande, correspondente ao par número dois no cariótipo feminino, estava ausente no complemento masculino, sugerindo que os cromossomos sexuais são do tipo XX/XO. Esse sistema de cromossomos sexuais, que raramente ocorre em peixes, foi descrito pelos autores pela primeira vez entre as raias de água doce da bacia amazônica.

Ferreira et al., (2023), por sua vez, fizeram um estudo com uma abordagem citogenética clássica e molecular e descobriram uma variação cariotípica em duas populações de *P. wallacei*. Eles descobriram dois cariótipos diferentes que chamaram de citótipo A do Médio rio Negro e citótipo B do baixo rio Negro (próximo a Manaus). Esses dados certamente trouxeram informações importantes sobre o papel das inversões cromossômicas que moldaram a fórmula do cariótipo e promoveram as mudanças observadas na macroestrutura cromossômica em arraias. O referido estudo foi o primeiro de uma série envolvendo investigações clássicas e moleculares em arraias de água doce, a fim de fornecer informações sobre a evolução cromossômica e a origem dos sistemas cromossômicos sexuais.

Belém (2020), em sua dissertação de mestrado, investigou pela primeira vez a estruturação morfológica e genética da arraia cururu por meio de morfometria geométrica e SNPs (do termo em inglês, *Single Nucleotide Polimorphisms*). Ele encontrou variações morfológicas significativas entre localidades, margens e áreas, mas não entre os sexos. Suas análises genômicas identificaram estruturação genética hierárquica, a primeira mais expressiva entre áreas (Médio e Baixo Rio Negro), a qual associou à distância geográfica entre as amostras, e a segunda, uma subestruturação entre margens do Médio Rio Negro, à qual foi associada ao isolamento parcial promovido pela calha do rio. O autor concluiu que os padrões de diversidade morfológica e genética da arraia cururu ocorrem em função de diferentes pressões seletivas.

Além disso, pouco se sabe sobre o estado de conservação da espécie, o que é preocupante em se tratando de uma espécie comercialmente explorada. Em uma consulta à lista vermelha (*red list*) da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) a espécie não é nem mesmo classificada, retornando “zero” resultados quando se busca sobre ela. Isso indica ausência de informações e, portanto, a impossibilidade de se estabelecer o status de conservação dessa espécie, se ameaçada ou não.

Dentre as informações básicas para se estabelecer o status de conservação de *P. wallacei*, destacamos a falta de conhecimento sobre seu sistema reprodutivo, ou seja, se é geneticamente monogâmico ou poligâmico (poliândrico ou poligínico). Destaca-se que a espécie apresenta fecundação interna e é vivípara (Charvet-Almeida et al., 2005) com desenvolvimento direto dos filhotes (Amazonas et al., 2019). O sistema reprodutivo tem influência direta na capacidade das espécies em reter diversidade genética ao longo das gerações e pode ter importante impacto na sua resposta adaptativa às mudanças ambientais e resiliência frente a impactos antrópicos (Domingues, 2018).

O fato de em uma mesma ninhada ser encontrado um alto polimorfismo no padrão de coloração dos filhotes de *P. wallacei* tem levado ao questionamento se isso pode estar relacionado ao tipo de sistema reprodutivo da espécie, uma vez que diferentes padrões de cores na mesma ninhada podem estar associados a múltipla paternidade (MP) (Torres et al., 2022). Para espécies vivíparas, espera-se que a probabilidade de paternidade múltipla seja influenciada por pelo menos dois fatores: o número de parceiros das fêmeas e o número de descendentes nas ninhadas (Correia et al., 2021).

Até o presente, não houve avaliação de paternidade múltipla em arraias de água doce, porém, um estudo recente avaliou a ocorrência de paternidade múltipla em *Potamotrygon leopoldi*, onde seis mães e suas ninhadas foram genotipadas através de três *loci* de microssatélites polimórficos, fornecendo a primeira evidência de paternidade múltipla para Potamotrygonidae (Torres et al., 2022). A paternidade múltipla foi confirmada em duas das seis (33%) ninhadas, quando os resultados foram analisados utilizando o método de contagem simples de alelos (baseado nas leis de herança mendeliana), já nas observações de contagem de alelos, foi observada MP em cinco das seis (83%) ninhadas (Torres et al., 2022).

O fato de ter sido encontrada MP em *P. leopoldi* que pertence ao mesmo gênero de *P. wallacei*, aliado ao fato de que frequentemente são encontrados filhotes com padrões de coloração distintos em uma mesma ninhada, nos conduziram a hipótese testada no presente estudo, de que existe MP em *P. wallacei*. A resposta para isso pode levar a duas implicações: (1) MP pode vir a ser reconhecida como um caráter sinapomórfico do gênero, ou mesmo grupos taxonômicos maiores; (2) MP pode ser uma apomorfia de *P. leopoldi*.

Uma forma de estudar o sistema de acasalamento é através de marcadores moleculares, os quais podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular que fornece um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados (Marwal e Gaur, 2020). Eles são altamente

valorizados em diversas áreas que envolvem genética, biologia molecular e biotecnologia, tais como genética de populações, filogeografia, filogenia molecular, mapeamento genético, diagnósticos de doenças genéticas, testes de paternidade e para quem investiga as relações entre genótipo e fenótipo.

Investigar a presença de paternidade múltipla é outra área em que as técnicas moleculares são valiosas. Também conhecida como poliandria genética, a paternidade múltipla refere-se a uma ninhada em que mais de um macho contribuiu geneticamente (Nevatte et al., 2023). Os benefícios potenciais da paternidade múltipla incluem evitar a endogamia ou parceiros geneticamente incompatíveis, aumentar a fecundidade e criar descendentes geneticamente diversos. Em elasmobrânquios, a paternidade múltipla foi documentada em espécies vivíparas e ovíparas e parece ser comum dentro do grupo. De fato, acredita-se que a paternidade múltipla seja a condição ancestral de todos os elasmobrânquios (Lamarca et al., 2020).

Um marcador muito famoso e usado para análise de parentesco são os microssatélites (Kaiser, 2017). Os microssatélites, ou repetições de sequência simples (SSRs), representam um tipo único de sequências genômicas repetidas em tandem, que são abundantemente distribuídas pelos genomas e demonstram altos níveis de polimorfismo de alelos, sendo ainda considerados marcadores codominantes, uma vez que é possível diferenciar os homozigotos dos heterozigotos (Hellemans e Volckaert, 2006). No entanto, os microssatélites apresentam alto erro de genotipagem, exigindo métodos para quantificar e minimizar as taxas de erro de genotipagem em análises de parentesco (Kaiser, 2017).

Quem vem demonstrando um baixo custo, alto rendimento de genotipagem e poder de excluir não pais são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Um SNP é uma localização na sequência de DNA onde os indivíduos variam em um único nucleotídeo (Zimmerman, 2020). Esses marcadores são mais numerosos e estão uniformemente distribuídos no genoma em comparação aos microssatélites, e apresentam um mecanismo mutacional com baixos níveis de homoplasia (Morin et al., 2004). É certo que com os rápidos avanços na tecnologia de sequenciamento, houve uma facilidade para a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em todo o genoma (Morin et al., 2009), e este marcador vem sendo amplamente utilizado na pesquisa evolutiva e na identificação de parentesco genético.

A grande questão para este estudo é a inexistência de marcadores moleculares específicos para *P. wallacei*, isso dificulta o esclarecimento de informações importantes sobre

a compreensão de aspectos da biologia reprodutiva, como os sistemas de acasalamento que pode ser útil para melhorar as avaliações da estrutura genética da população, auxiliando no desenvolvimento de ações de conservação.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Desenvolver marcadores moleculares do tipo SNP específicos para *Potamotrygon wallacei* utilizando sequenciamento de próxima geração e testar paternidade múltipla na espécie.

Objetivos Específicos

- Obter SNPs específicos para *P. wallacei* usando ferramentas de bioinformática;
- Caracterizar os SNPs desenvolvidos, verificando os níveis de polimorfismo na espécie;
- Testar paternidade múltipla em *P. wallacei* usando SNPs;
- Inferir sobre o sistema de acasalamento de *P. wallacei*.

JUSTIFICATIVA

Potamotrygon wallacei é endêmica da bacia do Rio Negro, região cuja atividade antrópica é crescente devido a intensa exploração da espécie para fins de aquarismo (Charvet-Almeida, 2006). Por ter distribuição restrita e ao seu inerente pequeno tamanho populacional, essa arraia é naturalmente vulnerável a grandes modificações de habitat como, por exemplo, mudanças climáticas ou eventos catastróficos regionais, de modo que a exploração antrópica acima dos limites sustentáveis tem potencial de conduzir a espécie à extinção mais rapidamente em comparação com espécies de populações maiores e com ampla distribuição geográfica. Embora sua coleta seja autorizada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e dita superficialmente como sustentável, não há dados genéticos para avaliar o real impacto dessas atividades à diversidade genética da espécie. Assim, não há informações sobre o estado de conservação da mesma junto a IUCN.

Os marcadores SNPs desenvolvidos e caracterizados através deste estudo para *P. wallacei* por meio de *Next Generation Sequencing* (NGS), servirão como uma ferramenta a qual terá potencial para estimar a diversidade genética, monitorar as populações naturais e permitirá

esclarecer o sistema de acasalamento da espécie, uma vez que será utilizado para testar MP. Os marcadores poderão também ser utilizados em trabalhos futuros para esclarecer o padrão de distribuição e o estado de conservação da arraia cururu, informações indispensáveis para nortear as estratégias de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA e amostragem

As amostras utilizadas no trabalho foram provenientes da localidade de Lagoa do Cubá, na região de Barcelos no Médio Rio Negro, foram obtidas durante o período de seca, nos meses de março e abril, sendo que somente uma família, denominada CANI, foi coletada no mês de novembro. Foram utilizadas 26 amostras, sendo seis prováveis mães com seus respectivos embriões (foram assim denominadas porque a maioria das fêmeas sofreram aborto), como segue na Tabela 1 abaixo. As amostras foram coletadas pela equipe do Prof. Dr. Wallice Duncan do Laboratório de Morfologia Funcional (DM/UFAM) e cedidas para este estudo.

Tabela 1 Grupos familiares de prováveis mães e prováveis filhotes de Potamotrygon wallacei

Código amostra	Id Ninhada 1	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 03	CA12	Embrião	31/03/2018
Pw 04	CA12	Embrião	31/03/2018
Pw 05	CA12	Embrião	31/03/2018
Pw 06	CA12	Mãe	31/03/2018
Código amostra	Id Ninhada 2	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 15	CA26	Mãe	01/04/2018
Pw 16	CA26	Embrião	01/04/2018
Pw 17	CA26	Embrião	01/04/2018
Pw 18	CA26	Embrião	01/04/2018
Código amostra	Id Ninhada 3	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 26	CA47	Embrião	02/04/2018
Pw 27	CA47	Embrião	02/04/2018
Pw 28	CA47	Mãe	02/04/2018
Pw 29	CA47	Embrião	02/04/2018
Pw 30	CA47	Embrião	02/04/2018
Código amostra	Id Ninhada 4	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 31	CA48	Mãe	02/04/2018
Pw 32	CA48	Embrião	02/04/2018
Pw 33	CA48	Embrião	02/04/2018
Pw 34	CA48	Embrião	02/04/2018
Pw 35	CA48	Embrião	02/04/2018
Código amostra	Id Ninhada 5	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 39	CA51	Embrião	02/04/2018

Pw 40	CA51	Embrião	02/04/2018
Pw 41	CA51	Embrião	02/04/2018
Pw 42	CA51	Mãe	02/04/2018
Código amostra	Id Ninhada 6	Mãe / Embrião	Data coleta
Pw 50	CANI	Mãe	15/11/2022
Pw 51	CANI	Embrião	15/11/2022
Pw 52	CANI	Embrião	15/11/2022
Pw 53	CANI	Embrião	15/11/2022

As extrações de DNA dos tecidos dos indivíduos foram realizadas pelo método de CTAB 2% (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle e Doyle, 1987)), incluindo Proteinase K (PK), clorofórmio álcool isoamílico (24:1), etanol 70% e isopropanol gelado. Foi cortado um pedaço de tecido (cerca de 100 mg) de músculo e colocado no tubo eppendorf 2 ml, sendo posteriormente adicionado 500 µl de tampão CTAB 2% e 10 µl de PK, e deixado em banho-seco a 55 °C em overnight. Depois foi adicionado 300 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e misturado por inversão por 5 min e em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Foi retirado 300 µl de sobrenadante de cada amostra e colocados em um novo tubo de 1,5 ml, sendo adicionado 500 µl de isopropanol frio e misturado por inversão novamente por 2 min. Foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min, em seguida o etanol foi descartado, ficando apenas o pellet de DNA, acrescido de uma nova lavagem adicionando 500 µl de etanol 70%, com as amostras sendo centrifugadas novamente a 10.000 rpm por 10 min e tendo descartado o álcool. Por fim, após as amostras terem seu álcool evaporado, foram ressuspendidas com 50 µl de água milli-q. A qualidade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1% e a concentração de cada amostra foi quantificada no espectrofotômetro nanodrop 2000.

Biblioteca Genômica Reduzida

Foram selecionadas 26 amostras com boa qualidade de DNA, das quais foram retirados cerca de 500 ng de DNA para serem digeridos com as enzimas de restrição SdaI e Csp6, de modo que os produtos da digestão foram simultaneamente ligados aos adaptadores P5_P1 e P7_P2 em uma reação a 37 °C por 3 h. O volume final do mix para a digestão foi de 50 µl, sendo composto por: 5 µl de DNA extraído, 30,05 µl de água ultra pura, 10 µl de Tango; 2 µl de P5_P1, 2 µl de P7_P2, 0,1 µl de SdaI 0,1 µl de Csp6, 0,5 µl de T4 Ligase e 0,25 µl de ATP para cada amostra.

A purificação da digestão/ligação foi feita com *beads* magnéticas à uma proporção de um volume da solução para cada 0,95 volumes de *beads*. Assim, foi multiplicado o volume

inicial de 50 μ l de DNA por 0.95 de *beads* ficando um volume de 47,5 μ l de *beads* para colocar em cada poço, ficando um volume final de 97,5 μ l. Após colocar as *beads* nas amostras um vórtex foi feito e em seguida um spin. As amostras ficaram incubadas por 5 min, em seguida a placa de PCR foi colocada sobre a placa magnética e incubada por mais 10 min. A placa de PCR e a placa magnética foram giradas invertidas na centrífuga a 1 min em uma rotação de 100 RCF (Força Centrífuga Relativa) para retirar o sobrenadante. Após isso, as *beads* foram lavadas com etanol 80% gelado utilizando um volume de 150 μ l, em seguida foram misturadas por inversão e incubadas por 5 min, depois, a placa de PCR e a placa magnética foram giradas invertidas na centrífuga durante 1 min a 100 RCF para retirar o sobrenadante novamente e mais uma lavagem com etanol 80% foi feita. Após a lavagem, a placa de PCR foi posta para secar na estufa por 10 min, sendo ressuspensas com o volume de 50 μ l.

Para a primeira PCR, o volume final de mix foi 15 μ l por amostra, sendo: 1 μ l de DNA, 7,75 μ l de água ultra pura, 1,2 μ l de MgCl₂, 1,2 μ l de dNTPs, 1,5 μ l de buffer NH₄, 1 μ l de primer P5(P1) amp, 1 μ L de P7(P2) amp, e 0,35 μ l de Taq. A reação durou 1 h 40 min passando por três estágios, o primeiro foi a desnaturação a 94 °C por 2 min, o segundo foi de anelamento seguido por 35 ciclos a 94 °C por 15 s, 55 °C por 35 s e 68 °C por 1 min 30 s, o último estágio foi de extensão a 72 °C por 30 s. Após a amplificação, os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados novamente em esferas magnéticas.

Para a PCR de enriquecimento e ligação dos adaptadores, os barcodes utilizados foram: primer (Q7) para a coluna da placa de PCR e primer (Q5) para as linhas da placa de PCR. Foram feitos dois super master mix para o volume final de 25 μ l para cada réplica, sendo 5 μ l de cada amostra de DNA digerido. Após o enriquecimento, as cinco (5) réplicas foram combinadas em uma única placa usando o mesmo volume e foram purificadas com *beads* magnéticas e foram ressuspensas com 50 μ l. Em seguida, cada poço foi quantificado no Qubit 2.0 (Life Technologies). De posse das concentrações de cada amostra, foram feitos os cálculos para preparar um pool equimolar de amostras. Após a preparação da biblioteca contendo a mistura equimolar de todos os indivíduos, ela passou por nova etapa de purificação utilizando *beads* magnéticas. Depois, uma etapa de redução do número de fragmentos foi feita através da seleção de fragmentos entre 400-630 pb por meio do Pippin-Prep. Em seguida, a concentração da biblioteca genômica final foi quantificada novamente no Qubit 2.0 e seu volume aquoso foi evaporado no *SpeedVac*. A biblioteca genômica foi processada no sequenciador de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) Illumina MiSeq®, usando protocolo do fabricante.

Processamento dos dados por bioinformática

Os dados brutos foram obtidos em formato FASTQ e posteriormente processados por meio de DiscoSnpRad para obter os SNPs. A obtenção dos SNPs consistiu na filtragem das sequências por qualidade usando o pacote vcfothers.R implementado na plataforma R usando script desenvolvido pelo grupo do LEGAL/UFAM (<https://github.com/legalLab/>). Nesta filtragem foram realizadas seis etapas: 1) foram excluídos os indivíduos que apresentavam mais de 90% de dados faltantes; 2) foram retirados os SNPs que tinham alelos raros com frequência abaixo de 3%; 3) foram retirados todos os SNPs com cobertura menor que 10x, ou seja, que tiveram menos de 10 leituras únicas do mesmo locus; 4) foram mantidos somente SNPs não ligados, de forma que foi apenas um SNP por RAD (*Restriction-site Associated DNA*) foi considerado; 5) foram retirados todos os SNPs com mais de 20% de dados faltantes nos indivíduos analisados; e 6) foram retirados todos os indivíduos com mais de 30% de dados faltantes. Após a filtragem dos *loci*, conforme os critérios e passos supramencionados, foi gerado um gráfico de missing data por indivíduo. Após filtragem, o arquivo VCF foi convertido nos formatos de input para as análises subsequentes. É importante destacar que o banco de dados foi organizado por grupos familiares.

Análise dos dados genômicos

Para as análises de diversidade genética utilizamos o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Os parâmetros utilizados foram os de heterozigidade observada (H_o) e heterozigidade esperada (H_e). Para as análises de relacionamento foi utilizado o programa NGSRelate (Korneliussen e Moltke, 2015). O software NGSRelate estima parentesco pareado a partir de dados NGS (*Next-Generation Sequencing*). Ele fornece estimativas de probabilidade máxima que são baseadas em probabilidades de genótipos. O estimador utilizado nas análises de parentesco foi o Pairwise relatedness (R_{ab}), o qual foi descrito pela primeira vez por Hedrick e Lacy (2015). Ele calcula o índice de relacionamento R a partir da proporção compartilhada de identidade de alelos homólogos por descendência usando o subconjunto das nove estimativas de máxima verossimilhança entre dois indivíduos em um locus bialélico. Esse índice de relacionamento R inclui categorias de parentesco, pais-filhos ($r = 0,50$), irmãos completos ($r = 0,50$), meio-irmãos ($r = 0,25$), primos ($r = 0,12$), de não aparentados ($r = 0,10$).

RESULTADOS

Diversidade genética

As informações genéticas foram obtidas utilizando 1.664 SNPs e houve variação no número de *loci* polimórficos como mostra a Tabela 2. A média da diversidade genética sob todos os *loci* para todos os grupos foi de 0,246, tendo uma variação de $\pm 0,119$ como mostra a Tabela 3. A heterozigosidade observada (H_o) apresentou um valor superior ao da heterozigosidade esperada (H_e), conforme apresentado na Tabela 4, indicando uma tendência de todos os *loci*.

Tabela 2: Número de *loci* e número de *loci* polimórficos por família

	CA12	CA26	CA47	CA48	CA51	CANI
No. of <i>loci</i>	1664	1664	1664	1664	1664	1664
No. of polym. <i>Loci</i>	845	706	788	747	829	813

Tabela 3: Índice médio de Diversidade Genética de *Potamotrygon wallacei* estimados no Arlequin de todos os grupos

Todos	H_o	H_e	Me
	$0,306 \pm 0,279$	$0,248 \pm 0,184$	$0,246 \pm 0,119$

H_o = Heterozigosidade observada;

H_e = Heterozigosidade esperada;

Me = Média da diversidade gênica sob todos os *loci*.

Tabela 4: Índice de Diversidade Genética de *Potamotrygon wallacei* estimados no Arlequin por família

Família	H_o	H_e	Me
CA12	$0,595 \pm 0,274$	$0,476 \pm 0,116$	$0,255 \pm 0,145$
CA26	$0,530 \pm 0,275$	$0,441 \pm 0,123$	$0,277 \pm 0,149$
CA47	$0,541 \pm 0,274$	$0,435 \pm 0,126$	$0,231 \pm 0,125$
CA48	$0,452 \pm 0,257$	$0,422 \pm 0,128$	$0,281 \pm 0,151$
CA51	$0,653 \pm 0,297$	$0,463 \pm 0,121$	$0,236 \pm 0,127$
CANI	$0,586 \pm 0,270$	$0,470 \pm 0,115$	$0,239 \pm 0,135$

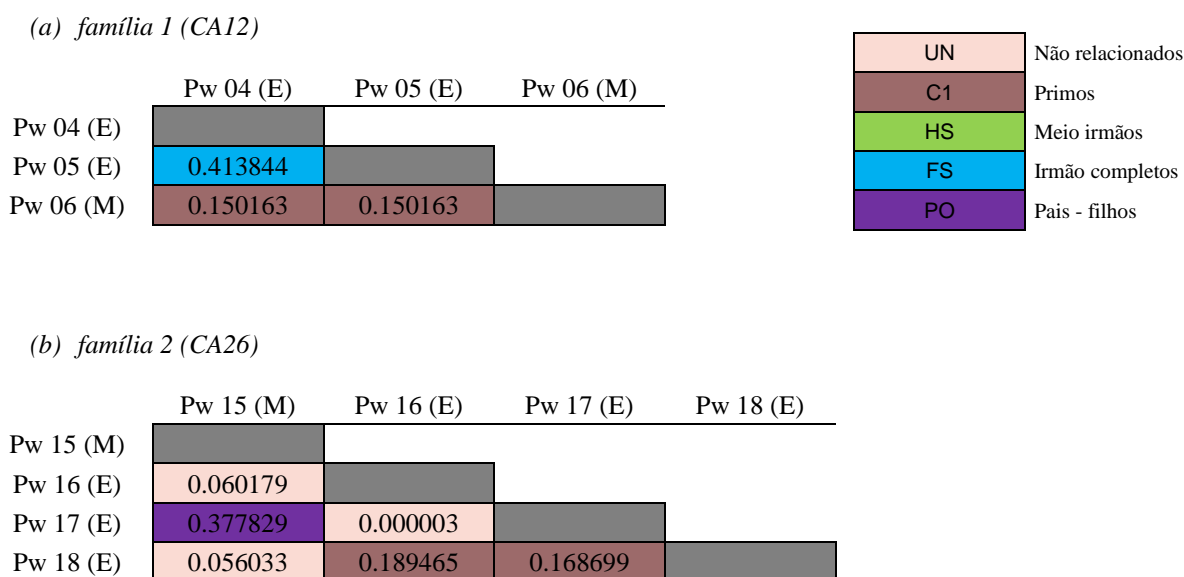
H_o = Heterozigosidade observada;

H_e = Heterozigosidade esperada;
 M_e = Média da diversidade gênica sob todos os loci.

Análise de parentesco

A análise de relação de parentesco implementada no programa NgsRetale usando a estimativa de parentesco pareado rab (Pairwise Relatedness) mostrou a primeira evidência de múltipla paternidade para a espécie *Potamotrygon wallacei*. Dentre as seis (06) supostas famílias apresentadas, identificamos 18 pares com algum nível de relacionamento, incluindo quatro pares de pais-filhos, cinco pares de irmãos completos, quatro pares de meio-irmãos e cinco pares de primos. Porém, para uma família não houve nenhuma relação de parentesco como segue Figura 2.

A estimativa de R parentesco pareado para a suposta família 1 (CA12) com ninhada de três filhotes, apresentou valor de relacionamento $R = 0,413$ entre o pareamento dos indivíduos Pw04 e Pw05 mostrando relação consistente de irmãos completos. Entretanto, para o pareamento dos indivíduos Pw04 e Pw06 (filhote e suposta mãe, respectivamente), o valor de relacionamento 0,122 mostrou uma relação parental de primos e não de mãe-filho, para o pareamento dos indivíduos Pw05 e Pw06 o intervalo mostrou o mesmo tipo de relação, como mostra figura 2a.



(c) família 3 (CA47)

	Pw 26 (E)	Pw 28 (M)	Pw 29 (E)	Pw 30 (E)
Pw 26 (E)				
Pw 28 (M)	0.177487			
Pw 29 (E)	0.106045	0.260664		
Pw 30 (E)	0.335698	0.070357	0.000000	

(d) família 4 (CA48) (mãe deletada)

	Pw 32 (E)	Pw 33 (E)	Pw 34 (E)	Pw 35 (E)
Pw 32 (E)				
Pw 33 (E)	0.000005			
Pw 34 (E)	0.028033	0.077575		
Pw 35 (E)	0.000000	0.075085	0.000002	

(e) família 5 (CA51)

	Pw 39 (E)	Pw 40 (E)	Pw 41 (E)	Pw 42 (M)
Pw 39 (E)				
Pw 40 (E)	0.438278			
Pw 41 (E)	0.497851	0.562599		
Pw 42 (M)	0.367494	0.530626	0.442741	

(f) família 6 (CANI) (mãe deletada)

	Pw 51 (E)	Pw 52 (E)	Pw 53 (E)
Pw 51 (E)			
Pw 52 (E)	0.263789		
Pw 53 (E)	0.243138	0.506208	

Figura 2: Estimativa de parentesco pareado rab (Pairwise Relatedness) entre supostas mães e seus filhotes para (a) família 1 (CA12), (b) família 2 (CA26), (c) família 3 (CA47), (d) família 4 (CA48), (e) família 5 (CA51) e (f) família 6 (CANI) da arraia cururu (*Potamotrygon wallacei*). Células cinza escuro, indicam valores não aplicáveis.

*OBS: M= mãe; E= embrião

A família 2 (CA26) com ninhada de três filhotes, o parâmetro utilizado apresentou relação de parentesco de primos entre o pareamento dos indivíduos Pw16 e Pw18 com valor de relacionamento de 0,189, o mesmo resultado foi apresentado para o pareamento dos indivíduos Pw17 e Pw18 com intervalo de 0,168. Entretanto, os dados pareados entre os indivíduos Pw15 e Pw17 mostraram um valor de relacionamento de 0,377, indicando relação de mãe-filho. Para os outros indivíduos, os dados mostraram que não são relacionados como mostra a figura 2b.

Para a família 3 (CA47) com ninhada de quatro filhotes, uma amostra foi excluída devido à baixa qualidade. Os valores de relacionamento R para cada par, apontou relacionamentos de primos entre os indivíduos Pw26 e Pw28. Para os indivíduos Pw26 e Pw30 e Pw28 e Pw29 como mostra a figura 2c, o valor de relacionamento mostrou que são meio irmãos. A suposta mãe Pw28 o valor de relacionamento não mostrou nenhuma relação de parentesco com os supostos filhos.

Para a família 4 (CA48), a estimativa de dados pareados mostrou que não houve nenhum tipo de relação já supracitado, no entanto, mostrou que a ninhada de três filhotes da família 5 (CA51) consistiam em irmãos completos e pais-filhos, como mostra figura 2d.

Para a família 6 (CA50), a mãe Pw50 foi excluída por apresentar baixa qualidade. A estimativa rab indicou a existência de MP, uma vez que o pareamento entre os indivíduos Pw51 e Pw52 apresentou valor de relacionamento de 0,263, mostrando serem meio irmãos, o mesmo para o pareamento entre os indivíduos Pw51 e Pw53 com valor de relacionamento R de 0,243, isso indica serem filhos de pais diferentes. Já para os indivíduos Pw52 e Pw53 o valor de relacionamento foi de 0,506, mostrando serem irmãos completos.

Em geral, os conjuntos de dados pareados de SNPs produziram indicativos de relação de parentesco, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Número de SNPs por pareamento entre indivíduos separados por família.

* F = família	N° de SNPs por família						UN	Não relacionados
	nSites F1	nSites F2	nSites F3	nSites F4	nSites F5	nSites F6	C1	
Pareamento entre indivíduos	267	340	462	369	372	456	HS	Meio irmãos
	359	463	455	436	352	390	FS	Irmão completos
	306	429	398	391	426	395	PO	Pais e filhos
		332	477	417	346			
		313	390	360	455			
		421	374	450	395			

DISCUSSÃO

Diversidade genética

A obtenção de marcadores SNPs via ddRAD usando protocolo adaptado pelo LEGAL (Laboratório de Evolução e Genética Animal) para o sequenciador de próxima geração Illumina mostrou-se excelente para a obtenção dos níveis de diversidade genética para *P. wallacei*. O presente estudo avaliou a diversidade genética de possíveis grupos familiares da raia cururu amostrada na localidade da Barcelos, Rio Negro utilizando 1.664 marcadores moleculares do tipo SNPs. Os resultados mostraram a existência significativa de níveis de diversidade genética entre as amostras analisadas com valores de H_o que variam de 0,45 para CA48 a 0,65 em CA51, com média de 0,30. Já os valores de H_e variaram de 0,42 em CA48 a 0,48 em CA12, com média de 0,24. Os níveis de heterozigiosidade obtidos no presente trabalho foram menores do que os obtidos por Belém, (2020), o qual usando 2.089 SNPs obteve uma média de H_o de 0,39 e H_e de 0,38 proveniente de indivíduos amostrados de cinco populações na bacia do rio Negro. Esses níveis de heterozigiosidade obtidos também foram menores do que os observados em outras espécies de raias já estudadas, onde os valores das médias encontrados foram de H_o de 0,39 e H_e de 0,34 para *Pseudobatos percellens*, e H_o de 0,38 e H_e de 0,33 para *Rhinoptera bonasus* (Souza, 2021), ambos utilizando SNPs. O autor sugeriu que os resultados fossem avaliados com cautela, uma vez que o tamanho da amostra analisada em alguns locais era baixo e pode ter afetado essas estimativas como foi o caso de *P. wallacei* uma vez que foram analisadas apenas seis prováveis famílias com o N variando de 3 a 5 indivíduos. Porém, em geral, os elasmobrânquios apresentam baixa diversidade genética devido às suas lentas taxas de evolução molecular e características de história de vida k-estrategistas (Domingues et al., 2018; Lamarca, 2020).

Análise de parentesco

Os resultados deste estudo sobre análise de parentesco fornecem novos insights sobre a biologia reprodutiva da arraia cururu. Os resultados mostraram que das seis supostas famílias analisadas, uma apresentou sistema de acasalamento monogâmico (família CA51), envolvendo um macho e uma fêmea, e a outra (família CANI) apresentou sistema de acasalamento poligâmico envolvendo uma fêmea e mais de um macho. Os outros grupos familiares apresentaram-se em sua maioria como não relacionados, com exceção de alguns casos envolvendo relacionamento como de primos e meio-irmãos.

A monogamia genética quando ocorre em peixes, está geralmente associada a monogamia social, quando há a necessidade de defesa biparental de território ou de cuidado com a prole (Chapman et al., 2004), o segundo exemplo é algo comum em Potamotrygoninae (Carvalho et al., 2016). Considerando também o estudo feito com *Sphyrna tiburo* (Chapman et al., 2004) onde os autores detectaram que machos e fêmeas monogâmicas geralmente produzem descendentes com apenas um parceiro a cada ciclo reprodutivo. Esses casos poderiam explicar a monogamia apresentada na família CA51. Porém, a detecção de MP para a família CANI, pode ser um indicativo de que as estratégias de acasalamento de *P. wallacei* envolvam poliandria. Duas hipóteses plausíveis podem explicar a poliandria em animais. A primeira pode estar relacionada aos benefícios genéticos proporcionados por esse comportamento, uma vez que a parentalidade da prole frequentemente é atribuída a machos que oferecem aptidão genética acima da média (Lamarca, 2020). O segundo é um possível desacerto entre as taxas ótimas de acasalamento entre machos e fêmeas, o que pode levar a desordens sexuais, como acasalamento forçado (Fox et al., 2019; Lamarca, 2020) ou também poliandria de conveniência (Lyons et al., 2021; Nevatte, 2022).

Porém, outros fatores biológicos corroboram que a espécie seja poliândrica (Lyons et al., 2021). Por exemplo, a competição espermática, que é quando espermatozoides de diferentes machos competem pela fertilização dos óvulos e é um fato conhecido em elasmobrânquios (Fitzpatrick et al., 2012). E também, o armazenamento de esperma, em espécies que possuem tais características, pode aumentar a quantidade de competição espermática já que as fêmeas podem ter controle pós-copulatório sobre a geração de suas ninhadas por meio do armazenamento e seleção de esperma de machos “favoritos” (Fitzpatrick et al., 2012). A capacidade de armazenar espermatozoides já foi registrada para muitos condrictes (Lyons et al., 2021).

Shibuya et al., (2022) descobriram que em *Potamotrygon motoro* as fêmeas liberam feromônios pela cloaca o que faz com os machos saibam qual fêmea está em processo de reprodução. Esse seria mais um indicativo de que vários machos podem copular uma única fêmea desde que vença outro macho durante a estação reprodutiva, uma vez que a espécie citada e *P. wallacei* pertencem ao mesmo gênero. Outro fator muito importante e que corrobora com a MP em *P. wallacei* foi o estudo feito por da Silva et al. (2016), com seis raias de água doce sul-americanas (família Potamotrygonidae) incluindo *P. wallacei*. Os autores registraram que os Potamotrygonidae possuem dois úteros e dois ovários. Charvet-Almeida et al. (2005) descreveu que a assimetria ovariana é uma característica dos Potamotrygonidae. Dados de

fecundidade uterina em *Plesiotrygon iwamae*, *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. schoroederi*, *P. scobina* e *P. wallacei*, mostra que ambos os úteros armazenam embriões e, conseqüentemente, são funcionais (Charvet-Almeida et al., 2005; da Silva, 2017) e as diferenças observadas em termos de conteúdo uterino envolveu apenas discrepâncias relacionadas ao número de embriões encontrados.

Todavia, como apenas seis ninhadas foram analisadas para esta espécie, e no fim descobrimos que só haviam duas famílias de fato e apenas em uma foi detectado MP, não foi possível determinar a frequência da poliandria. Para uma avaliação mais completa do sistema de acasalamento de *P. wallacei* é necessária uma amostragem adicional de fêmeas grávidas e seus filhotes. É certo que sejam necessários mais estudos para entender a múltipla paternidade na arraia cururu. Casos de MP só foram apontados para sete ordens de elasmobrânquios até o momento, sendo os Carcharhiniformes, Hexanchiformes, Lamniformes, Orectolobiformes, Squaliformes, Rajiformes e Myliobatiformes (Rossouw et al. 2016) e ainda não está claro como esse caráter evoluiu e se ocorre em todos os elasmobrânquios ou em algumas linhagens (Lamarca, 2020), para a família Potamotrygonidae, este seria a segunda evidência de MP, o primeiro relato feito foi para *Potamotrygon leopoldi* (Torres et al., 2022).

As vantagens de ocorrência de MP seriam o poder de aumentar o tamanho efetivo da população (N_e) e ajudar a manter a diversidade genética de uma população a longo prazo, além de aumentar o número de descendentes viáveis em uma única ninhada. Além disso, esse comportamento pode reduzir as chances de a infertilidade do parceiro sexual ou esgotamento espermático, aumentando assim a aptidão reprodutiva das fêmeas (Nevatte, 2022).

CONCLUSÃO

Este estudo foi o primeiro feito usando marcadores SNPs para raias de água doce com a finalidade de se obter as relações de parentesco e mostrou-se eficiente nas análises.

Os SNPs obtidos foram informativos para a inferência dos relacionamentos em 60% das comparações evidenciando algum tipo de relacionamento parental, e 40% de não relacionados;

Este estudo mostrou que *P. wallacei* apresentou dois sistemas de acasalamento em duas famílias, a família CA51 apresentou monogamia enquanto que a família CANI apresentou MP, nas outras famílias a maioria dos relacionamentos foram de não relacionados (UN). Embora preliminares, os resultados fornecem novas informações importantes sobre a biologia reprodutiva da espécie.

Por fim, mais pesquisas nesta área devem ser feitas, incluindo a coleta cuidadosa de amostras adicionais de famílias. E também, deve-se aumentar a quantidade de famílias para inferir os relacionamentos com mais precisão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amazonas, M. G.; Olentino, D.; Lubich, C.; Duncan, W. P. e Yamamoto, K. C. (2021). Length-weight relationship for *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa and Araújo, 2016) caught in the middle Negro River, Barcelos, Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Biology**. vol. 84, e253497. Doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253497>
- Araújo, M. L. G. (1998). **Biologia de *Potamotrygon* sp. C (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no Médio Rio Negro, Amazonas**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, p. 171.
- Arnés-Urgellés, C.; Hoyos-Padilla, E. M. Pochet, F. e Salinas-de-León, P. (2018). First observation on the mating behaviour of the marbled ray, *Taeniurops meyeri*, in the tropical Eastern Pacific. **Environmental Biology of Fishes**. 101: 1693-1699.
- AvinashMarwal; Rajarshi Kumar Gaur, (2020). Chapter 18 - **Molecular markers: tool for genetic analysis**, Editor(s): **Ashish S. Verma, Anchal Singh, Animal Biotechnology**. (Second Edition), Academic Press, Pages 353-372. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00016-1>
- Belém, R. C. S. (2020). **Diversidade morfológica e genética de arraia cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016), uma espécie de igarapé**. (Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus).
- 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. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4107.4>
- Chapman, D. D.; Prodöhl, P. A.; Gelsleichter, J.; Manire, C. A. e Shivji, M. S. (2004). Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: implications for shark conservation. **Molecular Ecology**, 13: 1965-1974. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02178.x>
- Charvet-Almeida, P. (2006). História natural e conservação das raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no médio Rio Xingu, área de influência do projeto Hidrelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil).
- Charvet-Almeida, P.; Araújo, M. L. G. de; e 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.
- Collins, R. A.; Hrbek, T. (2018). An In Silico Comparison of Protocols for Dated Phylogenomics. **Systematic Biology**. 0:1–11.
- Correia, H. E.; Abebe, A.; e Dobson, F. S. (2021). Multiple paternity and the number of offspring: A model reveals two major groups of species. **Bio Essays**, 43. Doi: <https://doi.org/10.1002/bies.202000247>

Da Silva, M. I.; de Oliveira, M. I.; da Costa, O. T.; e Duncan, W. P. (2017). Morphology and Morphometry of the Ovaries and Uteri of the Amazonian Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae: Elasmobranchii). **Anat Rec (Hoboken)**. (2):265-276.

de Souza Valentim, F.C.; Porto, J. I. R.; Bertollo, L. A. C. (2013). XX/XO, a rare sex chromosome system in Potamotrygon freshwater stingray from the Amazon Basin, Brazil. **Genetica** 141, 381–387. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10709-013-9737-2>

Domingues, R. R.; Hilsdorf, A.W. S. e Gadig, O. B. F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. **Conserv Genet** 19, 501–525 Doi: <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1038-3>

Doyle, J. J; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 1987; 19(1): 11-5.

Duncan, W. P.; Shibuya, A.; de Araújo, M. L. G.; e Zuanon, J. (2016). Biologia e história natural de *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa E Araújo, 2016) na bacia do rio negro, Amazônia Central, Brasil.

Excoffier, L.; e 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.

Ferreira, A. M. V.; Viana, P. F.; Marajó, L.; Feldberg, E. (2023). Karyotypic variation of two populations of the small freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa & Araújo 2016: A classical and molecular approach. **Plos One**. 18(1): e0278828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278828>

Fitzpatrick, J. L.; Kempster, R. M.; Daly-Engel, T. S.; Collin, S. P.; Evans, J. P. (2012). Assessing the potential for post-copulatory sexual selection in elasmobranchs. **J Fish Biol** 80(5):1141–1158. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03256.x>

Fontenelle, J. P.; Marques, F. P. L.; Kolmann, M. A.; Lovejoy, N. R. (2021) Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveal effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. **Journal Biogeographic** 48:1406–1419. Doi: <https://doi.org/10.1111/jbi.14086>

Fox, R. J.; Head, M. L.; Jennions, M. D. (2019) Disentangling the costs of male harassment and the benefits of polyandry for females. **Behav Ecol** 30(3):872–881. Doi: <https://doi.org/10.1093/beheco/arz024>

Goodnight, K.F.; e Queller, D.C. (1999): Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. **Molecular Ecology**. 8: 1231-1234. Doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00664.x>

Hedrick, P. W.; e Lacy, R. C. Measuring Relationshipness between Inbred Individuals. (2015). **Journal of Heredity**, Vol 106, Ed. 1, pág. 20–25, Doi: <https://doi.org/10.1093/jhered/esu072>

- Hellemans, B.; e Volckaert, F. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**. 255. 1-29. Doi: [10.1016/j.aquaculture.2005.11.031](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031).
- Kaiser, S.A.; Taylor, S.A.; Chen, N.; Sillett, T.S.; Bondra, E.R. e Webster, M.S. (2017), A comparative assessment of SNP and microsatellite markers for assigning parentage in a socially monogamous bird. **Mol Ecol Resour**, 17: 183-193. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12589>
- Kirchhoff, K. N.; Hauffe, T.; Stelbrink, B.; Albrecht, C.; Wilke, T. (2017). Evolutionary bottlenecks in brackishwater habitats drive the colonization of fresh water by stingrays. **Journal Evolutionary Biology** 30:1576–1591. Doi: <https://doi.org/10.1111/jeb.13128>
- Korneliussen, T. S, Moltke, I. (2015). NgsRelate: a software tool for estimating pairwise relatedness from next-generation sequencing data. **Bioinformatics**. Dec 15;31(24):4009-11. Doi: [10.1093/bioinformatics/btv509](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv509).
- Lamarca, F.; Carvalho, P. H.; Vilasboa, A.; Netto-Ferreira, A. L.; e Vianna, M. (2020). Is multiple paternity in elasmobranchs a plesiomorphic characteristic? **Environmental Biology of Fishes**. 103, 1463–1470. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10641-020-01034-y>
- Latrubesse, E. M.; e 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.; e Stevaux, J. C. (2015). The anavilhanas and mariuá archipelagos: fluvial wonders from the Negro River, Amazon Basin. **Lands capes and Landforms of Brazil**, 157–169.
- Lighten, J.; Incarnato, D.; Ward, B. J.; van Oosterhout, C.; Bradbury, I.; Hanson, M.; e 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.
- Lucifora, L. O.; Scarabotti, P. A.; e Barbini, S. A. (2022). Predicting and contextualizing sensitivity to overfishing in neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Ver Fish Biol Fisheries**. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11160-021-09696-2>
- Lyons. K.; Chabot, C. L.; Mull, C. G.; Holder, C. N. P.; Lowe, C. G. (2017). Who’s my daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. **Ecol Evol** 7:5603–5612. Doi: <https://doi.org/10.1002/ece3.3086>
- Marwal, A.; e Gaur, R. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. Doi: [10.1016/B978-0-12-811710-1.00016-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00016-1)
- McCallister, M.; Mandelman, J.; Bonfil, R.; Danylchuk, A.; Sales, M.; Ajemian, M. (2020). First observation of mating behavior in three species of pelagic myliobatiformes rays in the wild. **Environmental Biology of Fishes**, 103: 163-173.
- Miles, L. G.; Lance, S. L.; Isberg, S. R.; Moran, C.; Glenn, T. C. (2009). Cross-species amplification of microsatellites in crocodylians: Assessment and applications for the future. **Conservation Genetics** 10:935–954.

Morin, P. A.; Luikart, G.; Wayne, R. K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 19, 208–216.

Morin, P. A.; Manaster, C.; Mesnick, S. L.; Holland, R. (2009). Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with allelogram. **Mol Ecol Resour.**;9:1451–5.

Nevatte, R. J.; Williamson, J. E.; Gillings, M. R. (2023) First evidence of multiple paternity and hybridisation in Australian sawsharks. **Marine and Freshwater Research** 74, 586–600. Doi <https://doi.org/10.1071/MF22234>

Oliveira, A. T. (2008). **Caracterização hematológica de Potamotrygon cf. histrix: subsídios ao manejo e conservação da espécie**. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em diversidade biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus

Pamilo, P. (1989). Estimating Relatedness in social groups. **Trends Ecol Evol.** 4, 16–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90091-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90091-8)

Ritter, E. K.; Amin, R. W. (2018). Mating scars among sharks: evidence of coercive mating? **Acta Ethol** 22:1–8. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10211-018-0301-z>

Rosa, R. S.; Charvet-Almeida, P.; Quijada, C. C. D. (2010) Biology of the South American Potamotrygonid stingrays. In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (eds) *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation.*, **CRC Press**, Boca Raton, p. 241–281.

Rossouw, C.; Wintner, S. P.; Bester-Van, D. M. A. E. (2016) Assessing multiple paternity in three commercially exploited shark species: *Mustelus mustelus*, *Carcharhinus obscurus* and *Sphyrna lewini*. **J Fish Biol** 89:1125–1141. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.12996>

Shibuya, A.; Duncan, W.P. (2022). Pre-copulatory bite wounds as evidence of aggressive competition for mating in the neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. **Acta Amazonica** 52: 45-48.

Shibuya, A.; Duncan, W.P. (2022). Pre-copulatory bite wounds as evidence of aggressive competition for mating in the neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. **Acta Amazonica** 52: 45-48.

Souza, B. C. (2021). **Composição genética da raia viola *Pseudobatos percellens* (elasmobranchii: rhinobatidae) utilizando SNPs**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu.

Torres, Y.; Charvet, P.; Faria, V. V.; e de Castro, A. L. F. (2022). Evidence of multiple paternity for the endemic Xingu River stingray. **Journal of Fish Biology**, 100 (5), 1315-1318. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.15038>

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. e Shipley, P. (2004), MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4: 535-538. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Zimmerman, S. J.; Aldridge, C. L. e Oyler-McCance, S. J. (2020). An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. **BMC Genomics**. 21, 382. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9>