



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DOUTORADO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

**GENÔMICA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE PAINEL
MICROSSATÉLITE PARA A ARRAIA NEGRA *Potamotrygon leopoldi* PARA FINS
DE RASTREABILIDADE**

BELÉM/PARÁ
2023

SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

**GENÔMICA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE PAINEL
MICROSSATÉLITE PARA A ARRAIA NEGRA *Potamotrygon leopoldi* PARA FINS
DE RASTREABILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof.º Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

BELÉM
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G934g

Guerreiro, Sávio Lucas de Matos.
GENÔMICA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE

PAINEL MICROSSATÉLITE PARA A ARRAIA NEGRA *Potamotrygon leopoldi* PARA
FINS DE RASTREABILIDADE / Sávio Lucas de Matos Guerreiro. — 2023.

117 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2023.

1. NGS. 2. Peixe ornamental. 3. SSR. 4. Painel multiplex. 5. Potamotrygonidae. I. Título.

CDD 576.58

SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

**GENÔMICA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE PAINEL
MICROSSATÉLITE PARA A ARRAIA NEGRA *Potamotrygon leopoldi* PARA FINS
DE RASTREABILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof.º Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Data de aprovação: ___/___/___

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS
Orientador - UFPA

Prof. Dr.^a MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO
Examinador Interno – UFPA

Prof. Dr. IGOR GUERREIRO HAMOY
Examinador Externo– UFRA

Prof. Dr. JORGE ESTEFANO SANTANA DE SOUZA
Examinador Externo – UFRN

Prof. Dr. LUCIANO FOGAÇA DE ASSIS MONTAG
Examinador Externo - UFPA

Dedico essa tese de doutorado aos meus pais Mário e Lucinda que sempre me instruíram nos estudos e deram apoio incondicional para a realização desse trabalho. A Ana Flávia pela cumplicidade, parceria e por sempre me incentivar.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

1. Instituições Participantes

i. Universidade Federal do Pará (UFPA):

- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

ii. Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA):

- Laboratório de Genética Aplicada (LGA) do Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos.

iii. Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMAS):

- Gerência de Fauna, Aquicultura e Pesca (GEFAP).

iv. Instituto Tecnológico Vale (ITV)

v. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

- Centro Multiusuário de Bioinformática – BioME.

2. Fontes Financiadoras

i. Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMAS)

ii. Laboratório de Genética Humana e Médica

iii. Instituto Tecnológico da Vale - ITV

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria quando foi necessário e me proporcionar oportunidades de aprendizado.

Ao meu orientador Dr. Sidney Santos e Dra. Ândrea Ribeiro dos Santos pelas oportunidades concedidas, por confiar no meu trabalho como doutorando, bem como as contribuições de cunho científico e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Dr. Igor Hamoy por toda o conhecimento repassado em minha graduação e Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais e pela parceria nos projetos que resultaram em meu doutorado.

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e Universidade Federal do Rio Grande do Norte por toda a infra estrutura e referência de pesquisa no norte e nordeste do Brasil.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Humana e Médica: Adenilson, Caio, Gil, Rafaella, Maria Clara, Catarina, Cintia, Rebecca, Felipe, Mateus, Thiago, Erick, Giordano, Giovanna, Leandro, Laura, Lais, Arthur, Gabrielle, Miguel, Tatiane, Pablo, Wallacy. Obrigado por sempre me incentivaram no desenvolvimento do meu trabalho e sanar minhas dúvidas quando necessário e pelos momentos de convivência que tornaram o processo bem mais tranquilo. E deixo meu agradecimento especial ao Dr. Caio Silva e Dra. Amanda Vidal que mesmo na pandemia não mediram esforços para me auxiliar na conclusão desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada Palmira, André, Sayumi que sempre estiveram ao meu lado no decorrer dos projetos para o doutorado e pelos momentos de convivência.

Aos amigos do BioME, que me receberam em Natal – RN e me auxiliaram na montagem do genoma, do mitogenoma da *P. leopoldi*. Especialmente ao Prof. Dr. Jorge Estefano Santana de Souza e Prof. Dr. Sandro Souza que me proporcionaram todo o aparato para que esse trabalho fosse desenvolvido. Aos alunos do BioME que fizeram a estadia em Natal ser mais leve e mais produtiva.

Ao Instituto Tecnológico da Vale que me proporcionou a infra estrutura para sequenciamento e realizar a obtenção de *reads* longas. Especialmente à Dra. Amanda Vidal, Dr. Guilherme Oliveira e Dr. Éder Pires.

Ao Secretário de Meio Ambiente do Estado do Pará José Mauro Ó' de Almeida e aos Servidores da SEMAS (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade) Palmira Gonçalves, Talita Praxedes, Sheila Miranda (*in memoriam*), Marcos Brito, Thadeu Cantão, Eva Grelo que me deram suporte total na coleta das amostras de arraia e por concede-las para meu projeto. Sem vocês esse trabalho não seria possível, meus sinceros agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo ensino em excelência e todo o suporte fornecido durante o período de doutoramento, sou extremamente grato por toda as oportunidades e pelo aprendizado.

Aos meus pais Mário e Lucinda Guerreiro e minha maninha Anna Klara que sempre foram meu porto seguro e pelo apoio proporcionado na caminhada para chegar ao processo de doutoramento, sem vocês a caminhada seria mais árdua. Deixo registrado o meu muito obrigado pelo apoio e por sempre acreditar em meu potencial.

A minha namorada Ana Flávia Brito Rodrigues por abdicar dos momentos de convivência para que pudesse executar esse trabalho e sempre me incentivar e apoiar nos momentos mais difíceis no decorrer do trabalho.

Agradeço a todos que estiveram envolvidos direta e indiretamente nesse trabalho.

RESUMO

A *Potamotrygon leopoldi* Castex & Castello, 1970 é um dos peixes ornamentais mais comercializados a nível internacional, esta espécie é um dos exemplares que compõe as arraias de água doce e é membro da família *Potamotrygonidae* que são endêmicas da América do Sul. A *P. leopoldi* possui o controle de captura gerenciado pelo IBAMA e eventualmente existem tentativas de fraude no processo de captura e exportação, no qual se faz necessários estudos genéticos para a rastreabilidade de origem dos animais exportados, haja vista que existem relatos de reprodução desta espécie em cativeiro. Com a necessidade de aquisição de dados novos para a criação de tecnologias mais rebuscadas os órgãos de fiscalização começam a perceber a necessidade do uso da biologia molecular como meio para tal controle. O sequenciamento de nova geração é uma das ferramentas imprescindíveis pra obter dados genômicos, com o auxílio de ferramentas de bioinformática é possível explorar os dados obtidos com a finalidade realizar a montagem do genoma da *P. leopoldi*. Inicialmente utilizando os dados proveniente do sequenciamento do *draft* de genoma da *P. leopoldi* foi possível montar o mitogenoma, realizando a primeira descrição para a espécie e entendendo como este se comporta. Neste trabalho foram realizadas diversas análises como sintonia gênica, reconstrução da árvore filogenética por meio de estatística bayesiana, e análise de seleção positiva de genes no mitogenoma, proporcionando diversas inferências a partir dos dados obtidos. Como resultado dessas análises conseguiu-se verificar que o mitogenoma da *P. leopoldi* se encontra em um clado monofilético da família *Potamotrygonidae*, e quando comparado o arranjo dos genes podemos evidenciar que há um padrão altamente conservado dentro da família *Potamotrygonidae* e com algumas alterações quando confrontada com exemplares de origem marinha, nas análises de seleção positiva foi encontrado sítios em seleção positiva nos genes ND1, ND4, ND5, COX I, e COX II que foram previamente associados à transição de organismos aquáticos da água salgada para a água doce, evidenciando um passado evolutivo dos espécimes de *P. leopoldi*. Além disso, utilizando os dados de sequenciamento parcial do genoma de *P. leopoldi* estudou-se o genoma nuclear, possibilitando a criação de bases para novos estudos com a espécie. O trabalho realizou buscas no genoma nuclear onde foram identificadas cerca de 37.000 regiões de microssatélites e filtrados posteriormente para a seleção de 5 marcadores para realizar o painel multiplex, foram alguns critérios de seleção tais como a busca por microssatélites tetranucleotídeos sendo repetido no mínimo 15 vezes e no máximo 20 vezes e a partir dessa busca foram desenhados os primers, com todos os critérios necessários para evitar a formação de *hairpin* e dímeros de *primer*. Desta foram realizadas PCR's para a padronização do painel multiplex. Com este sistema é possível realizar os trabalhos de genética de população, taxonomia, melhoramento genético e fiscalização por meio da paternidade dos animais reproduzidos em cativeiro, cruzando os dados com as matrizes, dessa forma conseguimos avaliar se os juvenis são de cativeiro ou selvagens.

Palavras-chave: NGS, peixe ornamental, multiplex, *Potamotrygonidae*, Amazônia

ABSTRACT

The *Potamotrygon leopoldi* Castex & Castello, 1970 is one of the most internationally traded ornamental fish. This species is one of the specimens that make up freshwater rays and is a member of the Potamotrygonidae family, which is endemic to South America. The capture of *P. leopoldi* is managed by IBAMA, and there are occasional attempts at fraud in the capture and export process. Genetic studies are necessary for traceability of the origin of exported animals, especially considering reports of breeding this species in captivity. With the need for new data to develop more sophisticated technologies, regulatory agencies are beginning to recognize the need for the use of molecular biology as a means of control. Next-generation sequencing is one of the indispensable tools for obtaining genomic data, and with the help of bioinformatics tools, it is possible to explore the data obtained to assemble the genome of *P. leopoldi*. Initially, using data from the sequencing of the draft genome of *P. leopoldi*, it was possible to assemble the mitogenome, providing the first description of the species and understanding its behavior. Various analyses, such as gene synteny, reconstruction of the phylogenetic tree using Bayesian statistics, and analysis of positive selection of genes in the mitogenome, were conducted, leading to multiple inferences from the data. Results from these analyses revealed that the mitogenome of *P. leopoldi* is in a monophyletic clade of the Potamotrygonidae family. When comparing gene arrangements, a highly conserved pattern within the Potamotrygonidae family was evident, with some alterations when compared to specimens of marine origin. Positive selection analyses identified sites in positive selection in genes ND1, ND4, ND5, COX I, and COX II, previously associated with the transition of aquatic organisms from saltwater to freshwater, indicating an evolutionary history of *P. leopoldi* specimens. Additionally, using partial genome sequencing data of *P. leopoldi*, the nuclear genome was studied, laying the groundwork for further studies with the species. The search in the nuclear genome identified approximately 37,000 microsatellite regions, later filtered for the selection of 5 markers to create the multiplex panel. Selection criteria included the search for tetranucleotide microsatellites repeated at least 15 times and at most 20 times. Primers were designed with all necessary criteria to avoid hairpin and primer dimer formation. PCR was performed for the standardization of the multiplex panel. With this system, population genetics, taxonomy, genetic improvement, and monitoring through animal parentage in captivity can be carried out. By cross-referencing data with the matrices, it is possible to assess whether juveniles are captive-bred or wild-caught.

Keywords: NGS, ornamental fish, multiplex, *Potamotrygonidae*

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 01- Distribuição da arraia negra *P. leopoldi*.

Figura 02 – Exemplar de *P. leopoldi*.

Figura 03 – Registro de importação de peixes ornamentais em milhões de dólares.

Figura 04 – Linha do tempo do avanço das tecnologias de nova geração de sequenciamento.

Figura 05 – Workflow detalhado do sequenciamento de Nova geração na plataforma PacBio.

Figura 06 – Boxplot de *scores Phred* para mensurar a qualidade em cada posição sequenciada do genoma.

Figura 07 – *Workflow* para montagem de genomas.

Figura 08 – Estrutura do genoma mitocondrial da espécie *P. leopoldi* para demonstração das estruturas.

Figura 09 – Estrutura e classificação dos marcadores microssatélites quanto ao tamanho de repetição

Figura 10 – *Slippage* representado durante a replicação de DNA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Software para montagem de genoma de acordo com o tamanho das *reads*.

LISTA DE SIGLAS

CITES III – *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

NGS – *Next Generation Sequencing*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

STR - *Short Tandem Repeat*

SSR – *Simple Sequence Repeat*

SEMAS – Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade

LISTA DE ABREVIATURAS

CITES – *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

NGS – *Next Generation Sequencing*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

STR - *Short Tandem Repeat*

SSR – *Simple Sequence Repeat*

SEMAS – Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações gerais.....	17
1.2. Ictiofauna Neotropical	18
1.3. Biologia da <i>P. leopoldi</i>	20
1.4. Exportação das arraias de água doce.....	22
1.5. Sequenciamento de DNA em larga escala.....	24
1.5.1. Sequenciamento de primeira geração – Sanger	24
1.5.2. <i>Next Generation Sequencing</i> – NGS.....	25
1.6. Sequenciamento PacBio.....	26
1.7. Montagem de genomas	28
1.8. Genética e conservação de recursos pesqueiros	37
1.9. Marcadores moleculares.....	39
1.9.1. Marcadores microssatélites	40
1.10. Estudos genéticos com Potamotrygonídeos	46
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos específicos	48
3. CAPÍTULO I -	49
<i>Whole genome sequencing of the white blotched river stingray (Potamotrygon leopoldi)</i>	49
INTRODUCTION	50
MATERIALS AND METHODS.....	51
RESULTS AND DISCUSSION.....	53
REFERENCE.....	54
4. CAPÍTULO II -	56
<i>Characterization of mitochondrial genome of the endangered freshwater stingray P. leopoldi from Xingu River, Brazil</i>	56
5. CAPÍTULO III –	81
ABSTRACT	82
MATERIAL AND METHODS	84
RESULTS AND DISCUSSION.....	87
REFERENCES	92

6. Discussão Geral	94
REFERÊNCIAS	98
1. Artigos publicados.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Estudos envolvendo sequenciamento de genoma estão se tornando cada vez mais comuns, especialmente devido a popularização das tecnologias de sequenciamento de nova geração que possibilitou o barateamento do preço por pares de bases sequenciados. Em consequência do aumento da geração de dados está aumentando de forma linear o número de genomas em forma de rascunho e completos disponíveis para uma grande variedade de espécies, com isso, a tecnologia de sequenciamento de nova geração vai se popularizando com espécies não-modelo, fazendo com que a ferramenta seja utilizada para diversas finalidades (ALHAKAMI *et al.*, 2017; GOODWIN *et al.*, 2016; PHILLIPPY, 2017).

Devido a recente popularização das técnicas em biologia molecular, poucos estudos foram desenvolvidos para os elasmobrânquios, que possuem uma série de perguntas que variam desde uma série de discordância em relação a aspectos populacionais até a identificação de origem dos animais, especialmente os que sofrem pressão elevada de pesca e são controlados por órgãos governamentais (CITES, 2023; ICMBIO, 2019), dentre essas espécies de elasmobrânquios podemos citar as arraias de água doce que atualmente são controlados por órgãos ambientais com o intuito de proteger as espécies da pesca predatória e também devido ao fato de que estas possuem uma estratégia reprodutiva que confere uma característica inerente das espécies de arraias, por serem ovovivíparas a prole é bem menor do que os demais organismos aquáticos, fazendo com que haja prejuízos no recrutamento de juvenis para a população (PEREIRA *et al.*, 2022; TORRES; FARIA; *et al.*, 2022).

Com o surgimento das tecnologias de Sequenciamento de Nova geração (NGS) a obtenção de dados genômicos foi revolucionada, foi possibilitado um acesso sem precedentes aos dados para espécies não-modelo e dessa forma contribuir para o avanço em investigações ecológicas, identificação de novas espécies, entender relações ecológicas, criar ferramentas para certificação de origem e dentre outras aplicações. Os condrictes de modo geral possuem características interessantes para a realização de estudos mais aprofundados como: uma capacidade de cicatrização extraordinária e capacidades imunológicas, alta estabilidade no genoma e uma ampla gama de estratégias reprodutivas, sendo estas características desejáveis para a condução de estudos utilizando como espécie modelo (CHIN *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; MARRA *et al.*, 2019; REIF, 1978; VENKATESH *et al.*, 2014). Com alta

divergência entre as espécies de condrictes as adaptações ou parte delas contribuem diretamente para a sobrevivência durante a longa história de vida desses animais e podem ter contribuído para o sucesso evolutivo de muitas delas. O genoma dos condrictes oferecem uma excelente oportunidade para estudar os mecanismos envolvidos na resiliência evolutiva, bem como para compreender os mecanismos de estabilidade do genoma e sua capacidade imunológica (JOHRI *et al.*, 2019).

As espécies da família *Potamotrygonidae* de modo geral ainda não foram amplamente beneficiados com o advento do NGS, foi publicado apenas um genoma completo para espécies de água doce, e cinco genomas mitocondriais, sendo esta uma atividade pioneira que pode influenciar em diversas descobertas para a família em questão, bem como buscar marcadores confiáveis, afim de estimar índices de diversidade genética, entender a estrutura populacional e criar banco de dados de matrizes, como fora realizado para animais que possuem restrição de captura e são alvo de captura para fins econômicos (GONÇALVES; WASKO, 2013; HOLMAN *et al.*, 2017; ROBLEDO *et al.*, 2018; RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2022).

Atualmente, poucos estudos em potamotrygonídeos estão relacionados com a utilização de marcadores microssatélites com a finalidade de rastreabilidade, dessa forma o presente estudo visa além de fornecer os dados genômicos para estudos futuros, desenvolver um painel capaz de realizar a identificação molecular por meio de marcadores microssatélites, podendo ser utilizado como ferramenta de fiscalização para os órgãos competentes em diversas situações, especialmente nas fraudes.

1.2. Ictiofauna Neotropical

As águas dulcícolas da região Neotropical (compreende América do sul e América Central) abrigam em torno de 20 a 25% da biodiversidade de peixes dulcícolas do mundo, atualmente incluindo mais de 6.000 espécies com estimativas variando de 8.000 a 9.000 espécies divididos entre Condrictes e Osteíctes (REIS *et al.*, 2016). Essa enorme diversidade está concentrada em menos 1% da água doce disponível no planeta, considerando que os habitats dulcícolas disponíveis incluem menos de 0,01% de toda a água do planeta, sendo os sistemas de água doce neotropicais detentores de apenas 30% desse total (FERRARIS, 2000; MALABARBA; MALABARBA, 2020; VARI; MALABARBA, 1998).

Os condrictes estão diretamente ligados aos tubarões, arraia e quimeras são um dos vertebrados mais antigos e tem preocupação muito especial para a conservação. Atualmente 91 espécies encontram-se em perigo crítico de extinção e 124 em extinção, 182 espécies vulneráveis, 125 quase ameaçadas, 529 espécies em menor preocupação e 173 possuem dados deficientes (IUCN, 2023). Muitas espécies de condrictes são capturadas para fins alimentícios, obtenção de óleo, pele, barbatanas, além disso se faz a captura de animais vivos visando atender o comércio ornamental. Pressões ocasionadas pela pesca incidem diariamente sobre as populações de condrictes por inúmeras formas, sendo as mais comuns as capturas acidentais e direcionadas, perda de habitat e mudanças climáticas (LUCIFORA *et al.*, 2017). As capturas direcionadas são um dos grandes fatores que levam a insustentabilidade e declínio de muitas populações, especialmente aquelas que é utilizada para fins alimentícios e de aquarismo, levando estas populações a situações de extinção local ou regional (NETO, 2011). Além disso, a biologia das espécies de condrictes contribui para a baixa taxa de recrutamento de juvenis em detrimento da quantidade de espécimes que é capturado, levando isso a uma problemática que pode causar o risco de extinção. A maioria das espécies de condrictes apresentam crescimento lento, baixa fecundidade e alta longevidade, o que limita a capacidade de recuperação do esgotamento populacional, especialmente quando a espécie é alvo de captura intencional (FRICKE *et al.*, 2020).

Na Amazônia existem diversos ecossistemas aquáticos que são capazes de abrigar uma enorme biodiversidade e podemos citar a bacia do Xingu como um importante ecossistema que abriga um grande contingente da diversidade de espécies que são utilizadas para fins ornamentais, possuindo 50% da bacia protegida por terras indígenas e unidades de conservação federais e estaduais (ICMBIO, 2019). A bacia do Xingu é resultante de uma série de eventos geológicos, em contraste com a bacia amazônica os tributários do Xingu são caracterizados por processos estáveis de erosão e sedimentação (hydrochemistry and geology in the brazilian amazon region 1968). Esses processos ecológicos moldaram por muitos anos a paisagem da bacia do Xingu, que resultou na formação de cachoeiras e corredeiras ao longo de toda a bacia, dessa forma, se torna um ambiente ideal para a formação de micro habitats. A paisagem em conjunto com a formação dos micros habitats sugerem o favorecimento de condições ideais para uma ampla biodiversidade, bem como os padrões de distribuição das mesmas. A estimativa é de que na bacia do Xingu há aproximadamente 600 espécies distribuídas ao longo de suas corredeiras (CAMARGO *et al.*, 2004).

1.3. Biologia da *P. leopoldi*

A arraia de água doce *Potamotrygon leopoldi*, que também é conhecida como arraia negra do Xingu, arraia leopoldi, ou em países estrangeiros é chamada white-blotched stingray. É uma espécie da fauna amazônica encontrada em águas dulcícolas da bacia do rio Xingu, na região amazônica do Brasil (CHARVET-ALMEIDA; DE ARAÚJO; *et al.*, 2005).

As arraias de água doce possuem o seguinte sumário taxonômico: são da classe Condrichthyes, Subclasse Elasmobranchii, Ordem Myliobatiformes. A família Potamotrygonidae é a única família de arraias de água doce (CARVALHO *et al.*, 2003; ITIS). As arraias de água doce são distintas das arraias marinhas devido a diversos aspectos morfológicos e fisiológicos, podemos citar a pélvis com um antero mediano bem desenvolvido (BIGELOW; SCHROEDER, 1953; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; GARMAN, 1877; RIBEIRO, 1923; THORSON; WATSON, 1975) e baixa concentração de ureia no sangue e fluidos (BROOKS *et al.*, 1981; THORSON *et al.*, 1967; THORSON; LACY, 1982; WOOD *et al.*, 2002). São caracterizados pelo corpo em formato de disco, com um prolongamento de uma nadadeira caudal em formato de chicote apresentando estrutura um ferrão para defesa, os animais adultos podem medir desde 25cm a 100cm de disco em algumas espécies (CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003).

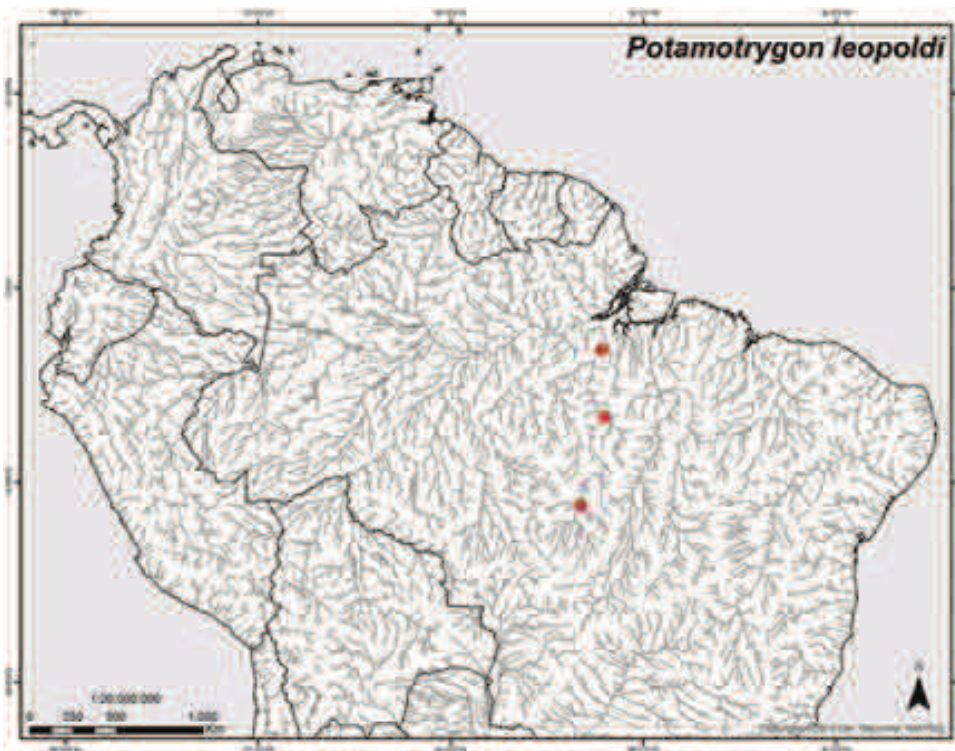
A família Potamotrygonidae conta com quatro gêneros válidos que são: Paratrygon, Plesiotrygon, Heliotrygon e Potamotrygon (CARVALHO; RAGNO, 2011; CHARVET-ALMEIDA; GÊNES, 2008; DE CARVALHO; LOVEJOY, 2011; GARMAN, 1877; ROSA *et al.*, 1987). Segundo DE CARVALHO e LOVEJOY (2011) o gênero Heliotrygon é grupo irmão do Paratrygon e junto formam um clado irmão dos outros dois gêneros. De acordo com CARVALHO; LOVEJOY e ROSA (2003) os principais problemas relacionados a identificação desse grupo de peixes se devem aos critérios utilizados nas chaves dicotômicas, o que envolve principalmente a coloração dorsal do animal, por sua vez, esse critério culmina em problemas taxonômicos pois algumas arraias possuem poli cromatismo.

Algumas espécies de arraias de água doce possuem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente toda a bacia amazônica como as espécies *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi*. Entretanto, outras são endêmicas como, por exemplo a *P. leopoldi* no rio Xingu (CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; LASSO *et al.*, 2016).

Dentre as espécies utilizadas para fins ornamentais a *P. leopoldi* é considerada uma das principais quando se trata de arraias ornamentais da família Potamotrygonidae exploradas na América do Sul. Nesta família há pelo menos 20 espécies válidas e sendo atualizada constantemente (PAXIUBA *et al.*, 2010).

LASSO *et al.* (2016) faz relatos de que a espécie *P. leopoldi* possui uma distribuição geográfica limitada a ocorrências na Amazônia brasileira, especificamente no Rio Xingu, onde é citado a parte baixa das bacias do Rio Xingu, incluindo um sub bacia do mesmo denominado rio Iriri (Figura 1).

Figura 01- Distribuição da arraia negra *P. leopoldi*



Fonte: LOBODA *et al.* (2013)

A *P. leopoldi* é uma espécie que possui características inerentes e de fácil identificação, dentre eles podemos citar a região dorsal com uma coloração cinza escuro a enegrecido, apresentando ocelos brancos ou amarelos com formas irregulares em direção ao centro do disco e circulares junto as margens do disco, estendendo-se sobre a nadadeira caudal, nesta nadadeira apresenta espinhos caudais médios dispostos em três séries paralelas, possui um corpo plano e arredondado, geralmente com diâmetro de disco variando entre 30 a 70 cm (Figura 01). Esta espécie difere da *Potamotrygon henlei* pelo numero superior de dentes, no qual a *P. henlei* apresenta 14 a 26 filas longitudinais e a *P. leopoldi* de 23 a 35 fileiras (LASSO *et al.*, 2016).

A alimentação da *P. leopoldi* é baseada principalmente em peixes, mas também podem ser incluídos crustáceos, moluscos e invertebrados. Elas são predadoras eficientes e utilizam dos seus sentidos para a detecção de presas e estratégias para captura-las no fundo do rio (CHARVET-ALMEIDA; SILVA; *et al.*, 2005).

As arraias de água doce têm a sua reprodução sexuada e com fecundação interna, podendo ser descrita como matrotífica vivípara, com o desenvolvimento interno das formas jovens, alimentados por trofonemata produzida pela fêmea no processo gestacional, a posteriori os filhotes são expelidos para a água antes de completarem seu estágio de maturação, cada ninhada pode ter entre 1 a 8 juvenis, os filhotes nascem com cerca de 10 cm de diâmetro de disco e são independentes, caracterizando a espécie com uma estratégia reprodutiva com baixo cuidado parental (SANTOS *et al.*, 1984; STEVENS *et al.*, 2000).

A *P. leopoldi* possui hábitos noturnos e geralmente passa o dia enterrada na areia, em fundos lamosos ou no lodo no fundo do rio. À noite os espécimes se tornam mais ativos e saem em busca de alimento. Assim como outras arraias de água doce, a *Potamotrygon leopoldi* é uma espécie de grande importância cultural e econômica para as populações locais. Ela é usada na alimentação, na medicina tradicional e é valorizada como animal de estimação no comércio de aquários. No entanto, a pesca excessiva e o comércio descontrolado podem representar uma ameaça para a espécie e seus ecossistemas naturais (TORRES; FARIA; CHARVET, 2022).

Figura 02- Exemplar de *P. leopoldi*



Fonte: Dallas World Aquarium, Arquivo pessoal.

1.4. Exportação das arraias de água doce

No Brasil, a exportação das arraias de água doce é regulamentada por um órgão institucional denominado Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela Convenção sobre o Comércio Internacional das espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), que atualmente inseriu a *P. leopoldi* no Apêndice II, o que confere a esta espécie ferramentas de proteção ambiental para evitar a extinção da espécie.

De acordo com a legislação brasileira vigente, é proibida a comercialização na modalidade de exportação das arraias de água doce que não estejam inclusas nos programas de conservação e manejo sustentável reconhecidos pelo IBAMA. Além disso, as exportações precisam seguir regras estabelecidas pela CITES que incluem uma série de certificações e permissões prévias para a exportação, bem como a necessidade de documentos e certificações que as espécies exportadas não estão ameaçadas nas regiões em que são capturadas (CITES, 2023).

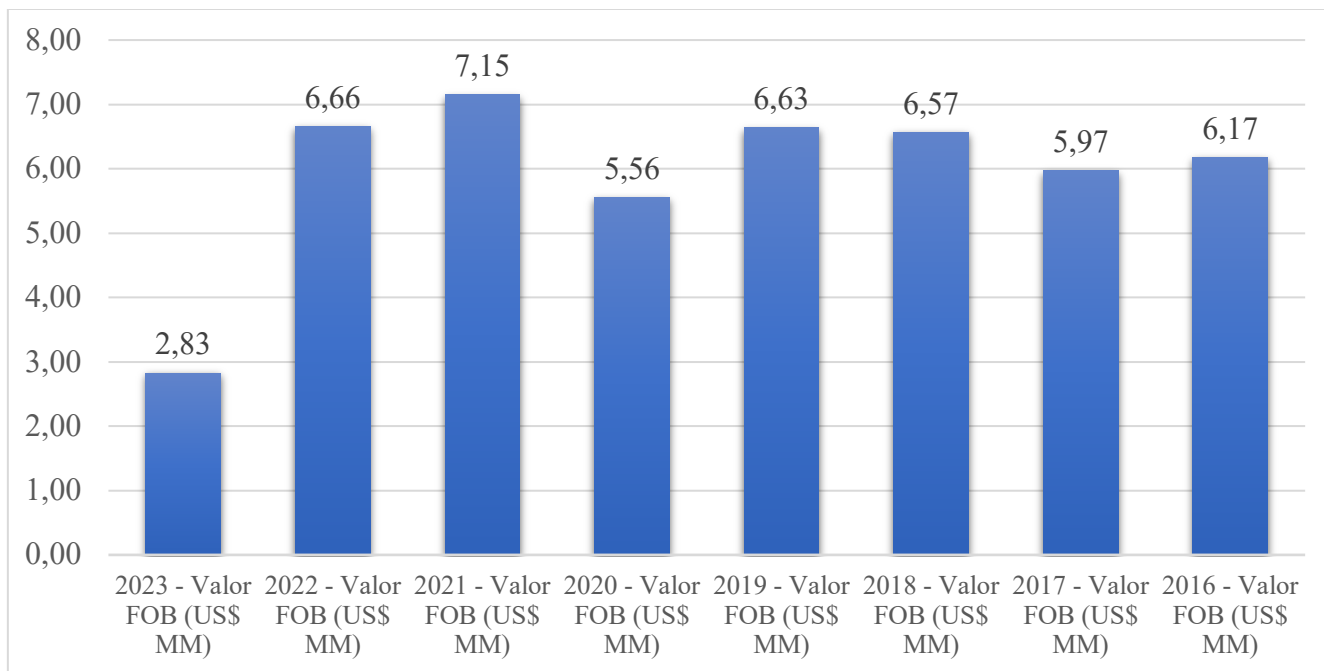
A exportação de arraias de água doce do Brasil é geralmente realizada para fins ornamentais. É importante ressaltar que, apesar de a exportação de arraias ser regulamentada, a captura indiscriminada e ilegal desses animais pode levar à redução de suas populações e afetar a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos. Por isso, é fundamental que a exportação seja feita de forma sustentável e responsável, com o objetivo de preservar a biodiversidade brasileira.

Na região amazônica as arraias de água doce possuem uma baixa importância quanto ao consumo humano, porém representam um produto vivo utilizado para fins de ornamentação, o que incide no direcionamento da captura. Nos últimos dados oficiais a exportação de peixes ornamentais tem movimentado um mercado muito grande, cerca de 6 milhões de dólares por ano (Figura 02), o que demonstra a importância da atividade. A demanda internacional por algumas espécies dirige os esforços de pesca no Brasil (PAXIUBA; INOMATA; MARISA; FERNANDES, 2010). A *P. leopoldi* por sua vez é bastante apreciada no mercado internacional, devido a sua distribuição estar restrita ao rio Xingu e seus afluentes e pelo formato dos desenhos no seu corpo (CHARVET *et al.*, 2018).

Além disso, as espécies de arraias de água doce possuem um papel fundamental dentro da biologia do habitat em que estão inseridas; caso contrário, elas não adentrariam no âmbito das pescarias ornamentais, que visam entender como está sendo realizado o processo de captura,

e buscando evidências científicas para a conservação dos estoques pesqueiros das espécies em estudo. Os dados apresentados pelo Ministério da Economia, Indústria e Comércio Exterior e Serviços do Brasil demonstram que o comércio de peixes ornamentais de água doce movimentou 2,3 milhões de dólares no ano de 2023 (Figura 03) (COMEXSTAT, 2023).

Figura 03- Registro de importação de peixes ornamentais em milhões de dólares.



Fonte: Comexstat, 2023

1.5. Sequenciamento de DNA em larga escala

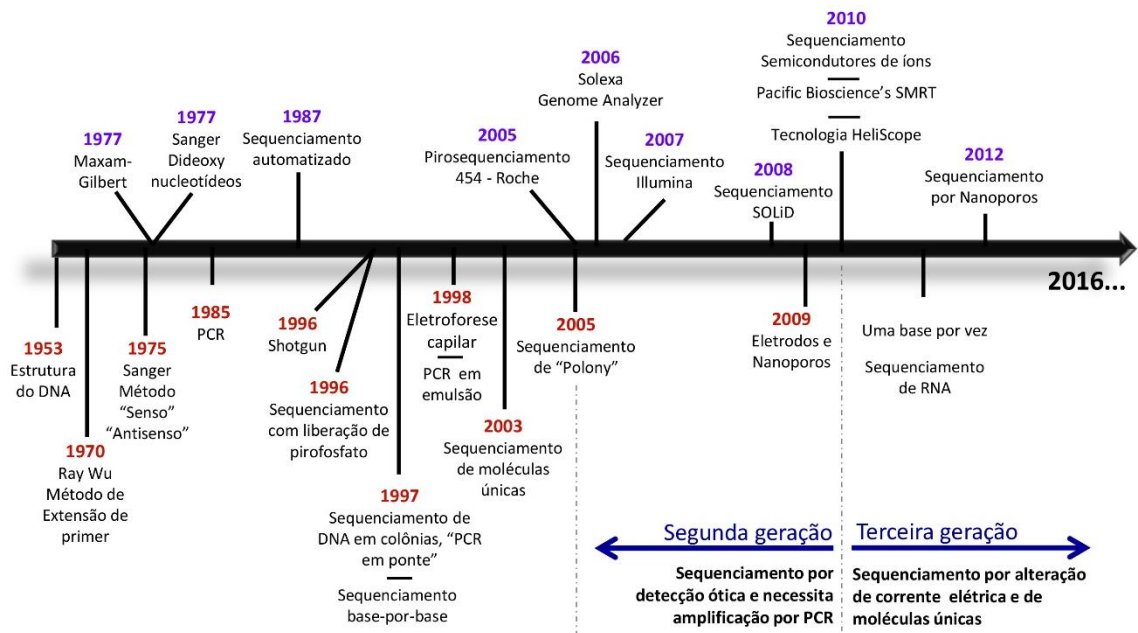
1.5.1. Sequenciamento de primeira geração – Sanger

Em 1977, o cientista inglês Frederick Sanger descreveu uma metodologia que impulsionaria a obtenção das sequências de DNA, posteriormente denominado sequenciamento de Sanger ou dideoxinucleotídeos. O método de Sanger foi o único método de sequenciamento conhecido por pelo menos três décadas, servindo de base para a era genômica. O período se caracterizou pelos avanços tecnológicos, especialmente pela automatização do sistema de sequenciamento e análises dos fragmentos de DNA, o que permitiu o sequenciamento de um

grande número de genomas completos de diversos organismos, mesmo que demandando muito tempo para a finalização (KCHOUK *et al.*, 2017).

Apesar da descoberta possuir um grande valor científico, existia a necessidade de um sequenciamento com custos menores, maior rapidez no processamento dos dados e maior eficiência. Com isso, novas estratégias de sequenciamento estavam sendo criadas para fomentar a necessidade de maior aquisição de dados em um tempo menor (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). Com o avanço das metodologias o volume de dados é de 2 a 3 vezes superior aos dados obtidos pela tecnologia Sanger, a um custo bem inferior, podemos verificar o avanço da tecnologia na linha do tempo ilustrada na Figura 04.

Figura 04- Linha do tempo do avanço das tecnologias de nova geração de sequenciamento.



1.5.2. Next Generation Sequencing – NGS

As ferramentas de sequenciamento de nova geração têm ganhado alta visibilidade nas últimas décadas. As mudanças começaram por meio do sequenciamento automatizado de Sanger, e após isto novas plataformas foram criadas e atualmente são reconhecidas como Sequenciamento de Nova Geração (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

As mudanças na aquisição de dados possibilitaram a obtenção de forma mais rápida na produção de dados genéticos, podemos citar a velocidade de sequenciamento de genoma completo e de transcriptoma, além disso o custo operacional para a realização dessas atividades estão cada vez mais baixos. Isso possibilitou o aumento dos projetos que utilizam a genômica estrutural e funcional em todo o mundo, o que tornou de fácil acesso o sequenciamento de espécies modelos e não modelos (METZKER, 2010).

O sequenciamento de nova geração é classificado atualmente em 4 gerações distintas. A primeira delas compreende os métodos de sequenciamento por eletroforese, a segunda são os sequenciamentos por meio de síntese ou sequenciamento por ligação e piro sequenciamento, a terceira, está associada ao sequenciamento de moléculas individuais de DNA em tempo real, a quarta geração está associada a utilização de nanoporos, são sequenciamentos que utilizam metodologias de matrizes de fragmentos de DNA, em que cada ciclo decodifica poucos pares de bases da sequencia alvo, porém, o procedimento é realizado para bilhões de fragmentos de DNA com uma capacidade de decodificação muito alta em pouco tempo de sequenciamento (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; MARDIS, 2008; MCCOMBIE *et al.*, 2019).

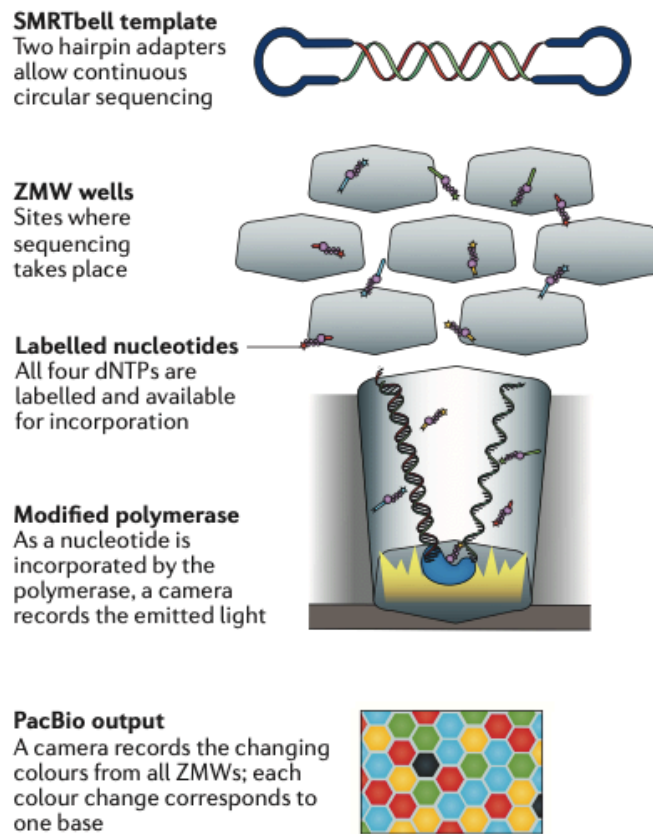
A gigantesca aquisição de dados que podem ser utilizadas em inúmeras linhas de pesquisa como: identificação de novas espécies (DUDGEON *et al.*, 2012), entender interações biológicas (HARA *et al.*, 2018), explorar relações evolutivas entre espécies, Aferir grau de parentesco entre indivíduos de uma mesma população (ABDUL-MUNEER, 2014). Ainda que hajam avanços grandiosos na genômica uma grande parcela dos organismos ainda não foi submetida a estudos utilizando essa tecnologia, especialmente os organismos aquáticos.

1.6. Sequenciamento PacBio

O sequenciamento via plataforma PacBio (Pacific Bioscience) é um dos avanços nas gerações de sequenciamento de nova geração. A tecnologia criada pela empresa *Pacific Bioscience* tem como fundamento a identificação dos nucleotídeos utilizando a tecnologia SMRT (*Single-Molecule Real-Time Sequencing*), sendo esta extremamente promissora na aquisição de *reads* longas no sequenciamento de nova geração. As bibliotecas são construídas utilizando adaptadores nos formatos de grampo que serão ligados as extremidades do DNA alvo, dessa forma a molécula resultante dessa etapa é uma dupla fita linear, porém os

adaptadores formam bolhas criando uma topologia circular. O DNA é submetido a um processo em nanoporos situados em um suporte de vidro (*zero-mode waveguides* - ZMWs) junto com uma DNA polimerase altamente ativa. A reação de polimerização ocorre desenrolando a fita e os nucleotídeos marcados são submetidos a uma câmera de alta resolução que fica situado no fundo da ZMW e esta registra a atividade dos fluoróforos e incorpora em tempo real. Como a molécula é circular os fragmentos são lidos diversas vezes no sentido *sense* e *antisense*, resultando em uma sequência consenso como podemos verificar na figura 05. A redundância nesses casos depende do tamanho do inserto, onde pequenos fragmentos apresentam uma redundância muito elevada e com isso aumenta consideravelmente a precisão da técnica. Entretanto, quando se submete insertos longos a tecnologia de sequenciamento SMTR, estas apresentam uma alta taxa de erros o que diminui consideravelmente a qualidade das *reads* obtidas, sendo necessário uma alta cobertura par reduzir a taxa de erros, especialmente quando se trata da montagem *de novo* de genomas, tanto para procariotos quanto para eucariotos. A tecnologia PacBio já foi utilizada para a montagem de diversos genomas, desde microrganismos, vertebrados, incluindo humanos (RHOADS; AU, 2015). Na maioria dos casos em que a taxa de erros se encontra alta, se faz necessário a utilização de tecnologias de segunda geração de NGS para a correção das *reads* obtidas pelo PacBio resultando em uma montagem mais robusta e de correções por meio de algoritmos usando a bioinformática como ferramenta (KOREN *et al.*, 2012).

Figura 05 – Workflow detalhado do sequenciamento de Nova geração na plataforma PacBio.



Fonte: GOODWIN; MCPHERSON e MCCOMBIE (2016)

1.7. Montagem de genomas

A montagem de genomas é um processo complexo de reconstrução do genoma completo de um organismo a partir de fragmentos de sequências de DNA obtidos por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS). Os estudos com sequenciamento de genoma têm se tornado comum devido ao baixo custo das tecnologias de sequenciamento. Em decorrência disso, o volume de dados está aumentando rapidamente e genomas completos e incompletos tem ficado disponíveis para uma grande variedade de espécies (ALHAKAMI; MIREBRAHIM; LONARDI, 2017; GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; PHILLIPPY, 2017).

Existem várias abordagens para a montagem de genomas, que variam de acordo com o tamanho do genoma, a qualidade e a cobertura dos dados de sequenciamento, bem como a disponibilidade de referências genômicas. Algumas técnicas incluem a montagem de sobreposição de *reads*, onde as sequências são sobrepostas para formar um consenso, a

montagem de grafos de De Bruijn, que utiliza uma estrutura de grafo para montar os fragmentos, e a montagem híbrida que combina dados de sequenciamento de diferentes gerações (CHEN *et al.*, 2020).

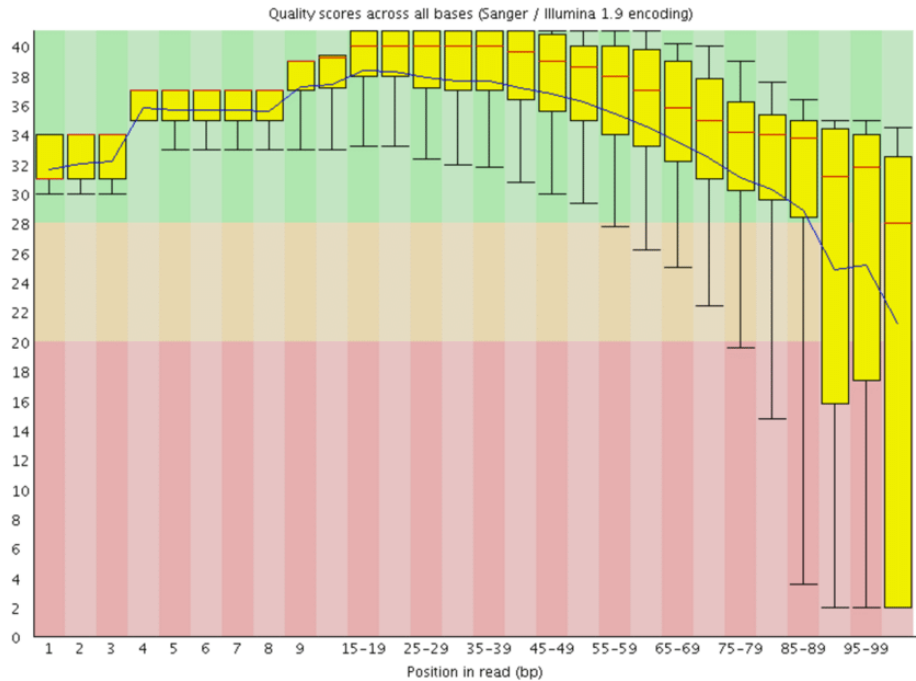
A montagem de genomas requer conhecimentos em biologia molecular, bioinformática e estatística, além de recursos computacionais para lidar com a grande quantidade de dados gerados pelo sequenciamento de nova geração. É uma ferramenta essencial para a pesquisa científica em diversas áreas, como biologia molecular, genética, evolução e biotecnologia (DENTON *et al.*, 2014; DOMINGUEZ DEL ANGEL *et al.*, 2018)

Existem duas maneiras de realizar a montagem do genoma, independentemente da plataforma de sequenciamento utilizada. A primeira é a montagem *de novo*, que é realizada exclusivamente a partir das sequências brutas geradas no estudo, sem a utilização de qualquer genoma de referência. A segunda é a montagem por mapeamento, que é aplicada quando um genoma já montado é conhecido e pode ser usado como referência para auxiliar na identificação de zonas repetitivas, redundâncias e erros no sequenciamento. Pode-se utilizar as diversas plataformas de sequenciamento de nova geração que entregam resultados distintos, como por exemplo, uma plataforma entrega como output *long reads* e outra *short reads* e utilizam ambos para realizar uma montagem, usando a *long reads* como referência e a *short reads* para a correção e preenchimento de prováveis *gaps* que possam surgir na montagem (ARIAS *et al.*, 2021; GOODWIN *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2020).

Em geral, o processo de montagem do genoma consiste em organizar um grande número de sequências curtas de DNA para compor cada cromossomo da espécie em estudo. O DNA é fragmentado em pedaços pequenos e subsequente sequenciado, gerando sequências que são alinhadas e sobrepostas para identificar regiões de sobreposição. Quanto mais curtas as sequências, maior o número de sobreposições identificadas.

A qualidade das *reads* é avaliada usando um score chamado *Phred*, que estima a confiabilidade do resultado do sequenciamento para cada base na read. Um valor mais alto de *Phred* indica uma maior confiança na atribuição correta da base na read como indicado na Figura 06, no qual a região em verde está considerando um alto valor de *Phred* e as abaixo da região amarela são consideradas com baixa qualidade.

Figura 06 – Boxplot de *scores Phred* para mensurar a qualidade em cada posição sequenciada do genoma.

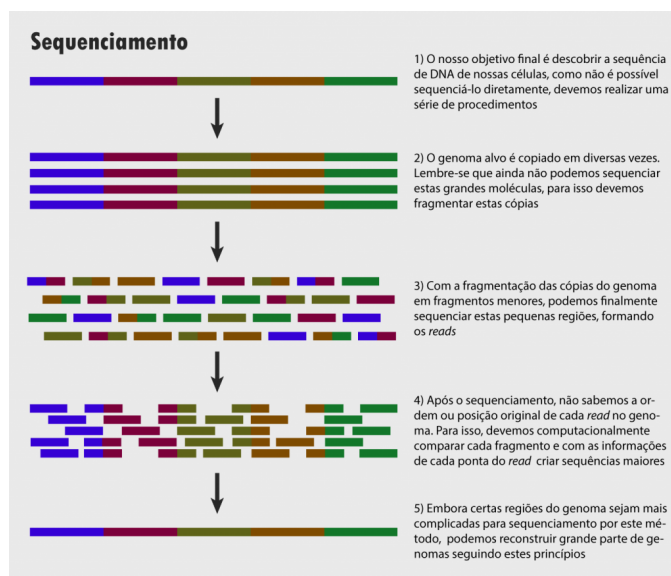


Fonte: FastQC

Após passarem por um rigoroso controle de qualidade, os reads são empregados no processo de montagem (*assembly*) das sequências obtidas. Esse procedimento visa organizar os milhares de reads oriundos das sequências originais e informativas do genoma. O alinhamento mencionado é o algoritmo que possibilita a transformação das sequências de reads em *contigs* e, posteriormente, em *scaffolds*, como pode ser observado na figura 07. Os *contigs* representam as sequências consenso resultantes do alinhamento das reads. Já os *scaffolds* são sequências formadas a partir da união de *contigs* e preenchimento dos espaços não sequenciados do genoma em estudo, conhecidos como *gaps*, conforme ilustrado na figura 07.

Existem metodologias para a redução dos *gaps* que estão relacionadas a um aspecto técnico, consistindo no aumento da cobertura ou profundidade do genoma. Esse aumento ajuda a reduzir os erros de sequenciamento e, por conseguinte, aumenta a acurácia do processo (MILLER *et al.*, 2010; SCHATZ *et al.*, 2010).

Figura 07 – *Workflow* para montagem de genomas



Fonte: UNICAMP

Quando não há genomas de referência disponíveis, o processo de montagem do genoma se torna mais complexo, tornando especialmente desafiadora a montagem de genomas para espécies não modelo. Uma das estratégias mais eficientes para a montagem "*de novo*" é a utilização de algoritmos baseados no grafo de Bruijn (SCHATZ; DELCHER; SALZBERG, 2010).

Vários softwares foram desenvolvidos para utilizar dados provenientes de sequenciadores de nova geração, como SOAPdenovo (LUO *et al.*, 2012), Ray (BOISVERT *et al.*, 2012), HyDA (SHARIAT *et al.*, 2014), Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008), Alphats (BUTLER *et al.*, 2008), ABysSS (SIMPSON *et al.*, 2009), CANU (KOREN *et al.*, 2017) e outros. Além disso, alguns desses softwares eram originalmente desenvolvidos para dados do sequenciamento Sanger, mas são capazes de montar pequenos genomas, como os softwares MIRA (CHEVREUX *et al.*, 2004) e CAP3 (HUANG; MADAN, 1999).

Tabela 01- Software para montagem de genoma de acordo com o tamanho das reads.

Software	<i>reads</i> longas	<i>reads</i> curtas	Híbridas	Referência
SOAPdenovo		X		Luo et al., 2012
Velvet		X		Zerbino & Birney, 2008

ABySS		X		Simpson et al., 208
PERGA		X		Zhu et al., 2014
SPADES	X	X	X	Bankevich et al., 2012
CANU	X		X	Koren et al, 2017
ALLPATHS	X	X	X	Butler et al., 2008
SMARTdenovo	X	X		https://github.com/ruanjue/smartdenovo

Existem várias opções de programas para a montagem de genomas, e cada um deles apresenta diferenças significativas em relação ao desempenho (velocidade, estabilidade, requisitos computacionais e aceitação de novas tecnologias de sequenciamento) e nos resultados obtidos (composição na sequência montada). Portanto, ao escolher qual software utilizar, é crucial analisar a complexidade e tamanho do genoma, o tipo de sequenciamento (reads longas ou curtas) e os parâmetros selecionados.

A maioria dos programas para a montagem de grandes genomas utiliza o grafo de Bruijn como algoritmo principal devido à sua vantagem em termos de velocidade e capacidade de processamento de grandes volumes de dados. Esses grafos desmontam as reads em subsequências de tamanho K e são compostos por nós interconectados, simulando diferentes caminhos para a montagem da sequência. Em condições ideais, o grafo deve voltar à sequência original, permitindo verificar a sequência que gerou o grafo. Contudo, em algumas situações, podem surgir muitas encruzilhadas no grafo, resultando em milhares de sequências. Essa ocorrência geralmente está associada a erros de sequenciamento, que podem ser identificados na estrutura dos grafos. Os softwares montadores, após a formação dos grafos, utilizam algoritmos de correção para resolver as estruturas de caminhos alternativos criados durante a montagem, dando ênfase à cobertura do sequenciamento, enquanto os caminhos de baixa cobertura são descartados (SCHATZ; DELCHER; SALZBERG, 2010).

Embora a maioria dos montadores de genoma utilize o grafo de Bruijn como padrão, cada um possui características inerentes ao seu processamento, podendo apresentar vantagens e desvantagens dependendo dos dados obtidos pelo sequenciamento. Montadores tradicionais que não usam o grafo de Bruijn tratam cada leitura como um nó em um grafo de sobreposição, o que demanda mais esforço computacional, especialmente quando se trata de reads curtas. Por

outro lado, o grafo de Bruijn compõe uma representação das leituras em pequenas palavras de tamanho pré-definido em K-mer (ZERBINO; BIRNEY, 2008).

Um exemplo de programa que incorpora o grafo de Bruijn é o SOAPdenovo, projetado para ler sequências curtas geradas a partir da plataforma Illumina, mas que também pode ser utilizado com diversas outras plataformas, como SOLiD, 454, entre outras, permitindo a construção de sequências de referência precisas para genomas não explorados. O SOAPdenovo utiliza o formato FASTA como input padrão de dados de referência, que também é gerado no formato de saída, e funciona com um único modelo de linha de comando (LI *et al.*, 2010).

Após a realização da montagem do genoma, é importante avaliar a qualidade das sequências geradas. Para determinar a melhor montagem, é necessário padronizar os parâmetros analisados e adotar métricas de avaliação apropriadas. Existem várias métricas disponíveis, e em um grande projeto chamado *Assemblathon* (BRADNAM *et al.*, 2013). O Projeto está na terceira edição e se encontra muito perto de uma nova publicação, este vem acompanhando a tecnologia dos sequenciadores de nova geração. Algumas métricas para avaliação da qualidade podem ser acessadas por meio do site do projeto, bem como os artigos já publicados (BRADNAM *et al.*, 2013).

1.7.1. Genoma Nuclear

O genoma nuclear é a coleção completa de material genético contido no núcleo das células de um organismo e é responsável por determinar suas características hereditárias. Esse conjunto de informações genéticas é organizado em cromossomos e é transmitido de geração em geração durante a reprodução (ARIAS; DIKOW; MCMILLAN; DE LEÓN, 2021).

Nos peixes e condrictes, o estudo do genoma nuclear tem desempenhado um papel fundamental na compreensão da diversidade e evolução desses grupos de animais aquáticos. A análise dos genomas dessas espécies tem revelado informações cruciais sobre sua história evolutiva, adaptações ao ambiente aquático, diversidade genética e mecanismos de resposta a mudanças ambientais (DUDGEON *et al.*, 2012; HARA *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2022).

O genoma nuclear dos peixes é altamente diversificado, refletindo a enorme variedade de espécies existentes nesse grupo. Diferentes peixes podem apresentar tamanhos de genoma significativamente distintos, o que indica variações na quantidade de material genético presente em suas células. Além disso, estudos do genoma nuclear têm contribuído para a compreensão das relações filogenéticas entre as espécies de peixes, fornecendo informações sobre a evolução

e a história de suas linhagens (BROWN, 2008; VENKATESH *et al.*, 2014; WATTANADILOKCHATKUN *et al.*, 2022).

Entre os condrictes, como tubarões e raias, o estudo do genoma nuclear tem sido particularmente relevante para esclarecer sua evolução e adaptações únicas ao ambiente marinho. Esses animais possuem características morfológicas e fisiológicas distintas que lhes permitem sobreviver em diferentes habitats aquáticos. O estudo do genoma nuclear de condrictes tem revelado informações sobre a evolução de suas características peculiares, como a cartilagem em vez de ossos, a estrutura especializada das nadadeiras e suas habilidades sensoriais altamente desenvolvidas (ZHOU *et al.*, 2022).

A análise do genoma nuclear de condrictes tem contribuído para o entendimento da história evolutiva desses animais, incluindo o papel que desempenharam em ecossistemas marinhos ao longo dos milhões de anos de sua existência. A compreensão do genoma também é relevante para estudos de conservação e manejo, permitindo identificar a diversidade genética das populações e compreender como fatores ambientais e antropogênicos podem afetar a variabilidade genética dessas espécies (DUDGEON *et al.*, 2012; HARA *et al.*, 2018; MARRA *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2022).

As técnicas de sequenciamento de nova geração têm sido essenciais para avançar no estudo do genoma nuclear de peixes e condrictes, pois possibilitam a obtenção rápida e precisa das sequências de DNA. Com o aprimoramento contínuo dessas tecnologias, espera-se que a compreensão do genoma desses grupos de animais aquáticos continue a expandir, fornecendo insights valiosos sobre sua biologia, evolução e conservação. O estudo do genoma nuclear é uma ferramenta poderosa para desvendar os segredos da vida e da diversidade marinha, contribuindo para a conservação dos ecossistemas aquáticos e para a proteção das espécies de peixes e condrictes em nosso planeta (JOHRI; DOANE; ALLEN; DINSDALE, 2019).

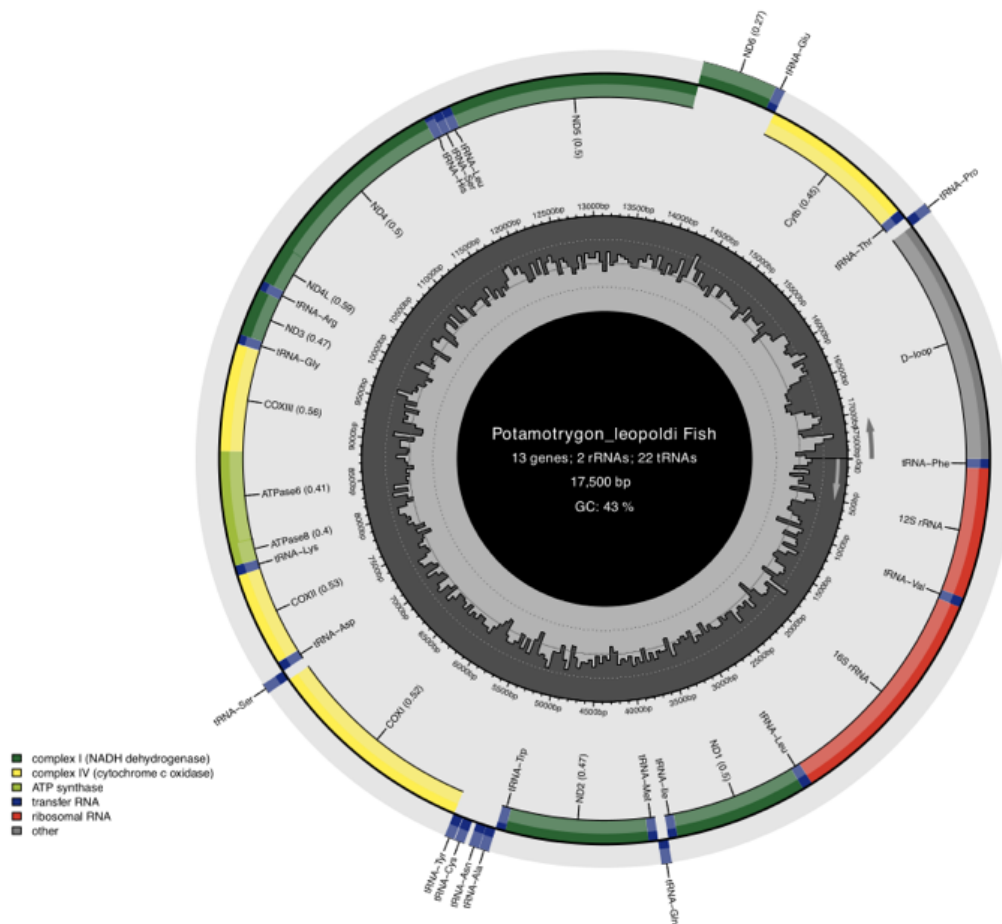
1.7.2. Genoma mitocondrial

As mitocôndrias são organelas presentes na maioria dos organismos eucariotos e são as estruturas responsáveis por fornecer energia na forma de moléculas de ATP que são utilizadas em diversos processos celulares. Outras funções estão também associadas a biossíntese de lipídeos, homeostase e apoptose celular, além de auxiliar na resposta a estresses ambientais. A origem da mitocôndria está associada a uma bactéria de vida livre que se incorporou em uma célula hospedeira, um processo denominado endossimbiose. Durante a integração entre essas duas células ocorreu a aquisição da maquinaria de importação de RNA e proteína. De forma

que houveram modificações para que houvesse transferência de grande parte do genoma para o núcleo celular, possibilitando a formação da organela mitocondrial. Apesar da transferência de genes para o genoma nuclear, as mitocôndrias possuem um genoma próprio, em que existem uma série de informações relacionadas a respiração aeróbica por meio da fosforilação oxidativa (ZARDOYA, 2020).

Genomas mitocondriais são comumente chamados de mitogenoma ou mtDNA, podem assumir características lineares ou circulares e utilizar códigos diferentes dos observados no genoma nuclear. Em eucariotos o conteúdo gênico mitocondrial é conservado em relação a presença de um *core genome* com 13 genes codificadores de proteínas (Cox1-Cox3, Nad1-6, 4L, ATP6 e ATP8), dois genes ribossomos e uma região controle como podemos verificar na Figura 08, entretanto, algumas exceções podem ser encontradas devido a evolução de algumas espécies. Adicionalmente o tamanho do mitogenoma de eucariotos é variável entre as espécies podendo apresentar boa parte das regiões conservadas, quando se trata das espécies do gênero *Potamotrygon* podemos observar que o tamanho de mitogenoma para as espécies varia de 17.429 a 17.449, sendo a de menor tamanho representada pela espécie *Potamotrygon magdalenae* e a de maior tamanho pela *Potamotrygon orbignyi* (NACHTIGALL *et al.*, 2023; ORY *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015).

Figura 08- Estrutura do genoma mitocondrial da espécie *P. leopoldi* para demonstração das estruturas.



Essa abordagem de montagem do genoma mitocondrial é uma estratégia interessante, pois a organização desse genoma é conservada entre os vertebrados, este fator facilita o alinhamento e a comparação entre diversas espécies tanto em questões estruturais do genoma mitocondrial quanto em relação ao tamanho das mesmas, com isso dados de mitogenoma auxiliam nos estudos de origem, evolução e relações entre organismos (SACCONI et al., 1999). De acordo com Liu et al., 2019 as diferenças que encontramos na estrutura do genoma mitocondrial podem estar diretamente relacionadas a histórias evolutivas distintas em eucariotos, pois coevoluem de acordo com os organismos em que estão alojados (PENG et al., 2006).

Apesar de conter poucos representantes na família Potamotrygonidae os esforços para sequenciamento do genoma mitocondrial ainda são poucos, apenas 5 espécies até o presente momento tem a estrutura e genoma completos sequenciados e anotados: *Potamotrygon motoro* (Número de acesso Genbank: KF709642), *Potamotrygon orbignyi* (Número de acesso Genbank: MN178254), *Potamotrygon falkneri* (Número de acesso Genbank: MZ203140) e *Potamotrygon magdalena* (Número de acesso Genbank: KX151183). Dessa forma, se faz necessário que haja a descrição de mais mitogenomas completos quando se trata da família Potamotrygonidae, afim de elucidar comparações, esclarecer questões taxonômicas, e efetuar suas devidas comparações, bem como compreender as questões evolutivas dos táxons, haja vista que a família Potamotrygonidae é única representante das arraias de água doce no mundo.

1.8. Genética e conservação de recursos pesqueiros

A diversidade genética é a mola propulsora da mudança evolutiva, facultando às populações adaptarem-se às flutuações ambientais (FRANKHAM, 2005a; SWINGLAND, 1982). A perda de diversidade genética torna populações naturais mais suscetíveis à extinção, uma vez que carecem de níveis adequados de variabilidade genética para enfrentar pressões seletivas (FRANKHAM, 2005b; RADWAN *et al.*, 2010; REED; FRANKHAM, 2003). Evidências indicam que a redução do sucesso reprodutivo de populações naturais está associada à perda de diversidade genética, mas esta dinâmica é atenuada quando o fluxo gênico é estabelecido (FURLAN *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009; RANDI *et al.*, 2003).

O grau de diferenciação genética em organismos aquáticos é influenciado por uma diversidade de fatores que determinam a homogeneidade ou heterogeneidade entre populações. A investigação do fluxo gênico entre essas populações esclarece, em última instância, o grau de conectividade genética ou isolamento que permeia suas histórias evolutivas recentes. O isolamento geográfico vigente nem sempre denota heterogeneidade total entre as populações, visto que as frequências gênicas entre elas podem refletir episódios de fluxos gênicos ocorridos em um passado recente. Conseqüentemente, ainda que geograficamente isoladas, diferentes populações podem não apresentar divergências genéticas estatisticamente significantes (HILSDORF; HALLERMAN, 2017).

No contexto de longo prazo, a sustentabilidade dos recursos ictiológicos de água doce depende da preservação e conservação de sua variabilidade genética. Um aspecto central nesse

cenário é a capacidade de identificar e caracterizar geneticamente populações e/ou estoques. Isso se mostra fundamental, por exemplo, para a implementação de políticas de cotas de pesca e, por conseguinte, para a definição de unidades biológicas com base no conceito genético de estoque, considerado como uma unidade reprodutivamente isolada que difere geneticamente de outros estoques (FAZZI-GOMES, P. F. *et al.*, 2017; HAMOY *et al.*, 2018).

A relevância deste conceito está na compreensão de que o conhecimento da estrutura genética das populações de determinadas espécies de peixes de interesse econômico almeja não apenas a preservação das espécies, mas também a otimização da pesca sustentável, com vistas a evitar, em última análise, o colapso de atividades de pesca, seja no âmbito comercial ou esportivo, de importância econômica duradoura (HILSDORF *et al.*, 2006).

A conservação de estoques naturais de espécies ameaçadas de extinção é uma das principais preocupações da comunidade científica, que busca incansavelmente alternativas para promover a exploração sustentável, especialmente das espécies constantemente ameaçadas de extinção e intensamente exploradas por atividades econômicas.

A genética desempenha um papel de extrema importância na conservação de recursos pesqueiros, permitindo uma avaliação precisa da diversidade genética das populações de organismos aquáticos e unidades evolutivas distintas, como algumas subpopulações de espécies. Tais informações são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação adequadas, que levem em consideração o nível de ameaça enfrentado por cada população e a preservação da variabilidade genética (LIU *et al.*, 2023).

Com o avanço das ferramentas para o monitoramento ambiental, a análise genética tem se destacado como uma poderosa ferramenta para identificar e monitorar populações ameaçadas de extinção ou sob intensa pressão devido à pesca direcionada. Por meio de marcadores moleculares, é possível realizar uma avaliação detalhada da estrutura populacional, diversidade genética, rastreamento de proles e estabelecimento da conectividade entre diferentes populações, fornecendo informações cruciais para o planejamento de estratégias de conservação efetivas (JORGENSEN *et al.*, 2022).

Essas ferramentas genéticas apresentam diversas aplicações, incluindo a seleção de indivíduos com características desejáveis para programas de criação e reprodução, como resistência a doenças, crescimento rápido e padrões de coloração atraentes para o mercado ornamental, bem como a adaptação a ambientes específicos. A seleção assistida por marcadores moleculares pode orientar a criação em cativeiro, o repovoamento de regiões afetadas pela pesca excessiva e até mesmo a reintrodução de animais em novos ambientes, como é o caso das arraias frequentemente utilizadas na aquariofilia.

É fundamental ressaltar que as ferramentas genéticas, embora sejam de grande relevância para a conservação de recursos pesqueiros, não devem ser consideradas soluções isoladas para o manejo e conservação das espécies estudadas. A abordagem deve ser integrada, levando em conta aspectos multidisciplinares e considerando outros fatores relevantes para garantir o sucesso das estratégias de conservação (HAMOY; ARARIPE; GUERREIRO; SANTOS, 2018; HAMOY; SANTOS, 2012; QUEIROZ, 2021).

Desta forma, a genética exerce um papel crucial no apoio à conservação de espécies ameaçadas de extinção, com destaque para as arraias de água doce utilizadas para fins ornamentais. Suas aplicações possibilitam um entendimento mais profundo da diversidade genética dessas espécies, da estrutura populacional e da conectividade entre diferentes populações, além de conseguir criar um sistema de paternidade que facilita o processo de fiscalização em casos de reprodução realizado nas fazendas de cultivo das espécies que são controladas pelos órgãos fiscalizadores, viabilizando a fiscalização e coibindo práticas insustentáveis para os estoques pesqueiros (FAZZI-GOMES *et al.*, 2021; QUEIROZ, 2021).

1.9. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são ferramentas importantes para a biologia molecular e são utilizadas com a finalidade de identificação e diferenciação de indivíduos, espécies, populações pelas inúmeras técnicas desenvolvidas, sendo realizada com base nas variações genéticas específicas. Existem vários tipos de marcadores moleculares, sendo que cada um possui uma característica, o que está diretamente relacionado como as aplicações (LIU; CORDES, 2004).

Com a diversidade enorme de aplicações, os marcadores moleculares são amplamente utilizados em diversas áreas da biologia, com um enfoque maior na genética, biotecnologia e conservação da biodiversidade. De forma prática eles são úteis para a os estudos de genética populacional como na análise de diversidade genética e fluxo genético entre populações (NAVARRO *et al.*, 2008).

A biotecnologia tem conseguido ao longo do tempo avanços na tecnologia, estas são utilizadas e aplicadas em organismos vivos ou parte destes para a modificação dos processos produtivos. Com isso, encontrou-se uma alta aplicação nas áreas da conservação de recursos pesqueiros e para melhoramento em genético em espécies aquícolas. A biotecnologia aplicada a recursos aquáticos tem como responsabilidade melhorar estoques pesqueiros, auxiliar na sanidade de espécies cultiváveis, além de tem potencial para realização de melhoramento genético, conservação e fiscalização de espécies com captura controlada (BISWAS; MAURYE, 2017).

Os marcadores moleculares podem ter como definição como qualquer alteração fenotípica que pode ser mensurada a partir da expressão de um gene ou de um segmento específico de DNA, tendo estas correspondências diretas com as regiões codificantes ou não codificantes do genoma (LARRAÍN *et al.*, 2014).

O emprego dos marcadores moleculares de DNA é importante para a análise genética e a mensuração da variação genética é realizada por meio do uso de marcadores moleculares que são baseados em polimorfismos de sequências de DNA. Estes polimorfismos podem ser detectados tanto em populações adultas já estabelecidas, como pode detectar em juvenis em fase de recrutamento, possuem herança genética e são extremamente numerosos e distribuídos por todo genoma, de modo geral apresentam características como neutralidade fenotípica e expressam caráter dominante (MAQSOOD; AHMAD, 2017).

1.9.1. Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como STRs (*Short Tandem Repeats*) ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), são uma classe de marcadores moleculares amplamente utilizados em diversas linhas de pesquisa científica, como genética forense,

genética da conservação, melhoramento genético animal e rastreabilidade (FAZZI-GOMES, P. *et al.*, 2017; HAMOY; SANTOS, 2012).

Esses marcadores possuem características altamente desejáveis em estudos genéticos devido à sua alta variabilidade genética, herdabilidade codominante e alta reprodutibilidade (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). A presença de polimorfismos e a distinção clara entre genótipos heterozigotos e homozigotos tornam os microssatélites altamente informativos para estudos de diversidade genética e identificação de indivíduos. (HAMOY; ARARIPE; GUERREIRO; SANTOS, 2018)

Os microssatélites são amplamente distribuídos em genomas de eucariotos e procariotos, e são encontrados tanto em regiões codificadoras quanto em regiões não codificadoras. Em eucariotos, a frequência de microssatélites é geralmente maior em regiões não codificadoras, o que permite uma ampla cobertura genômica dos organismos estudados (LI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2014).

Uma característica relevante dos marcadores microssatélites é sua taxa relativamente elevada de mutação, resultando em uma variação significativa dentro e entre espécies. Além disso, esses marcadores são relativamente pequenos, com repetições de 20 a 30 pares de bases, o que torna possível amplificar essas regiões com baixas quantidades de DNA por meio da técnica de PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os microssatélites consistem em repetições em tandem de pequenas sequências de 1 a 6 pares de bases, classificadas como di, tri, tetra, penta e hexanucleotídicas, conforme observado na Figura 09. As repetições di, tri e tetra são as mais comuns em pesquisas genéticas, sendo amplamente utilizadas na busca por esses marcadores em genomas de interesse (KELKAR *et al.*, 2010).

Os marcadores microssatélites são ferramentas valiosas em pesquisas genéticas, devido à sua alta variabilidade, herdabilidade codominante, alta reprodutibilidade e baixa quantidade de DNA necessária para amplificação. Sua distribuição ampla nos genomas e sua taxa de mutação relativamente elevada tornam os microssatélites uma escolha frequente para estudos de diversidade genética e identificação de indivíduos em várias áreas de pesquisa, incluindo a conservação de recursos pesqueiros e o monitoramento de espécies ornamentais, como as arraias de água doce (AMADO *et al.*, 2008; BEHEREGARAY *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2015; TORRES; CHARVET; *et al.*, 2022; WATTANADILOKCHATKUN *et al.*, 2022).

Figura 09- Estrutura e classificação dos marcadores microssatélites quanto ao tamanho de repetição

TATGCCTATGCC**TATGCC**TATGCC**TATGCC** - Hexanucleotídeo **(TATGCC)₅**

TATGCTTATGCT**TATGCT**TATGCT**TATGCT**TATGCT**TATGCT** - Pentanucleotídeo **(TATGC)₆**

TATGTATGTATGTATG**TATGTATG**TATGTATG**TATGTATG** - Tetranucleotídeo **(TATG)₈**

TATTATTTATTATT**TATTATT**TATTATT**TATTATT**TATTATT**TATTATT** - Trinucleotídeo **(TAT)₁₁**

TATATATTATATAT**TATATAT**TATATAT**TATATAT**TATATAT**TATATAT** - Dinucleotídeo **(TA)₁₅**

Fonte: HAMOY; ARARIPE; GUERREIRO e SANTOS (2018)

Além de todas as aplicações supracitadas, os marcadores microssatélites são amplamente utilizados para estudo parental e possuindo aplicações em genética de população (LIU; CORDES, 2004). Paternidade ou recomposição do *pedigree* são preferencialmente associados aos microssatélites, devido a sua alta diversidade alélica e também são baseados no princípio da exclusão genética, dessa forma, todos os alelos analisados na prole tem que estar na mesma posição do alelo dos pais, sendo importante delimitar os que são herdados por origem materna e paterna, no caso de pelo menos dois microssatélites não sejam compartilhados é uma causa de exclusão de paternidade (REGITANO; VENERONI, 2009). Diversos estudos demonstram inúmeras aplicações destes marcadores para estimar relações em populações de espécies com potencial econômico, bem como podem ser utilizados como ferramenta de fiscalização para a autenticação de origem dos produtos de origem aquática (HAYES *et al.*, 2005; LARRAÍN *et al.*, 2014; ROLLI *et al.*, 2014).

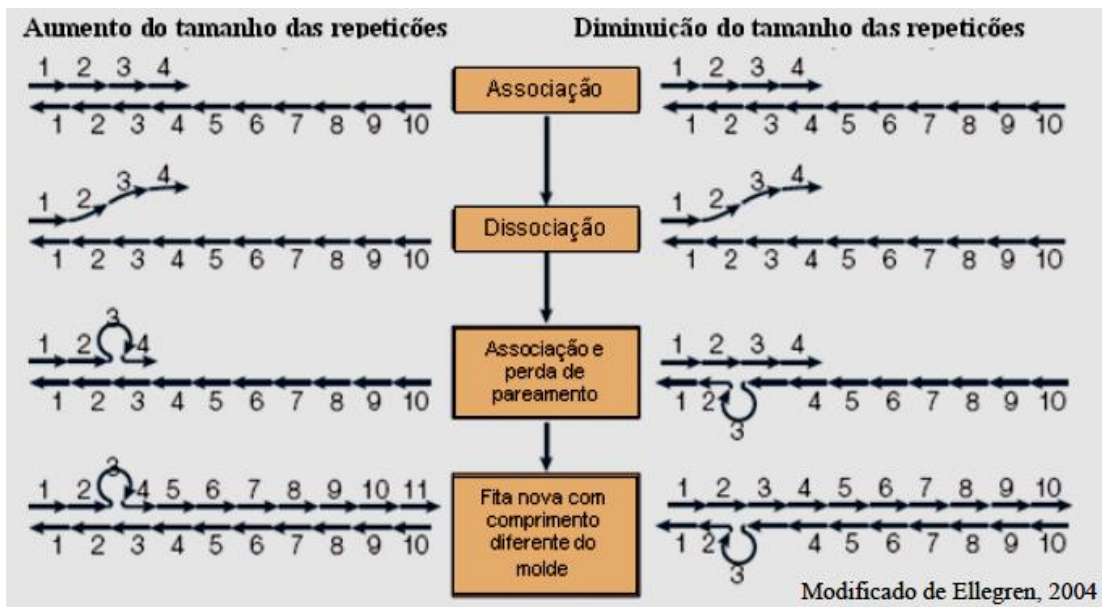
Assim sendo, o uso de marcadores microssatélites vai desde o alto alcance como marcador genético, como no processo de identificação de indivíduos, e também no rastreo da história biológica das populações (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Com o advento das tecnologias de NGS o isolamento, caracterização e validação dos microssatélites que não estão disponíveis para algumas espécies se tornou mais facilitado devido ao grande volume de dados obtidos pelas novas plataformas de sequenciamento, sendo necessário uma ampla análise em bioinformática com critérios ajustados, uma vez descobertos por bioinformática são facilmente genotipados para alelos codominantes (FAZZI-GOMES *et al.*, 2021).

1.9.1.1. Fatores que contribuem para a mutabilidade dos microssatélites

Em se tratando de mutações os loci de microssatélites possuem taxas elevadas quando comparada com outros locis dentro de um mesmo genoma podendo variar entre 10^{-2} e 10^{-6} por geração populacional, levando os SSRs a apresentar elevados valores para a infomação de conteúdo polimórfico (PIC).

A explicação mais aceita na literatura para que a taxa de mutação dos SSRs seja elevada é a ocorrência de *slippage* em uma das fitas de DNA durante o processo de replicação, esta característica confere em acréscimos ou perdas de diferentes números de unidades de repetição como podemos verificar na figura 10.

Figura 10- *Slippage* representado durante a replicação de DNA



Fonte: DA SILVA (2014)

Na figura 10, podemos observar o fenômeno conhecido como *slippage* que ocorre durante a replicação do DNA. A molécula de DNA exibida possui cinco unidades de repetição, destacadas pelas caixas em tons de laranja e vermelho. Durante o processo de replicação, ocorre um deslocamento inesperado nessa sequência. Esse deslocamento resulta na formação de novos alelos, onde as repetições podem variar para seis ou cinco unidades, dependendo da fita na qual ocorreu o erro da polimerase. Esse fenômeno demonstra a complexidade e dinâmica do processo de replicação do DNA e suas consequências na diversidade genética.

As várias classes de marcadores microssatélites apresentam taxas de mutação diferentes, sendo influenciadas pelo número de repetição, tipo de repetição, estrutura de repetição, sequência flanqueadora e recombinação. Em outras palavras, existe uma relação direta entre o

número de repetições e a taxa de mutação nos microssatélites, devido ao sistema de reparo do DNA não conseguir identificar os erros durante a replicação dos microssatélites, especialmente os mais longos (SHINDE *et al.*, 2003).

Mutações em microssatélites são mais frequentes em dinucleotídeos, seguidas de tri e tetranucleotídeos respectivamente, podendo ser explicado por uma maior instabilidade das sequências de repetições curtas, permitindo uma maior incidência de *slippage* das fitas de DNA durante a replicação (CHAKRABORTY *et al.*, 1997; LAI; SUN, 2003).

Quando se trata de mutação os microssatélites perfeitos tem uma taxa de mutação maior que os imperfeitos, apresentando um decréscimo no nível de variabilidade genética. Segundo ZHU *et al.* (2000), as imperfeições tendem a se acumular e persistir nas sequencias de microssatélites, causando a diminuição do deslizamento nas fitas de DNA durante a replicação que pode levar aos microssatélites se tornarem monomórficos. Dessa forma, aos microssatélites perfeitos são os mais indicados para o isolamento e desenho de iniciadores para a utilização em estudos de genética de população.

A taxa de mutabilidade dos microssatélites está diretamente relacionada com as sequencias que flanqueiam os loci, mutações extensas nessas regiões mudarão o contexto genômico dos microssatélites e podem alterar a mutabilidade do loci. Vários fatores podem alterar essa mutabilidade como quando as sequencias de microssatélites estão em regiões relacionadas com genes ou quando ocorre alterações no conteúdo GC das sequencias (BROCK *et al.*, 1999; METZGAR *et al.*, 2000).

Quando se trata de variabilidade em sequencia de DNA e taxas de recombinação conseguimos observar correlações positivas, porém essa não possui consenso entre vários pesquisadores quando é estabelecida uma taxa de recombinação e variabilidade de microssatélites (SCHLÖTTERER, 2000). Uma provável hipótese para a falta de consenso é de que a maioria dos trabalhos relacionam a taxa de recombinação com a variabilidade em microssatélites. Estudos em humanos indicam que os mecanismos de mutação dos microssatélites são independentes da taxa de recombinação (HUANG *et al.*, 2002; PAYSEUR; NACHMAN, 2000).

1.9.2. Sistema de genotipagem multiplex com marcadores microssatélites.

Tradicionalmente, a genotipagem de marcadores microssatélites têm sido realizada através de eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida. No entanto, com os avanços da automação e dos reagentes para análise molecular, a genotipagem evoluiu para a eletroforese capilar em uma abordagem semiautomatizada. Essa forma de genotipagem tornou-se mais acessível nos últimos anos devido à diminuição dos custos dos equipamentos analisadores automáticos de DNA (Brondani et al., 2007; Guichoux et al., 2011).

Com o objetivo de aumentar a eficiência e reduzir o número de análises, têm sido desenvolvidos sistemas de genotipagem multilocus ou multiplex (Guichoux et al., 2011). Esses sistemas permitem a detecção simultânea de vários locos em uma mesma corrida de eletroforese. Os locos podem ser amplificados em uma única reação de PCR ou amplificados separadamente e posteriormente carregados em um mesmo gel. Inicialmente, a genotipagem multiplex era realizada em gel de acrilamida por abordagem colorimétrica com nitrato de prata, mas atualmente, tem evoluído para a forma semiautomatizada por eletroforese capilar (Brondani et al., 2007).

No método automatizado de genotipagem, um dos pares de primers que amplificam o microssatélite é marcado com um fluoróforo no terminal 5', e a detecção é realizada pela excitação dos fluoróforos através de um feixe de raios laser e pela captura imediata dos sinais gerados em um aparelho analisador automático de DNA. Essa tecnologia oferece inúmeras vantagens, como redução do tempo necessário para realizar a genotipagem um grande número de indivíduos, produção de dados mais precisos com a adição de um marcador interno em cada amostra após a genotipagem, e separação de *amplicons* similares com alta resolução. Além disso, a aquisição e o armazenamento computadorizado dos dados reduzem a manipulação manual da informação, possibilitando a exportação direta dos dados para programas de análise genética e o compartilhamento do sistema com outros laboratórios, permitindo a padronização dos locos do genoma amostrado e a comparação dos resultados (Brondani et al., 2007).

No desenvolvimento de um sistema multiplex de genotipagem semiautomatizada, os locos combinados devem atender a certos critérios quando amplificados separadamente e carregados em um mesmo gel. Eles não devem apresentar ampliações inespecíficas, e locos que amplificam fragmentos com a mesma faixa de tamanho devem ser marcados com diferentes fluoróforos. Além disso, locos marcados com o mesmo fluoróforo devem amplificar produtos de PCR com faixas de tamanhos que diferem em pelo menos 20 pares de bases. Essas estratégias minimizam a possibilidade de ocorrer sobreposição dos alelos e aumentam o potencial de

multiplexação, reduzindo os gastos com reagentes e o tempo necessário para o preparo das reações (Guichoux et al., 2011).

1.10. Estudos genéticos com Potamotrygonídeos

Embora os potamotrygonídeos tenham uma grande importância na atividade ornamental e agropecuária, há uma falta generalizada de informação sobre o genoma de espécies do gênero *Potamotrygon*. Há poucas informações na literatura sobre a composição gênica, distribuição de famílias de genes, abundância e diversidade de retro elementos, localização de QTL's para a detecção de características economicamente importantes, marcadores moleculares como SNPs, Indel e SSR, que ajudariam no processo de fiscalização para algumas espécies de potamotrygonídeos que são protegidos por lei no Brasil.

Os estudos utilizando ferramentas genéticas em Condrictes tem se expandido na última década, porém pouco se sabe sobre a variabilidade genética, estudos populacionais e estudos genômicos dessa classe. Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração e com a queda nos custos operacionais para desenvolver projetos em genômica, foram iniciadas pesquisas importantes acerca desses animais (JOHRI; DOANE; ALLEN; DINSDALE, 2019).

Estudos realizados em outros potamotrygonídeos eram realizados utilizando marcadores mitocondriais em específico na criação de painéis para DNA *barcode* utilizando a Subunidade I da Citocromo Oxidase. TOFFOLI *et al.* (2008) desenvolveu a metodologia para 8 espécies do gênero *Potamotrygon*, com isso conseguiu montar padrões para identificação da espécie.

Trabalhos realizando análises filo geográficas também foram incentivados para a espécie *Potamotrygon aireba* utilizando 2 fragmentos mitocondriais: Citocromo oxidase I e ATPase6. Dessa forma FREDERICO *et al.* (2012) et al, 2012 conseguiu demonstrar a estrutura genética da espécie na bacia amazônica, demonstrando que as populações ficam estruturadas nos rios, possuindo fluxo gênico restrito e com correlações positivas entre distância genética e distância geográfica.

BHUMMAKASIKARA *et al.* (2013) desenvolveu marcadores microssatélites por meio de método de transformação de plasmídeos e clone dos mesmos para a obtenção de 24 pares de primer. O estudo resultou na descrição de 10 marcadores microssatélites polimórficos, sendo 9 dinucleotídeos e 1 tetranucleotídeos. Além disso, o autor realizou experimento de amplificação

de espécies cruzadas com 4 arraias de água doce *P. motoro*, *Himantura kittipongi*, *Himantura signifier* e *Pastinachus sephen* no qual o marcador conseguiu amplificar.

NACHTIGALL et al., 2023 realizou busca de dados públicos para potamotrygonídeos, reconstruindo a anotação do genoma mitocondrial de 2 espécies: *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon magdalenae*. Foi realizado também o sequenciamento da espécie *Potamotrygon falkneri* com a finalidade de investigar a dinâmica do mitogenoma em relação ao mitogenoma das arraias marinhas. Nesse estudo foi possível observar a translocação de RNA transportador. Além disso, foram encontrados que quatro genes do genoma mitocondrial das arraias de água doce apresentavam sítios de aminoácidos sob seleção positiva, descobertas que podem ter ajudado o grupo a se adaptar e conquistar o ambiente dulcícola e se distribuir pelas bacias hidrográficas da América do Sul.

ZHOU et al., 2022 realizou estudos com sequenciamento de nova geração com uma amostra de *P. leopoldi* descrevendo um *draft* genômico para a espécie. Em seus achados foi possível evidenciar diversos detalhes evolucionários da espécie como questões filogenéticas, adaptação de nicho e a formação do seu esqueleto. O *draft* genômico apresentado conta com 4,11Gb composto por 16.227contigs. As análises demonstram que a *P. leopoldi* é um peixe de evolução lenta, que divergiu dos tubarões-elefante há cerca de 96 milhões de anos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver ferramentas para fiscalização, estudos populacionais e manejo genético da *P. leopoldi*, que consiste na montagem do genoma e assim construir um painel multiplex de 10 microssatélites.

2.2. Objetivos específicos

- Sequenciar o genoma da espécie *P. leopoldi* utilizando Sequenciamento de Nova Geração;
- Montar um draft de genoma da *P. leopoldi*;
- Montar e anotar o genoma mitocondrial da *P. leopoldi*;
- Inferir sobre os dados gerados a partir da anotação do mitogenoma;
- Identificar marcadores microssatélites tetra nucleotídeos perfeitos, a partir do genoma da *P. leopoldi*;
- Avaliar o polimorfismo dos marcadores microssatélites encontrados dentro do genoma;
- Desenvolver e validar um sistema de genotipagem conjunta (multiplex) para a *P. leopoldi*, possuindo 10 marcadores microssatélites;

3. CAPÍTULO I -

Whole genome sequencing of the white blotched river stingray (*Potamotrygon leopoldi*)

Sequenciamento completo do genoma da arraia negra do Xingu (*Potamotrygon leopoldi*)

Whole draft genome sequencing of the white blotched river stingray (*Potamotrygon leopoldi*)

Sávio L. M. Guerreiro^a, Amanda Vidal^d, Caio S. Silva^a, Daniel H. F. Gomes^b, Jorge E. S. de Souza^b, Éder Pires^d, Guilherme Oliveira^d, Igor Hamoy^c, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^a, Sidney Santos^{a*}.

^aLaboratório de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará (UFPA), Pará, Brazil.

^bBioinformatics Multidisciplinary Environment (BioME), Digital Metropolis Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, Brazil.

^cLaboratório de Genética Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Pará, Brazil

^dInstituto Tecnológico da Vale (ITV), Pará, Brazil.

*Correspondence: sidneysantosufpa@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to sequencing the whole genome of *Potamotrygon leopoldi*. The *P. leopoldi* is a representant of family Potamotrygonidae and have a big commercial importance in the market of aquarium, is endemic of Xingu River, situated in the Amazon basin. Which species is currently danger of extinction, due to disorderly fishing exploitation and reproductive strategy. The *P. leopoldi* was assembled with 110,1Gb raw reads sequenced in PacBio Sequel I plataform. The final draft genome assembly was approximately 970Mb, with a contig N50 equal to 7.44kb. Founded 37,386 repeated sequences of the whole genome. The draft genome of *P. leopoldi* provides a valuable genetic resource for several investigations in evolutionary studies, taxonomy resolution, in the creation of molecular markers for population genetics and may also a valuable data for economic applications in the *P. leopoldi* market and conservation.

INTRODUCTION

Potamotrygon leopoldi, also known as Xingu ray or black ray, is a chondrichthyan from an endemic region in the Xingu River. It has a blackened body with white and yellowish markings along its body, and can reach up to one meter in disc length and weight up to 17kg (CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2005). The *Potamotrygon* genus emerged from the evolution of

marine rays that became trapped in the Amazon basin. Currently, the genus is distributed in Brazil, Colombia, Ecuador, and Peru. These rays can be found around the world, as some species within this genus are highly exploited for the aquarium trade. *P. leopoldi* possesses inherent characteristics of potamotrygonids, but is extremely distinct in its aesthetic appearance, setting it apart from other species (CARVALHO *et al.*, 2003). Additionally, its distribution is restricted to a micro-habitat located in one of the bends of the Xingu River. Due to its unique traits and a very low recruitment rate of juveniles, this species holds significant value in the international market, leading to its capture being regulated by governmental bodies, with its inclusion in CITES Appendix II (CITES, 2023).

P. leopoldi belongs to the order Myliobatiformes and family Potamotrygonidae. The family Potamotrygonidae is the only family of freshwater rays (ITIS). Freshwater rays are distinct from their marine counterparts due to various morphological and physiological aspects, such as their low concentration of urea in the blood and fluids (BROOKS *et al.*, 1981; THORSON *et al.*, 1967; WOOD *et al.*, 2002). These animals are characterized by a disc-shaped body with a whip-like extension of their caudal fin, featuring a stinger for defense. Adult individuals can measure anywhere from 25cm to 100cm in disc width in some species (CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003). The *P. leopoldi* has an attractive market value due to it's an endangered fish and very appreciated as ornamental.

Here we present the first draft genome assembly of the *P. leopoldi* which should help the molecular characterization and conservation of this important fish species.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and sequencing

Four samples of *P. leopoldi* were collected, consisting of 2 male and 2 female individuals of *Potamotrygon leopoldi*: NCBI taxonomy ID 460155. Two tissue fragments from the pectoral fin were removed using a 1mm diameter biopsy punch. The necessary permissions and access to the samples were obtained through the Secretary of Environment and Sustainability from Pará State (SEMAS-PA) under the Cooperation Agreement N°05/2018.

DNA was extracted using an adapted protocol from the Promega Wizard Genomic DNA Extraction kit and subsequently tested for integrity on a 1% agarose gel and quantified using a Qubit® fluorometer. The purity of the DNA was assessed using the absorbance ratio at 260nm

and 280nm, obtained with a BioDrop Duo precision spectrophotometer (Biodrop, UK). Only samples with a ratio between 1.8 and 2.0 were selected.

Two genomic libraries were prepared, each consisting of two samples from a male and two samples from a female, utilizing the SMRTbell Template kit 1.0 (Pacific Biosystems, Menlo Park, CA, USA) following the manufacturer's recommended protocols. The subsequent sequencing of these libraries was conducted on a PacBio Sequel I system (Pacific Biosystems) utilizing a SMRT Cell 1M v3 (Pacific Biosystems, Menlo Park, CA, USA).

Evaluation of the quality and processing of data

All generated sequences will be subjected to comprehensive quality assessments. The data generated through the PacBio platform will be meticulously processed utilizing the manufacturer-provided SMRT Analysis software to derive precise sequence quality reports. This sophisticated software facilitates the extraction of reports from the raw data inputs, facilitating the generation of intricate sequence distribution graphs, taking into meticulous consideration the overall mean quality per individual base, the mean quality across all reads, and the G+C content within the dataset.

Subsequent to the rigorous quality evaluation, the reads will undergo meticulous preprocessing procedures based on both quality and size criteria, ensuring the exclusive inclusion of high-quality sequences in the subsequent genome assembly process.

For the purposes of data quality analysis and preprocessing, the SMRT Analysis software will be deployed with meticulous care. The reads acquired from the PacBio platform will be subjected to dual filtering approaches, with one being notably more stringent than the other. Specific quality thresholds of 75% and 80% will be established for the PacBio data.

Genome Assembly

After preprocessing the sequences, they will be subjected to different attempts at de novo genome assembly. Three assembly programs, SOAPdenovo (LUO et al., 2012), CANU (KOREN *et al.*, 2017), and FRY, will be tested for this assembly task using various assembly strategies.

For conducting genome assembly using assemblers that default correction of bases with CANU, and make the assembly genome using the default configuration of FRY software.

RESULTS AND DISCUSSION

Genome sequencing and assembly.

The whole genome sequence of four adults of *P. leopoldi* (two males and two females) was performed with two insert libraries using PacBio Sequel I platform, producing a total of 110,1Gb raw sequences. After the correction of bases, removing of low quality and redundant reads, we obtained approximately 4,7Gb of high-quality data for de novo assembling. Using a k-mer-based approach in the software Fry, genome size was estimated in 968Mb. Posteriorly, *de novo* assembly generated a draft with 968,777,715 bp, 147,061 contigs and contig N50 = 7.44kb. When compared the whole genome of *P. leopoldi* with other species from the myliobatiformes family, we observed that the average is about 3.8Gb in the *Mobula birostris* (RHIE et al., 2021), showing that are only an estimative of the complete genome of this stingray.

This assembly of genome are providential for the development of molecular markers, especially microsatellite that are very used in population genetics (QUEIROZ, 2021). Furthermore, the data obtained by the Next generate Sequencing can be used to search the mitochondrial genome of *P. leopoldi*, that not are annotated until this date.

Conclusion

We report the draft of the genome of *P. leopoldi*, an endangered freshwater stingray from the Xingu River in the Amazon. The final draft assembly comprised approximately 970Mb. The data and resources produced will help to understand the evolutionary history, and can be used in many studies in the taxonomy, conservation and fiscalization.

Acknowledgments

We thank the Federal University of Pará, Federal University of Rio Grande do Norte and Rural Federal University of the Amazon for all the support.

REFERENCE

- BROOKS, D.; MAYES, M.; THORSON, T., 1981, **Systematic Review of Cestodes Infecting Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) Including Four New Species from Venezuela.**
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., *et al* (Ed.). **Check List of The Freshwater Fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 22-28.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; DE ARAÚJO, M. L. G.; DE ALMEIDA, M. P. Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, 35, p. 165-171, 2005.
- CITES. CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA, APENDIX II. UNEP. Geneva 2023.
- ITIS. **Integrated Taxonomic Information System (ITIS).** Disponível em: www.itis.gov. Acesso em: 05/05/2021.
- KOREN, S.; WALENZ, B. P.; BERLIN, K.; MILLER, J. R. *et al.* Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. **Genome Res**, 27, n. 5, p. 722-736, May 2017.
- QUEIROZ, A. L. L. **Aplicações da genética na conservação e combate ao tráfico de animais silvestres.** 2021. 181 f. - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte.
- RHIE, A.; MCCARTHY, S. A.; FEDRIGO, O.; DAMAS, J. *et al.* Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. **Nature**, 592, n. 7856, p. 737-746, Apr 2021.
- THORSON, T. B.; COWAN, C. M.; WATSON, D. E. Potamotrygon spp.: elasmobranchs with low urea content. **Science**, 158, p. 375-377, 1967.
- WOOD, C. M.; MATSUO, A. Y.; GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W. *et al.* Mechanisms of ion transport in Potamotrygon, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. **J Exp Biol**, 205, n. Pt 19, p. 3039-3054, Oct 2002.

**Supplementary table
Output from QUASt**

Assembly	assembly
# contigs (>= 0 bp)	147127
# contigs (>= 1000 bp)	143953
# contigs (>= 5000 bp)	86237
# contigs (>= 10000 bp)	21454
# contigs (>= 25000 bp)	712
# contigs (>= 50000 bp)	13
Total length (>= 0 bp)	968805101
Total length (>= 1000 bp)	966508000
Total length (>= 5000 bp)	750168303
Total length (>= 10000 bp)	305203749
Total length (>= 25000 bp)	22263948
Total length (>= 50000 bp)	799292
# contigs	147061
Largest contig	109107
Total length	968777715
GC (%)	41.77
N50	7440
N75	5190
L50	42404
L75	81608
# N's per 100 kbp	0.00

4. CAPÍTULO II -

Characterization of mitochondrial genome of the endangered freshwater stingray *P. leopoldi* from Xingu River, Brazil

Caracterização do genoma mitocondrial da arraia de água doce ameaçada de extinção *P. leopoldi* do Rio Xingu, Brasil

Artigo submetido na *International Journal of Biological Macromolecules*

ISSN: 1879-0003/0141-8130

Fator de Impacto: 8.20

Qualis: A1

The first characterization of mitochondrial genome of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi* (Castelo & Castex, 1970) from Xingu River, Brazil

Sávio L. M. Guerreiro^a, Amanda F. Vidal^d, Caio S. Silva^a, Giovanna C. Cavalcante^a, Leandro Magalhães^d, Daniel H. F. Gomes^b, Júlio Cesar da Silva Filho^b, Jorge E. S. de Souza^b, Éder Pires^d, Guilherme Oliveira^d, Débora Sayumi Doami Melo^c, André Luiz Alves de Sá^c, Igor Hamoy^c, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^a, Sidney E. B. Santos^{a*}.

^aLaboratório de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará (UFPA), Pará, Brazil.

^bBioinformatics Multidisciplinary Environment (BioME), Digital Metropolis Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, Brazil.

^cLaboratório de Genética Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Pará, Brazil

^dInstituto Tecnológico Vale (ITV), Pará, Brazil.

Abstract

The study characterized the complete mitochondrial genome of *Potamotrygon leopoldi*, this species is commonly referred to as the "white blotched stingray", which is a member of the Potamotrygonidae family that are an extant group of stingrays that live exclusively in freshwater environments. *P. leopoldi*, endemic in the Xingu River from the Amazon region, are exploited by the commercial fisheries for food and specially to the ornamental industry, and this causes a big impact in the populations. We used newly assembled PacBio long-read sequencing to assess the complete mitogenome of *P. leopoldi* and perform a comparative investigation in molecular evolution. The mitogenome has 17,504bp, containing 13 protein-coding, 22 tRNA, and 2 rRNA genes. The average of the composition in the mitogenome was A: 32.32%, T: 24.41%, C: 12.84%, G: 30.42% with an AT content of 56.73%. The values of AT and GC skewness were 0.13 and -0.40. Our phylogenetic analyses with mitogenome sequences of 40 elasmobranch species supports the monophyly for Potamotrygonidae family and indicates a close relationship to the Dasyatidae family and a sister relationship with *P. orbignyi* and *P. falkneri*. We detected various amino acid sites under positive selection exclusively in *P. leopoldi*. This extensive comparative mitogenomic investigation offers novel and significant insights into the evolutionary lineage of neotropical freshwater stingrays and

their closely related taxa. It stands as an indispensable resource for facilitating ongoing and prospective investigations into the molecular evolution of elasmobranchs.

Keywords: Mitogenome, Potamotrygonidae, Amazon.

1. Introduction

Mitochondria are important organelles that are present in eukaryotic cells, being inherently related to the cellular energy production, while also having many contributions to homeostasis, such as nucleotide biosynthesis, apoptosis and other activities. These organelles typically have a circular genome and, over the generations, mutations might set a precedent for selective pressure [1].

The mitogenome has about a hundred times the nuclear DNA mutation rate, partially because of the absence of efficient DNA repair systems. Due to this mutation rate, the mitochondrial genome is an excellent tool to compare with other species and to help understand the recent evolutionary events that the animals suffered in the process of evolution [2].

Stingray species have a fundamental ecological role in aquatic ecosystems but many are usually fished for human consumption and to supply animals for the ornamental fish market. Data displayed by the Ministry of Development, Trade and Services of Brazil shows that the trade of ornamental freshwater fishes would move 2.3 millions of dollars in 2023 [3]. Among these species, Potamotrygonidae stingrays are sought after for the domestic and international market due to its conspicuous coloration patterns. Potamotrygonidae is a monophyletic family of stingrays that evolved to live exclusively in freshwater environments, including four genera: *Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Heliotrygon* and *Plesiotrygon* [4-6].

The genus *Potamotrygon* occurs in South America, with a 39 species described, including species with wide distribution (*e.g.*, *P. motoro*, *P. orbignyi*) and endemic species restricted to specific rivers (*e.g.*, *P. leopoldi*, *P. henlei*)[7]. Notably, *P. leopoldi* inhabits the downstream waters of the Xingu River, from the Amazon region and is largely used as ornamental fishes, because of this, is a species vulnerable to extinction [8]. Although there has been an increase in the knowledge about the biogeography and evolution of freshwater stingrays [9], there are still few studies that focus on the molecular changes associated with the emergence of adaptive characteristics that allowed adaptation of the stingrays from a marine environment

to a freshwater ecosystem. In this sense, a comprehensive analysis of the mitochondrial genome may be a valuable strategy to expand our understanding of the evolutionary history of these species [10]. Actually, only five mitogenomes are described for the *Potamotrygon* genus, these reinforcements are necessary to study the freshwater stingrays.

Therefore, we report the assembly and annotation of the complete mitochondrial genome of *P. leopoldi* and use the public available mitochondrial mitogenome of the myliobatiformes and investigate the evolutionary dynamics comparing with the marine group. Our investigation focused on understanding the evolutionary dynamics of *Potamotrygon* mitogenomes by comparing them with other stingrays and elasmobranchs, to understand what differences and the molecular adaptation the freshwater stingrays created to adapt in the freshwater environment. Additionally, we conducted an analysis of gene synteny to identify potential rearrangements within the Potamotrygonidae family, and we tested for amino acid sites under positive selection in the mitochondrial genes to search insights of the molecular adaptation of *P. leopoldi* and Potamotrygon genus. A mitogenome phylogeny was generated using data from mitogenomes of rays and sharks, enabling us to infer the phylogenetic relationship with the *Potamotrygon* genus, and the evolutionary time of speciation.

2. Material and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Tissue samples were collected from a captive population of stingrays (*P. leopoldi*), two of male and two of female at a farm located in Salinópolis, Pará, Brazil. The necessary permissions and access to the samples were obtained through the Secretary of Environment and Sustainability from Pará State (SEMAS-PA) under the Cooperation Agreement N°05/2018.

Total genomic DNA was extracted from small fragments of the pectoral fin of adult *P. leopoldi* specimens using the Wizard Genomic DNA Purification Kit extraction method (Promega, Madison, WI, USA) in strict accordance with the supplier's instructions. Subsequently, the concentration and quality of the extracted DNA were assessed using both NanoDrop 1000 spectrophotometer and Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). These procedures ensure the reliability and validity of the genomic DNA samples obtained for further analysis.

2.2. Assembly, annotation and bioinformatic analysis of the complete mitogenome

Two genomic libraries were prepared, each consisting of two samples from a male and two samples from a female, utilizing the SMRTbell Template kit 1.0 (Pacific Biosystems, Menlo Park, CA, USA) following the manufacturer's recommended protocols. The subsequent sequencing of these libraries was conducted on a PacBio Sequel I system (Pacific Biosystems) utilizing a SMRT Cell 1M v3 (Pacific Biosystems, Menlo Park, CA, USA). In addition to our generated data, we incorporated a set of complementary sequences of *P. leopoldi* (CRR191193, CRR191177, CRR191191, CRR191189, and CRR191192), recently generated by Zhou et al. 2023 [11] employing the Illumina HiSeq platform. This integration of complementary data sources contributes to a more comprehensive and robust analysis in our study.

Raw sequencing data was filtered to trim adapters and low-quality sequences using CANU software [12]. The resulting reads were then assembled using Unicycler [13]. Protein-coding genes (PCGs), ribosomal RNAs (rRNAs), and transfer RNAs (tRNAs) were predicted by using MitoAnnotator [14] and annotated by alignment with other mitogenomes of *Potamotrygon*. The secondary structure of tRNAs was visualized in the Forna web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/forna>) [15]. The tandem repeat units of the Control Region (CR) were identified with the Tandem Repeats Finder Server (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.advanced.submit.html>); with default settings, except for “Minimum Alignment Score To Report Repeat”=30 [16]. The AT and GC skew was calculated according to the following formulas: $AT\ skew = (A - T)/(A + T)$ and $GC\ skew = (G - C)/(C + G)$ [17]. Arrangement of genes encoding rRNA proteins, comparative relative synonymous codon usage (RSCU), and CR organization analysis were performed using in-house Python scripts. For these analyses, we used the following mitogenomes deposited in Genbank: *Potamotrygon falkneri* (MZ203140), *Potamotrygon orbignyi* (MN178254), *Potamotrygon motoro* (KF709642), *Potamotrygon magdalenae* (KX151183) and *Callorhinchus milii* (HM137147).

2.3. Phylogenetic analysis

We reconstructed the phylogenetic tree using the complete mitogenome currently available for 40 species of elasmobranch. The species *C. milii* (HM137147) was used as an outgroup. To reconstruct the phylogenetic tree, we performed the multiple sequence alignment using the ClustalW alignment program with the default parameters in MEGA11 [18]. Bayesian Inferences (BI) were run using Markov-Chain Monte Carlo searches on two simultaneous runs

of chains of 5,000,000 generations in Mr. Bayes version 3.1.2, with a sample frequency of every 1000th [19]. The first thousand trees were discarded as burn-in and the posterior probability of each node was calculated from the remaining trees, and examined in Figtree v1.4.4 [20].

The divergence time was estimated with BEAST v2.6.6[21], the divergence between genera *Pristis* and *Rhynchobatus* (67.8 - 159.0 MYA) [22] was used as prior (www.timetree.org) for calibration [23].

To measure the effective number of codons (ENc), we estimated it through DAMBE 6.4.67 software. ENc designates the degree of codon bias for genes by computing deviation from uniform codon usage without any prior dependency over the sequence length or specific information of preferred codons [24].

3. Results

3.1. Mitochondrial genome structure

The complete circular mitogenome of *P. leopoldi* was sequenced using a Sequel I platform by the PacBio Systems, generating a total of 6,325,249,036 reads. We also used a set of sequences generated by Zhou et al., 2022 [11], with the Illumina Hiseq platform. It should be noted that Zhou et al., 2022 [11] assembled the total nuclear genome of such specimens but the mitochondrial genome remained unannotated and with a large amount of redundancy. After these analyses, the total length of the mitogenome was 17,504 bp containing 13 PCGs, 22 tRNAs and 2 rRNAs genes (Figure 1). The *P. leopoldi* mitogenome was deposited in Genbank, under accession number. The mitogenome of white blotched stingray has a nucleotide composition as follows: A: 32.32%, T: 24.41%, C: 12.84%, G: 30.42%. The A+T content is higher than C+G content, showing that the mitogenome has bias towards AT. The AT and GC skewness of the mitogenome sequence was 0.13 and -0.40, showing the A-skew and C-skew. Regarding the genes, 28 are encoded in the H-Strand (Heavy strand, +) and the other nine are encoded in the L-strand (Light strand, -), as seen in Table 1. The arrangement of genes was typical for vertebrates except for the variation in the length and the intergenic spacer region.

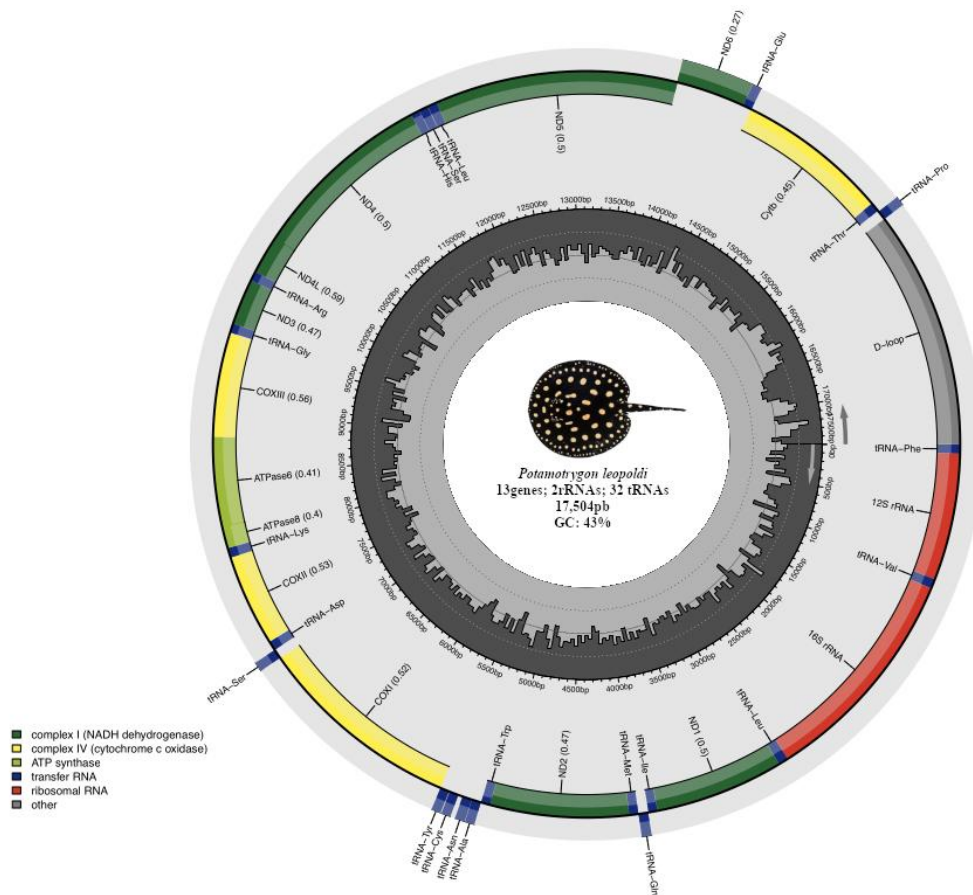


Figure 1. Circular genome map of *P. leopoldi* mitochondrial genome, showing 13 PCGs (in green and yellow), 2 rRNA (in red) genes, 22 tRNA genes (in blue), and the control region D-loop (in gray).

Table 1. Mitochondrial genome organization of *Potamotrygon leopoldi*.

Name	Type	Strand	Start	Stop	Intergenic nt	Length	Anticodon & Start codon/Stop codon
<i>tRNA-Phe</i>	tRNA	+	1	69	0	69	-
<i>12S rRNA</i>	rRNA	+	70	1,030	0	961	-
<i>tRNA- Val</i>	tRNA	+	1,031	1,102	19	72	-
<i>16S rRNA</i>	rRNA	+	1,122	2,788	3	1667	-
<i>tRNA-Leu</i>	tRNA	+	2,792	2,866	0	75	-
<i>ND1</i>	PCG	+	2,867	3,841	1	975	ATG/TAA
<i>tRNA-Ile</i>	tRNA	+	3,843	3,910	4	68	-
<i>tRNA-Gln</i>	tRNA	-	3,915	3,986	0	72	-
<i>tRNA-Met</i>	tRNA	+	3,987	4,056	0	70	-

<i>ND2</i>	PCG	+	4,057	5,103	-1	1047	ATG/TAA
<i>tRNA-Trp</i>	tRNA	+	5,103	5,172	1	70	-
<i>tRNA-Ala</i>	tRNA	-	5,174	5,243	1	70	-
<i>tRNA-Asn</i>	tRNA	-	5,245	5,317	4	73	-
<i>tRNA-Cys</i>	tRNA	-	5,351	5,419	5	69	-
<i>tRNA-Tyr</i>	tRNA	-	5,425	5,493	1	69	-
<i>COX1</i>	PCG	+	5,495	7,048	6	1554	GTG/TAG
<i>tRNA-Ser 2</i>	tRNA	-	7,055	7,125	0	71	-
<i>tRNA-Asp</i>	tRNA	+	7,126	7,196	3	71	-
<i>COX2</i>	PCG	+	7,200	7,890	0	691	ATG/T(AA)
<i>tRNA-Lys</i>	tRNA	+	7,891	7,964	1	74	-
<i>ATP8</i>	PCG	+	7,966	8,133	-10	168	ATG/TAA

<i>ATP6</i>	PCG	+	8,124	8,807	-1	683	ATG/TAA
<i>COX3</i>	PCG	+	8,807	9,592	5	786	ATG/TAA
<i>tRNA-Gly</i>	tRNA	+	9,598	9,668	0	71	-
<i>ND3</i>	PCG	+	9,669	10,019	-1	351	ATG/TAA
<i>tRNA-Arg</i>	tRNA	+	10,019	10,089	0	71	-
<i>ND4L</i>	PCG	+	10,090	10,386	-7	297	ATG/TAA
<i>ND4</i>	PCG	+	10,380	11,760	3	1381	ATG/T(AA)
<i>tRNA-His</i>	tRNA	+	11,764	11,832	1	69	-
<i>tRNA-Ser</i>	tRNA	+	11,834	11,900	0	72	-
<i>tRNA-Leu</i>	tRNA	+	11,903	11,974	0	72	-
<i>ND5</i>	PCG	+	11,975	13,810	-4	1836	ATG/TAA
<i>ND6</i>	PCG	-	13,807	14,328	0	522	ATG/TAG

<i>tRNA-Glu</i>	tRNA	-	14,319	14,397	1	69	-
<i>CYTB</i>	PCG	+	14,399	15,541	4	1143	ATG/TAA
<i>tRNA-Thr</i>	tRNA	+	15,546	15,616	8	71	-
<i>tRNA-Pro</i>	tRNA	-	15,652	15,694	97	70	-
<i>D-loop</i>	CR		15,792	17,500		1708	-

The length of *tRNA* genes varied from 67 bp (*tRNA^{Ser}*) to 75 bp (*tRNA^{Leu}*). All tRNA presented a typical cloverleaf secondary structure with a few base pair mismatches (Figure 2). The nucleotide frequencies of rRNA are A: 35.63%, T: 21.12%, G: 17.27%, C: 25.98%, with an AT content of 56.75%. Ten tRNAs showed secondary structure with mismatches: G-G base pair (instead of G-C), T-T (instead of T-A), A-A (instead of A-T), and G-T (instead of G-C) (Figure 2).

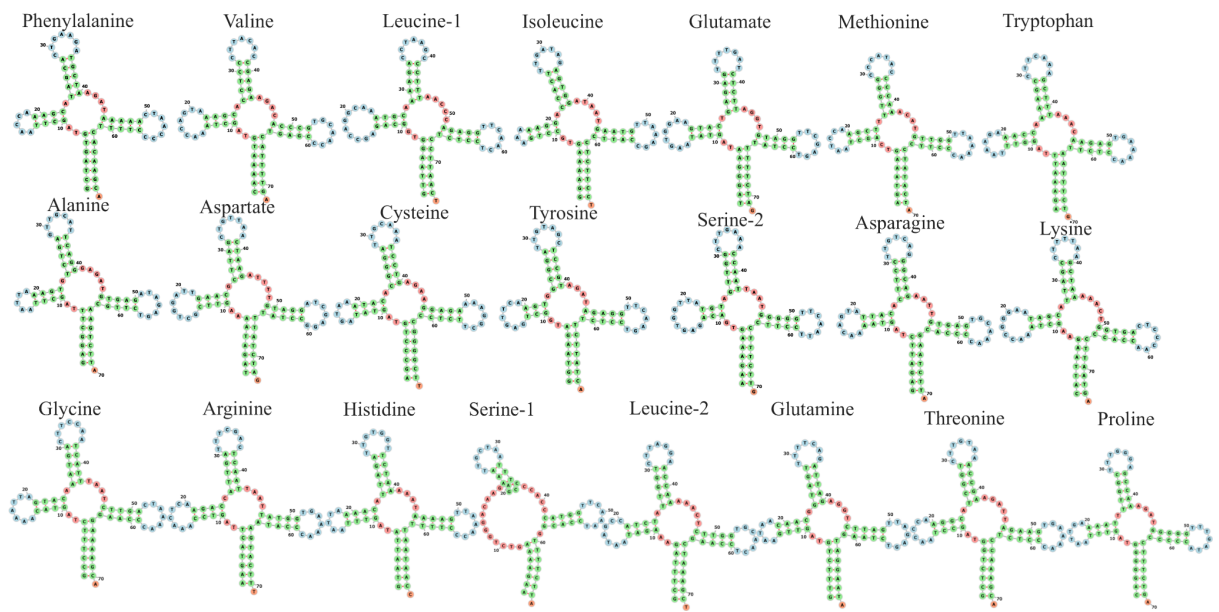


Figure 2. Secondary structure of tRNAs in the mitogenome of *P. leopoldi* visualized in the Forna web Server.

The gene order and orientation, along with the distribution of genes on both the heavy and light strands, exhibited complete congruence with the mitogenomes of other representatives within the *Potamotrygon* genus, including *P. falkneri*, *P. magdalenae*, *P. motoro*, *P. Orbignyi*, and one outgroup species, *C. milii*. We illustrate this notable similarity among the species in Figure 3. These findings underscore the remarkable conservation of gene organization and strand distribution within the *Potamotrygon* genus and contribute to our understanding of their evolutionary relationships.

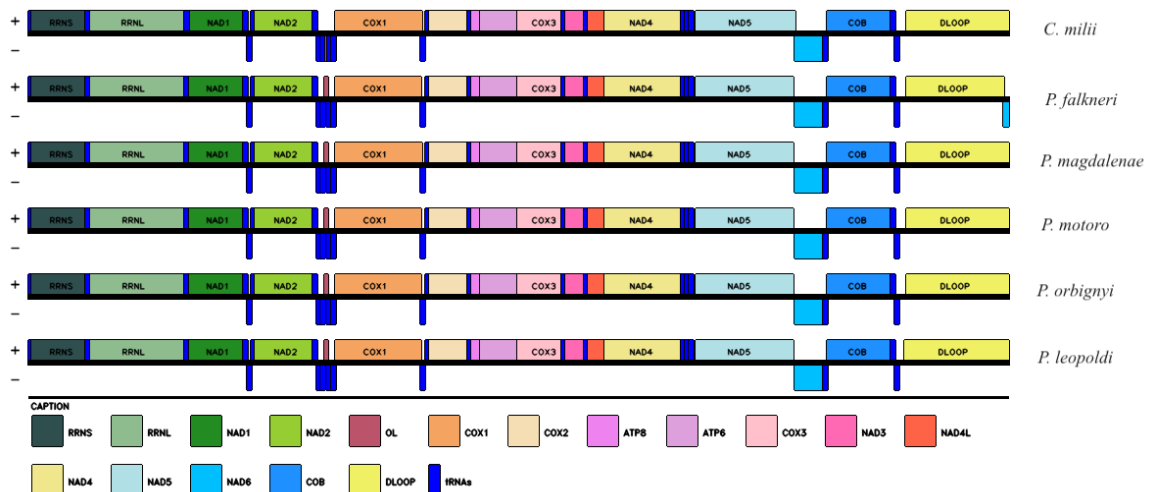


Figure 3. Arrangement of genes encoding rRNAs and proteins of *P. leopoldi* and other species of *Potamotrygon* genus. Heavy (+) and light (-) strands.

3.2. Protein-Coding Genes (PCGs)

The length of the protein-coding genes within the mitogenome of *P. leopoldi* was determined to be 11,444 base pairs (bp), with individual gene lengths ranging from 168 bp (*ATP8*) to 1,836 bp (*ND5*). The overall average A+T content was calculated to be 57.0%.

Comparative analysis with other Potamotrygonidae species revealed a significant similarity in the usage of conventional start and stop codons within most of the PCGs. Specifically, the majority of PCGs in *P. leopoldi* start the translation with the start codon ATG, and they commonly terminate with the stop codon TAA. However, notable exceptions were observed in two genes: the *COXI* gene utilized the start codon GTG, diverging from the typical ATG start codon pattern, and the *ND6* gene employed the stop codon TAG instead of the more common TAA stop codon.

The PCGs comprised approximately 64.70% of the total mitochondrial genome in *P. leopoldi*. The average effective number of codons, an indicator of codon usage bias, was determined to be 57.65. Our analysis predicted a total of 3,811 codons from the 13 PCGs found. Figure 4 displays the Relative Synonymous Codon Usage (RSCU) for the amino acids, revealing a significant bias in codon usage for most of them. Comparative analysis of RSCU across mitogenomes from various elasmobranch families demonstrated interesting similarities. When comparing the five representatives of the Potamotrygonidae family with the outgroup *C. milii*, the codon usage patterns showed consistency, further supporting the close phylogenetic relationships among these taxa. These comprehensive results provide valuable insights into the genomic features and codon preferences within the mitogenome of *P. leopoldi*, and also contribute to improving our understanding of codon usage patterns and evolutionary relationships among elasmobranch families.

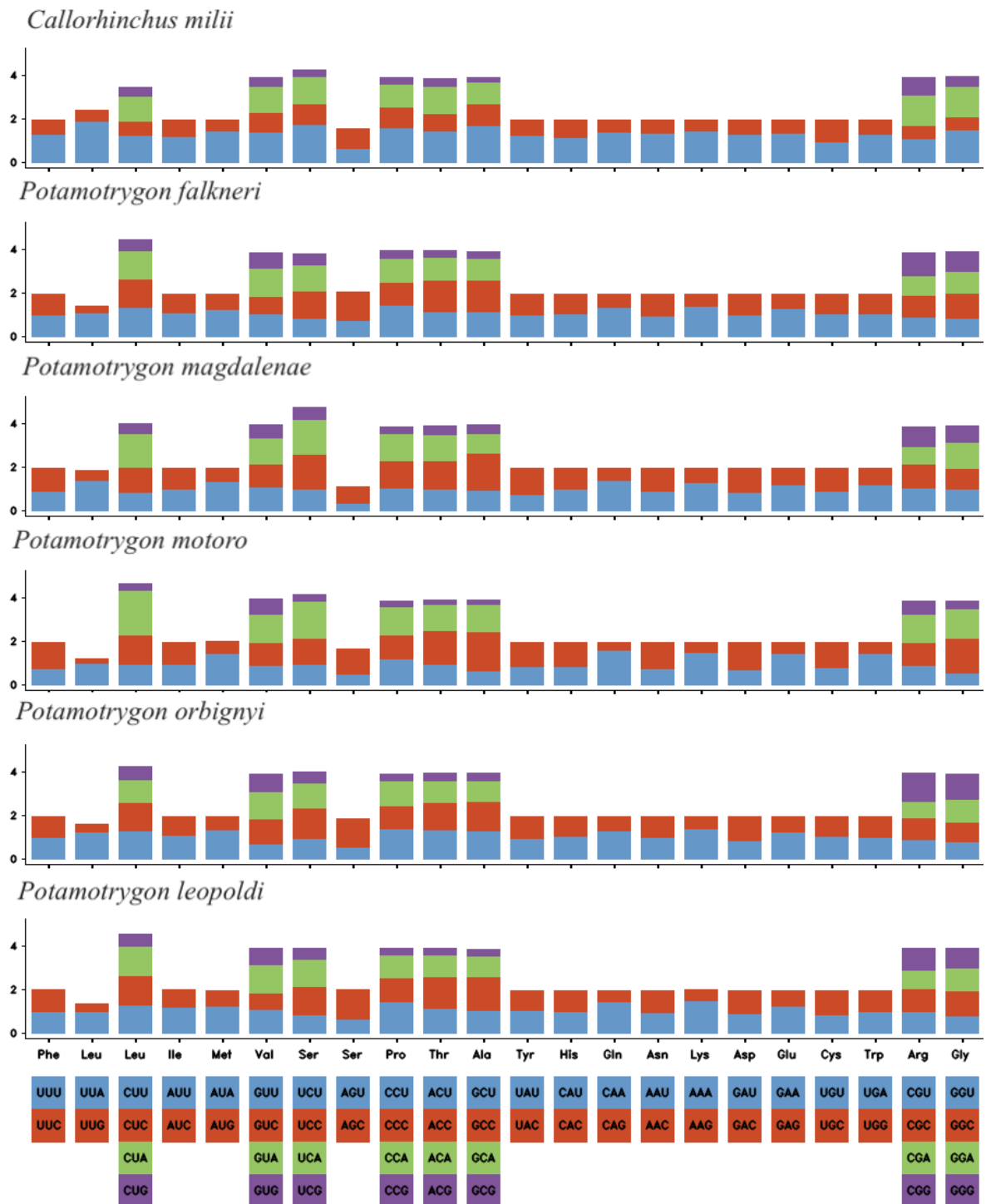


Figure 4. Relative Synonymous Codon Usage (RSCU) of the protein-coding genes of *P. leopoldi* and species from Potamotrygonidae family and the *C. milii* as outgroup.

3.3. Control region (CR)

The mitochondrial genome of *P. leopoldi* shares a conserved arrangement observed in other *Potamotrygon* mitogenomes, characterized by the positioning of the control region (CR)

between the *tRNA^{Phe}* and the *tRNA^{Pro}* (as illustrated in Figure 1). Notably, in *P. leopoldi*, this CR exhibits a high abundance of adenine (A) and thymine (T), resulting in a base composition of A=33.55%, T=29.92%, C=24.30%, and G=12.24%.

Within the CR of *P. leopoldi*, our investigation revealed the presence of two types of tandem repeats, the first consisting of a larger 128 bp-long repeat, and a smaller with only 20 bp (Figure 5). These findings showed the genomic organization and sequence characteristics of the *P. leopoldi* mitogenome, offering valuable insights into the genetic diversity and evolutionary aspects within this species.

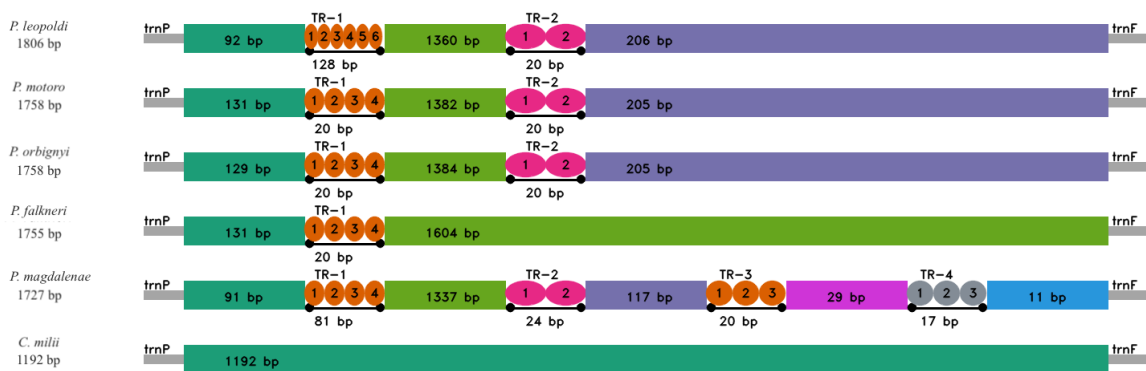


Figure 5. Organization of the D-loop region in the complete mitogenomes of *P. leopoldi* and other four species from *Potamotrygon* genus and outgroup *C. milii*.

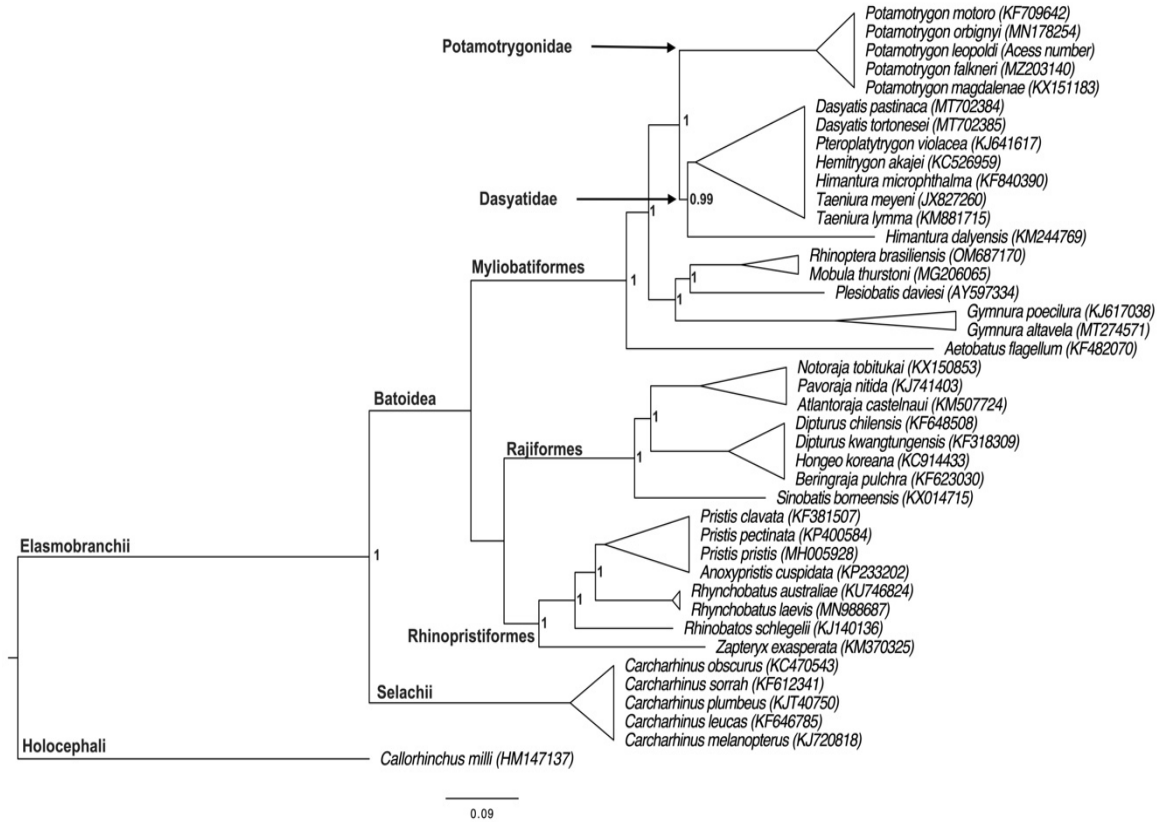
3.4. Adaptive molecular evolution

In the analysis of the mitogenome we found sites in positive selection when compared with myliobatiformes that have mitogenomes annotated in the GenBank. *ND1-1* sites under positive selection, *ND4-1* site under positive selection, *ND5-3* sites under positive selection, *COXI-6* site under positive selection, *COXII-3* sites under positive selection. With the analysis the positive selection may be related with the functional adaptive adjustment to the freshwater stingrays has the adaptation to survive and colonize the freshwater on Amazon Basins.

3.5. Phylogenetic analyses

In the phylogenetic tree created through the BI method, the species display strong nodal support, forming separate clades for different families. Particularly, the family Potamotrygonidae is observed to be a monophyletic group and shares a sister relationship with the Dasyatidae family. Additionally, the Myliobatidae family is positioned as a basal group.

Further examination of the tree reveals a sister relationship between *P. leopoldi*, *P. falkneri* and *P. orbignyi* (Figure 6).



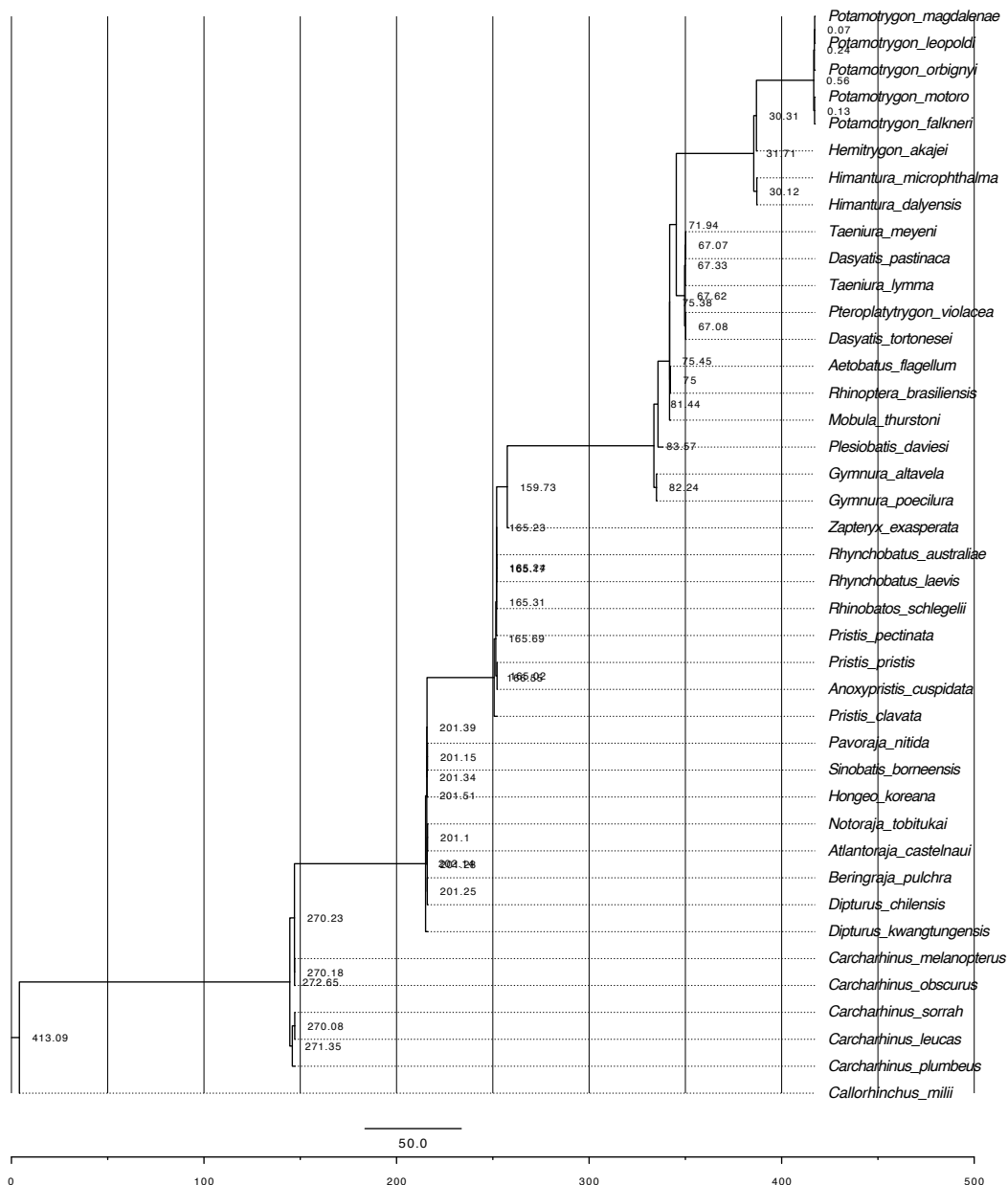


Figure 6.- Phylogenetic tree using the complete mitochondrial genome of species of order Myliobatiformes. GenBank Accession IDs are in brackets. The nodal support indicates the posterior probability in BI.

4. Discussion

4.1. Mitochondrial genome characterization

Here, we performed a comprehensive sequencing of the complete mitochondrial genome of *P. leopoldi*. The sequencing approach yielded a coverage of 11X, and we

complemented our data with publicly available sequences previously published by Zhou et al. in 2022 [11]. The utilization of next-generation sequencing (NGS) technology in this study presents multiple advantages, notably the generation of long reads, which helps compensate for the relatively lower coverage achieved. Furthermore, the incorporation of short-read sequences contributes to enhancing the assembly process, leading to a more precise description of the mitochondrial genome [25].

Within the Potamotrygonidae family, the length of mitogenomes varies, ranging from 17,429 bp (*P. magdalenae*) to 17,449 bp (*P. orbignyi*) [26]. Our analysis revealed that the mitogenome of *P. leopoldi* presents a length of 17,504 bp, making it larger than that of *P. orbignyi*, which previously held the record as the largest mitogenome described within the Potamotrygonidae family, which was 17,449bp [26].

This variation in mitogenome size can be attributed to differences in the length of the control region and intergenic regions. These regions are known to experience less influence from selection and exhibit a higher mutation rate, contributing to substantial variation among species [27]. Our study provides important insights into the genomic diversity within the Potamotrygonidae family and highlights the significance in shaping mitogenome size variation.

In the mitochondrial genome, nucleotides exhibit differential distribution between the two DNA strands, giving rise to DNA asymmetry [28]. To assess this asymmetry in the studied mitogenome, AT/GC skewness values were calculated. In the mitogenome of *P. leopoldi*, we observed positive values for AT skewness, indicating an abundance of adenine (A) over thymine (T). Conversely, negative values were noted for GC skewness, implying an excess of cytosine (C) relative to guanine (G). The observed asymmetry can be attributed to the outcomes of mitochondrial replication and transcription, as these molecular processes result in the unwinding of the DNA duplex, thereby facilitating the transient exposure of single-stranded DNA regions that exhibit an elevated susceptibility to mutational events [29-31]. The AT and GC skew values observed in the mitogenome of *P. leopoldi* were similar to those detected in other *Potamotrygon* species, such as *P. falkneri* [32]. These contribute to a better understanding of the genomic characteristics and evolutionary aspects within the *Potamotrygon* genus.

4.2. Protein-Coding Genes

The gene arrangement within the mitochondrial genome of *P. leopoldi* exhibited notable similarity to the commonly reported arrangement observed in most vertebrates [33]. Through a

comprehensive comparative analysis involving four mitogenomes of species from the *Potamotrygon* genus, we found a remarkably conserved gene arrangement, even in comparison to the outgroup species *C. milii* (Figure 3). Collectively, these findings strongly indicate a highly conserved mitogenome organization within the Potamotrygonidae. Nachtigall, Loboda and Pinhal [32] suggested that rearrangements in the mitochondrial genome of Batoidea species may be uncommon, which is in line with our findings that Potamotrygonidae mitogenomes have a conserved arrangement compared to other vertebrates. These observations contribute with valuable insights into the genomic organization and evolutionary patterns within the Potamotrygonidae family and highlight the significance of conserved gene arrangements in these species.

In many species, synonymous codons are not used at an equal frequency for specific genes, resulting in codon usage bias. Prior studies have reported the existence of such bias in the mitochondrial genomes of elasmobranchs and other fishes [34]. We observed codon usage bias for several genes among the species within the Potamotrygonidae family. The occurrence of this bias can be influenced by multiple factors, such as gene length, translational selection, tRNA abundance, mutation bias, GC composition, and the amino acid composition of proteins.

To quantify the degree of codon bias within and among species, we employed the effective number of codons (ENc). This metric ranges from 20 to 61, where a value close to 20 indicates that only one codon from each codon family is used, while a value close to 61 indicates that all synonymous codons are utilized equally [35]. In our investigation, *P. leopoldi* exhibited an elevated ENc value of 57.65, meaning that synonymous codons are equally used within the Potamotrygonidae family. This observation aligns with the findings depicted in Figure 4. These results provide valuable insights into the codon usage patterns within the Potamotrygonidae family and enhance our comprehension of the factors influencing codon bias in mitochondrial genomes of freshwater stingrays.

4.3. Control region (CR)

As in other Myliobatiformes mitogenomes, the CR found here has tandem repeat regions with variable copy numbers and lengths of repeat units (Figure 5). Our analysis showed that the CR of *P. leopoldi* has a similar pattern of control region (Figure 5) with other representants in the *Potamotrygon* genus that have information of complete mitogenome in the public databases. Variability in the tandem repeat regions is common in elasmobranchs, and

the high content of tandem repeats is responsible for the similar mtDNA genome size among the elasmobranchs [36]. Generally, the published mitogenomes of Potamotrygonidae lack discussion regarding tandemly repeated sequences within the control region. These features could potentially play a role in the regulation of replication in the mitochondrial genome, as suggested in other vertebrates (e.g., [37], [38]).

4.4. Adaptive molecular evolution

Based on the results obtained in the study, the positive selection was found in *ND1*, *ND4*, *ND5*, *COX I*, and *COX II*. Demonstrate that the *P. leopoldi* when compared with other Myliobatiformes and Potamotrygon species have supported the hypothesis of the migration of the marine stingrays millions of years ago and have a big adaptation, in this way, we can see the adaptive in regions of the mitogenome. Supporting this idea, several studies shown that in ND genes, have the functionally related to proton piping process in the oxidative metabolism, are under strong positive selection in vertebrate species [39-44].

Noll, Leon, Brandt, Pistorius, Le Bohec, Bonadonna, Trathan, Barbosa, Rey, Dantas, Bowie, Poulin and Vianna [44], found positive selection in penguins and the complex ND1 and ATP complex, play a central role in cellular energy production and are the genes that are present in the greatest evidence in selection in marine organisms. Sebastian, Sukumaran and Gopalakrishnan [40] study clupeoid fish that colonized different habitats over millions presented positive selection in PCGs *ND2*, *ND4*, *ND5*, and *ND6* are presented in lineages that converge at the marine to the freshwater transition and have a relatively high number of amino acid changes. In the freshwater stingrays the selective pressures are very similar to those that occurred in the clupeoid fish and would result from the selective pressures coming from niche changes, such as the transition from the saltwater to freshwater environment. Indeed, when conducting molecular evolutionary analysis on the clupeoid, certain mitochondrial genes have been identified with sites subject to positive selection in freshwater species, as opposed to their closely related saltwater counterparts [40].

4.5. Phylogenetic analyses

The phylogenetic analyses in this study illustrate the evolutionary positioning of *Potamotrygon* species (Figure 6). Our results reveal a close relationship between *P. leopoldi*

and other species from the Potamotrygonidae family. The sequence of the five representants have a high similarity. The tree demonstrates monophyly, supporting the findings of Nachtigall, Loboda and Pinhal [32], who inferred the phylogeny of the Potamotrygonidae family and proposed that the genus *Potamotrygon* is also monophyletic. Additionally, gene similarity comparisons indicate a strong resemblance among species within the *Potamotrygon* genus, particularly in the mitochondrial sequence. This similarity is likely due to the well-established evolutionary biogeographic history of the genus.

5. Conclusions

In this study, we present the first complete mitochondrial genome of *P. leopoldi*, endemic in the Xingu River from the Amazon region, by integrating publicly available mitogenomes from other Potamotrygonidae species with our high-throughput sequencing. The *P. leopoldi* mitogenome comprises 13 PCGs, 22 tRNAs, and two rRNAs, with a structure similar to other Potamotrygon species. Phylogenetic analysis shows a sister relationship with *P. orbignyi* and *P. falkneri*, increasing the understanding of Potamotrygonidae evolution. The analysis of mitogenome created clues to understand the migration of marine stingray and the adaptation of the actual freshwater stingray, in observation of the positive selection in the genes when compared with the marine stingray mitochondrial genome. The presented mitogenome data is valuable for future phylogenetic, DNA barcoding, and metabarcoding studies, aiding research in genetic diversity and evolutionary history for these important stingrays.

Acknowledgments

We thank the SEMAS/PA that give the necessary permissions and access to the samples for the development of this study.

Funding

This work was supported by the Coordination of Superior Level Staff Improvement, Finance Code: 001 (CAPES). This work was supported by Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana (Biocomputacional—Protocol no.3381/2013/CAPES), National Research Council from Brazil (CNPq-620139/2006-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará

(FAPESPA- 042/2007) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará (PROPESP/UFPA). This work was supported by SEMAS/UFRA Cooperation of agreement N° 05/2018.

REFERENCES

- [1] B. Alberts, Molecular biology of the cell, New york, 2017.
- [2] A.I. Gaziev, A. Podlutskii, [Low efficiency of DNA repair system in mitochondria], *Tsitologiya* 45(4) (2003) 403-17. <https://doi.org/>.
- [3] COMEXSTAT, Exportação e Importação Geral do Brasil, in: C.E.e.S. Ministério da Indústria (Ed.) 2023.
- [4] M.R.d. Carvalho, M.P. Ragno, 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), *Pap. Avuls. Zool.* 51 (2011) 101-138. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492011000700001>.
- [5] P. Charvet-Almeida, M.L.c. Gûes, Neotropical Freshwater Stingrays: diversity and conservation status, 2008.
- [6] M.R. De Carvalho, N.R. Lovejoy, Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), *Zootaxa* 2776(1) (2011). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2776.1.2>.
- [7] Y. Torres, V.V. Faria, P. Charvet, Current status and future perspectives of Neotropical freshwater stingrays (Potamotrygoninae, Myliobatiformes) genetics, *Environ. Biol. Fishes* 105(8) (2022) 1111-1127. <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01320-x>.
- [8] C. Lasso, R. Rosa, M. Morales, D. Garrone Neto, M. Carvalho, *Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina*, 2016.
- [9] J.P. Fontenelle, F. Portella Luna Marques, M.A. Kolmann, N.R. Lovejoy, Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution, *J. Biogeogr.* 48(6) (2021) 1406-1419. <https://doi.org/10.1111/jbi.14086>.
- [10] D. Sanches, T. Martins, Í. Lutz, I. Veneza, R.D. Silva, F. Araújo, J. Muriel-Cunha, I. Sampaio, M. Garcia, L. Sousa, G. Evangelista-Gomes, Mitochondrial DNA suggests Hybridization in Freshwater Stingrays *Potamotrygon* (POTAMOTRYGONIDAE: MYLIOBATIFORMES) from the Xingu river, Amazonia and reveals speciation in *Paratrygon aireba*, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93(3) (2021). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191325>.

- [11] J. Zhou, A. Liu, F. He, Y. Zhang, L. Shen, J. Yu, X. Zhang, Draft Genome of White-blotched River Stingray Provides Novel Clues for Niche Adaptation and Skeleton Formation, *Genomics Proteomics Bioinformatics* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.11.005>.
- [12] S. Koren, B.P. Walenz, K. Berlin, J.R. Miller, N.H. Bergman, A.M. Phillippy, Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation, *Genome Res.* 27(5) (2017) 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>.
- [13] R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt, Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads, *PLoS Comput Biol* 13(6) (2017) e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- [14] T. Zhu, Y. Sato, T. Sado, M. Miya, W. Iwasaki, MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in 10 Years, *Mol. Biol. Evol.* 40(3) (2023). <https://doi.org/10.1093/molbev/msad035>.
- [15] P. Kerpedjiev, S. Hammer, I.L. Hofacker, Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams, *Bioinformatics* 31(20) (2015) 3377-3379. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv372>.
- [16] G. Benson, Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences, *Nucleic Acids Res.* 27(2) (1999) 573-80. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>.
- [17] N.T. Perna, T.D. Kocher, Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes, *J. Mol. Evol.* 41(3) (1995) 353-8. <https://doi.org/10.1007/BF00186547>.
- [18] K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Mol. Biol. Evol.* 38(7) (2021) 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- [19] F. Ronquist, J.P. Huelsenbeck, MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics* 19(12) (2003) 1572-4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.
- [20] A. Rambaut, FigTree v1.3.1, (2010).
- [21] W.L.S. Li, A.J. Drummond, Model Averaging and Bayes Factor Calculation of Relaxed Molecular Clocks in Bayesian Phylogenetics, *Mol. Biol. Evol.* 29(2) (2011) 751-761. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr232>.
- [22] N.C. Aschliman, M. Nishida, M. Miya, J.G. Inoue, K.M. Rosana, G.J.P. Naylor, Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea), *Mol. Phylogen. Evol.* 63(1) (2012) 28-42. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.012>.
- [23] S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, S.B. Hedges, TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times, *Mol. Biol. Evol.* 34(7) (2017) 1812-1819. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx116>.
- [24] X. Xia, DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution, *Mol. Biol. Evol.* 30(7) (2013) 1720-8. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst064>.
- [25] S.N. Maduna, A. Vivian-Smith, Ó.D.B. Jónsdóttir, A.K.D. Imsland, C.F.C. Klütsch, T. Nyman, H.G. Eiken, S.B. Hagen, Mitogenomics of the suborder Cottoidei (Teleostei: Perciformes):

- Improved assemblies, mitogenome features, phylogeny, and ecological implications, *Genomics* 114(2) (2022) 110297. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110297>.
- [26] D. Ory, Y. Cuenot, R. Vigouroux, R. Covain, S. Brosse, J. Murienne, Complete mitochondrial genome of the river stingray *Potamotrygon orbignyi* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae), *Mitochondrial DNA B Resour* 4(2) (2019) 3153-3154. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1666683>.
- [27] A. Reyes, C. Gissi, G. Pesole, C. Saccone, Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals, *Mol. Biol. Evol.* 15(8) (1998) 957-66. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026011>.
- [28] N.M. Krishnan, H. Seligmann, S.Z. Raina, D.D. Pollock, Detecting gradients of asymmetry in site-specific substitutions in mitochondrial genomes, *DNA Cell Biol.* 23(10) (2004) 707-14. <https://doi.org/10.1089/dna.2004.23.707>.
- [29] A. Hassanin, N. Léger, J. Deutsch, Evidence for Multiple Reversals of Asymmetric Mutational Constraints during the Evolution of the Mitochondrial Genome of Metazoa, and Consequences for Phylogenetic Inferences, *Syst. Biol.* 54(2) (2005) 277-298. <https://doi.org/10.1080/10635150590947843>.
- [30] J. Swire, O.P. Judson, A. Burt, Mitochondrial genetic codes evolve to match amino acid requirements of proteins, *J. Mol. Evol.* 60(1) (2005) 128-39. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0077-9>.
- [31] C. Grande, J. Templado, R. Zardoya, Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements, *BMC Evol. Biol.* 8(1) (2008) 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-61>.
- [32] P.G. Nachtigall, T.S. Loboda, D. Pinhal, Signatures of positive selection in the mitochondrial genome of neotropical freshwater stingrays provide clues about the transition from saltwater to freshwater environment, *Mol. Genet. Genomics* 298(1) (2023) 229-241. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01977-0>.
- [33] J.L. Boore, Animal mitochondrial genomes, *Nucleic Acids Res.* 27(8) (1999) 1767-80. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>.
- [34] M.T. Alam, R.A. Petit, T.D. Read, A.D.M. Dove, The complete mitochondrial genome sequence of the world's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*), and its comparison with those of related shark species, *Gene* 539(1) (2014) 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.064>.
- [35] F. Wright, The 'effective number of codons' used in a gene, *Gene* 87(1) (1990) 23-29. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90491-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90491-9).
- [36] P. Diaz-Jaimes, N.J. Bayona-Vasquez, D.H. Adams, M. Uribe-Alcocer, Complete mitochondrial DNA genome of bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, and phylogenetic relationships among main superorders of modern elasmobranchs, *Meta Gene* 7 (2016) 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.11.005>.
- [37] G. Formenti, A. Rhie, J. Balacco, B. Haase, J. Mountcastle, O. Fedrigo, S. Brown, M.R. Capodiferro, F.O. Al-Ajli, R. Ambrosini, P. Houde, S. Koren, K. Oliver, M. Smith, J. Skelton, E. Betteridge, J. Dolucan, C. Corton, I. Bista, J. Torrance, A. Tracey, J. Wood, M. Uliano-Silva, K. Howe, S. McCarthy, S. Winkler, W. Kwak, J. Korlach, A. Functamman, D. Fordham, V. Costa,

- S. Mayes, M. Chiara, D.S. Horner, E. Myers, R. Durbin, A. Achilli, E.L. Braun, A.M. Phillippy, E.D. Jarvis, C. Vertebrate Genomes Project, Complete vertebrate mitogenomes reveal widespread repeats and gene duplications, *Genome Biol* 22(1) (2021) 120. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02336-9>.
- [38] V. Kousteni, S. Mazzoleni, K. Vasileiadou, M. Rovatsos, Complete Mitochondrial DNA Genome of Nine Species of Sharks and Rays and Their Phylogenetic Placement among Modern Elasmobranchs, *Genes (Basel)* 12(3) (2021). <https://doi.org/10.3390/genes12030324>.
- [39] A.D. Foote, P.A. Morin, J.W. Durban, R.L. Pitman, P. Wade, E. Willerslev, M.T. Gilbert, R.R. da Fonseca, Positive selection on the killer whale mitogenome, *Biol. Lett.* 7(1) (2011) 116-8. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0638>.
- [40] W. Sebastian, S. Sukumaran, A. Gopalakrishnan, Comparative mitogenomics of Clupeoid fish provides insights into the adaptive evolution of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes and codon usage in the heterogeneous habitats, *Heredity* 128(4) (2022) 236-249. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00519-z>.
- [41] J.H. Xia, H.L. Li, Y. Zhang, Z.N. Meng, H.R. Lin, Identifying selectively important amino acid positions associated with alternative habitat environments in fish mitochondrial genomes, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* 29(4) (2018) 511-524. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1315567>.
- [42] S. Consuegra, E. John, E. Verspoor, C.G. de Leaniz, Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species, *Genet. Sel. Evol.* 47(1) (2015) 58. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0138-0>.
- [43] É.M.S. de Souza, L. Freitas, E.K. da Silva Ramos, G. Selleghin-Veiga, M.C. Rachid-Ribeiro, F.A. Silva, M. Marmontel, F.R. dos Santos, A. Laudisoit, E. Verheyen, D.P. Domning, M.F. Nery, The evolutionary history of manatees told by their mitogenomes, *Scientific Reports* 11(1) (2021) 3564. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82390-2>.
- [44] D. Noll, F. Leon, D. Brandt, P. Pistorius, C. Le Bohec, F. Bonadonna, P.N. Trathan, A. Barbosa, A.R. Rey, G.P.M. Dantas, R.C.K. Bowie, E. Poulin, J.A. Vianna, Positive selection over the mitochondrial genome and its role in the diversification of gentoo penguins in response to adaptation in isolation, *Scientific Reports* 12(1) (2022) 3767. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07562-0>.

5. CAPÍTULO III –

Genomic approach for conservation of *Potamotrygon leopoldi* of the Xingu River.

Abordagem genômica para conservação de *Potamotrygon leopoldi* do Rio Xingu.

Artigo em preparação para ser submetido na Plos One

ISSN: 1932-6203

Fator de Impacto: 3.75

Qualis: A1

Genomic approach for conservation of *Potamotrygon leopoldi* of the Xingu River.

Sávio L. M. Guerreiro^a, Amanda Vidal^d, Caio S. Silva^a, Daniel H. F. Gomes^b, Jorge E. S. de Souza^b, Éder Pires^d, Guilherme Oliveira^d, Igor Hamoy^c, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^a, Sidney Santos^a.

^aLaboratório de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará (UFPA), Pará, Brazil.

^bBioinformatics Multidisciplinary Environment (BioME), Digital Metropolis Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, Brazil.

^cLaboratório de Genética Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Pará, Brazil

^dInstituto Tecnológico da Vale (ITV), Pará, Brazil.

*Correspondence: sidneysantosufpa@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to develop PCR assays, reaction combinations, and a validation of tetranucleotides SSR loci for *Potamotrygon leopoldi*, an Amazonian species that is very captured for use as ornamental fishery, which is currently high danger of extinction due to the disorderly fishing exploitation and the reproductive strategy. Several factors contribute to the increase of this treat among which we highlight the lack of genetic information about the structure and taxonomic status of the species, as well as the lack of accurate tools for evaluation of the effectivity of current management programs. Based in *P. leopoldi* genome five specific and interspecific microsatellites are developed, including their proposed primers. From this panel, a multiplex system containing 5 tetranucleotides microsatellite markers validated. These tools are very important in many areas as bioinformatics, ecology, parental management, genetics, evolution. The panel generate a more accurate information for fishing management of wild population and fiscalization of this species in the process of exportation, avoiding to frauds.

Keywords: *Potamotrygon*, Ornamental fisheries, multiplex, SSR.

INTRODUCTION

The species *Potamotrygon leopoldi* (Castex, 1872) belongs to the family Potamotrygonidae and the order Myliobatiformes, which is the only clade composed of freshwater stingrays (LASSO *et al.*, 2016). This species can be found in the Rio Xingu basin in Brazil. For decades, *P. leopoldi* has been a significant species in the export of ornamental fish, with high demand in the international market (CHARVET-ALMEIDA; GÊNES, 2008). This highlights the need for caution regarding the overexploitation of the species, which lacks sufficient data on its population dynamics. This lack of information makes it difficult to assess the risk of extinction and/or population status (TORRES; FARIA; *et al.*, 2022).

P. leopoldi, along with other freshwater species, is listed in Appendix III of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) and by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). However, Brazilian institutions have not designated the Xingu ray as endangered due to insufficient data.

In Brazil, the uncontrolled exploitation of fish stocks has been a significant issue. To reduce pressure on natural stocks, a quota system for capturing freshwater stingrays was established. Nevertheless, illegal capture contributes to the predatory fishing of *P. leopoldi* (RAMOS *et al.*, 2015).

Microsatellite markers, also known as short tandem repeats (STR) or simple sequence repeats (SSR), are DNA sequences consisting of repeated mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, and pentanucleotide units arranged in tandem along the genomes of most eukaryotic species (KELKAR *et al.*, 2010). They possess characteristics such as widespread distribution in eukaryotic genomes, easy detection through polymerase chain reaction (PCR), locus-specific nature, codominant inheritance, high mutation rates, and high polymorphism. These features make microsatellite markers highly advantageous for various research fields, including forensic and population genetics, conservation biology, and genomic mapping in evolutionary and biological contexts. These biomarkers allow the amplification of two or more loci in a single multiplex PCR reaction (LI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2014).

Multiplex PCR involves the simultaneous amplification of multiple loci marked with different fluorescent labels, which are subsequently analyzed by a genetic analyzer using capillary electrophoresis. It is considered a reliable technique due to the use of capillary

electrophoresis with fluorescently labeled primers, providing high sensitivity for detecting amplified DNA fragments (HAMOY; SANTOS, 2012; LI *et al.*, 2018). Several methods are used for obtaining microsatellite markers, but they are extremely labor-intensive and time-consuming. Advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have made more data available, enabling faster, cost-effective, and large-scale molecular marker mining (JOHRI *et al.*, 2019). Therefore, to contribute to the monitoring and conservation of this species, we have developed a comprehensive genomic panel of potentially amplifiable microsatellite loci.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Aspects

For sample collection, a protocol approved by SEMAS/PA, associated with Technical Cooperation Agreement No. 05/2018-SEMAS/PA, established between SEMAS and UFRA, was utilized. Under this agreement, SEMAS provided biological material obtained from their monitoring activities. The methodology employed was sanctioned by the committee overseeing this technical cooperation. The samples resulting from this collaborative effort were made available for the current study.

Sample collection

The sample collection was carried out following established protocols. Initially, surgical-level anesthesia of the fish was performed using Tricaine Methane sulfonate (MS222), according to the weight of the animals under study. After this step, appropriate restraint was applied, and two tissue fragments were extracted from the pectoral fin of *P. leopoldi* using a 1mm biopsy punch. These fragments were then placed in 1.5mL microcentrifuge tubes containing 95% ethanol for material preservation. Tissue samples were collected from 39 mature individuals and 161 juveniles of the *P. leopoldi* species. The samples were obtained from a freshwater stingray production farm located in the municipality of Salinópolis in the state of Pará. This activity was part of the operational activities conducted by the technical team of SEMAS/PA as part of their monitoring and enforcement efforts.

DNA Extraction and quantification

The DNA was extracted from the harvested tissue using the commercial Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), following the manufacturer's stipulated procedures. Subsequent to extraction, the samples will undergo meticulous scrutiny for their

structural integrity via 1% agarose gel electrophoresis. Only those samples demonstrating substantial molecular weight will be retained for further analysis. Following this, quantification will be executed using the Qubit® fluorometer in tandem with the Qubit® dsDNA BR Assay reagent kit.

DNA extraction was executed utilizing the "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega, USA), a commercial DNA extraction kit. The procedures outlined by the manufacturer were meticulously followed. Following extraction, an assessment of DNA integrity was conducted, followed by quantification using the precision spectrophotometer Nanodrop ND1000. The 260/280 ratio will be employed as a parameter to appraise DNA purity, with absorption values surpassing 1.80 considered suitable for subsequent phase analyses.

Data mining

The development of this study was based in the assembly of long reads for *P. leopoldi* using the new generation sequencing in the PacBio Platform Sequel I.

Bioinformatic analysis

Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT) (TEMNYKH *et al.*, 2001) was used to find all simple sequence repeats (SSRs). We changed the default parameters related to motif-repeat in the source code of SSRIT, which was made in Perl, to specify motif length and the minimum number of repeats. The other attributes remained with their default values.

Microsatellites sequences counted from all samples generated by the SSRIT were processed by in-house scripts in Python (v. 3.7.2) to insert the flanking regions in the 5' and 3' portions of DNA sequence, and transform them in a "doc.fasta" file. After, the sequences which exhibited microsatellites were submitted to Primer 3 (v. 4.1.0) (UNTERGASSER *et al.*, 2012), whose premise is design PCR primers from DNA sequences. In Primer 3, the default parameters of primer length, (|Primer Opt Size = 22|, |Primer Min Size = 22|, and |Primer Max Size = 23|) were modified to 24, 21, and 28, respectively, another modification in the default parameters are in the temperature (|Primer Opt Tm= 59°C|, |Primer Min Size = 57 °C|, and |Primer Max Size = 62 °C|), were modified to 60, 59 and 61, respectively, with maximum difference between the temperatures of 1°C degree. The parameters of primer product size range were modified for 50-1000 nucleotides.

Microsatellite Selection and Polymorphism Testing

A panel of microsatellites was constructed for the white-blotched stingray *P. leopoldi*, and from all the identified microsatellites, 5 tetranucleotide microsatellite markers were chosen to form the multiplex panel system. The following criteria were applied for this assembly: the selected markers had to be tetranucleotide microsatellites with a minimum of 10 repetitions and a maximum of 20 repetitions outside of coding regions.

Primer Testing and Genotyping

Genotyping was performed using a combined PCR reaction where all 10 microsatellite markers were simultaneously amplified and standardized at 9.5 μL . This entailed the use of 5.0 μL of 2X Qiagen multiple PCR Master mix and 1 μL of genomic DNA. The relative proportion for each primer mix is detailed in Table 1. The reaction was standardized and optimized for the amplification of genomic DNA at a concentration of 5 ng/ μL .

Amplification reactions were carried out using a Veriti thermocycler (Applied Biosystems). The thermocycling conditions were as follows: an initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 90 seconds, and 72°C for 60 seconds and 72°C for 60 seconds, with a final extension at 72°C for 30 minutes.

Statistical analysis

The dataset was checked for genotyping errors and null alleles using Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). We analyzed the genetic variability using the allele number per locus (N_A), the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity indexes, and the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), using Arlequin 3.5.1.257 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), followed by Bonferroni's correction (RICE, 1989). The same program was used to determine the proportion of locus pairs in linkage disequilibrium (LD).

The inbreeding coefficient (F_{IS}) was calculated in GENEPOP (ROUSSET, 2008). The polymorphism information content (PIC), the power of discrimination (PD), and the power of exclusion (PE) for all markers using the forensic statistic tool FORSTAT (RISTOW; D'AMATO, 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Broad Panel

As a result of SMRT sequencing (PacBio Sequel I) of the *P. leopoldi* species, a total of 110,1Gb sequences were produced, with a final assembly of 970Mb, Contig N50 = 7.44kb.

Following analyses with the Primer 3 program, 37,386 perfect microsatellite occurrences were detected. Out of these, 13,215 contained dinucleotide repeat motifs (36.91%), 409 had trinucleotide motifs (1.14%), 21,282 had tetranucleotide motifs (59.44%), 253 had pentanucleotide motifs (0.72%), and 641 had hexanucleotide motifs (1.79%) as seen in the Figure 01.

A total of 37,386 microsatellites was found in the genome of *P. leopoldi* were selected and synthesized based on the number of repetitions, motifs, and suitability of flanking regions. The table S1(<http://doi.org/10.6084/m9.figshare.24522115>) contains all the information about the prospecting microsatellites, including motif size, the number of repetitions, initial and final positions, scaffold number and size, forward and reverse primers designed for the loci, and the expected size of polymerase chain reaction (PCR) products. The average size of PCR reaction products was 202 base pairs.

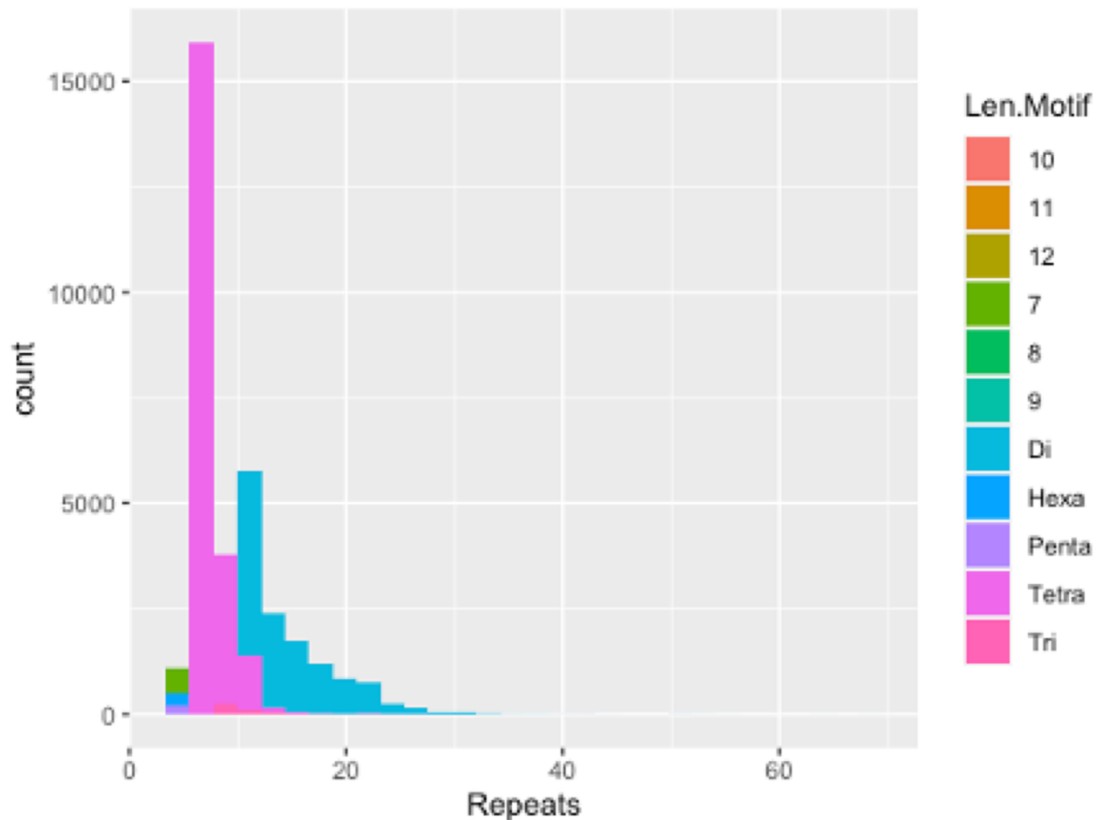


Figure 01. Distribution of the classes of *P. leopoldi* microsatellites and the number of repetitons.

Multiplex System

The panel generated in our study allowed the selection and validation of 5 tetranucleotide microsatellite loci, which were inserted into a multiplex system (Pleop01, Pleop02, Pleop03, Pleop04, Pleop05). The multiplex system showed adequate resolution, without overlap between microsatellite alleles and the absence of artifacts (Figures containing the electropherogram of the panel). No genotyping errors attributed to stutter bands and null alleles, which are often found in dinucleotide microsatellites, were detected.

The developed panel was used to assess a wild population of *P. leopoldi* from Altamira captured in the Xingu and maintained in captivity on a freshwater stingray farm in Salinópolis (n=7). After subjecting the samples to the panel, a total of 25 alleles were obtained, with an average allele count per locus of 5.0. The observed and expected heterozygosity rates varied from 1.000 (Pleop01) to 0.571 (Pleop05), with an average of 0.816 (Pleop02) and 0.530 (Pleop05), respectively (Table 2).

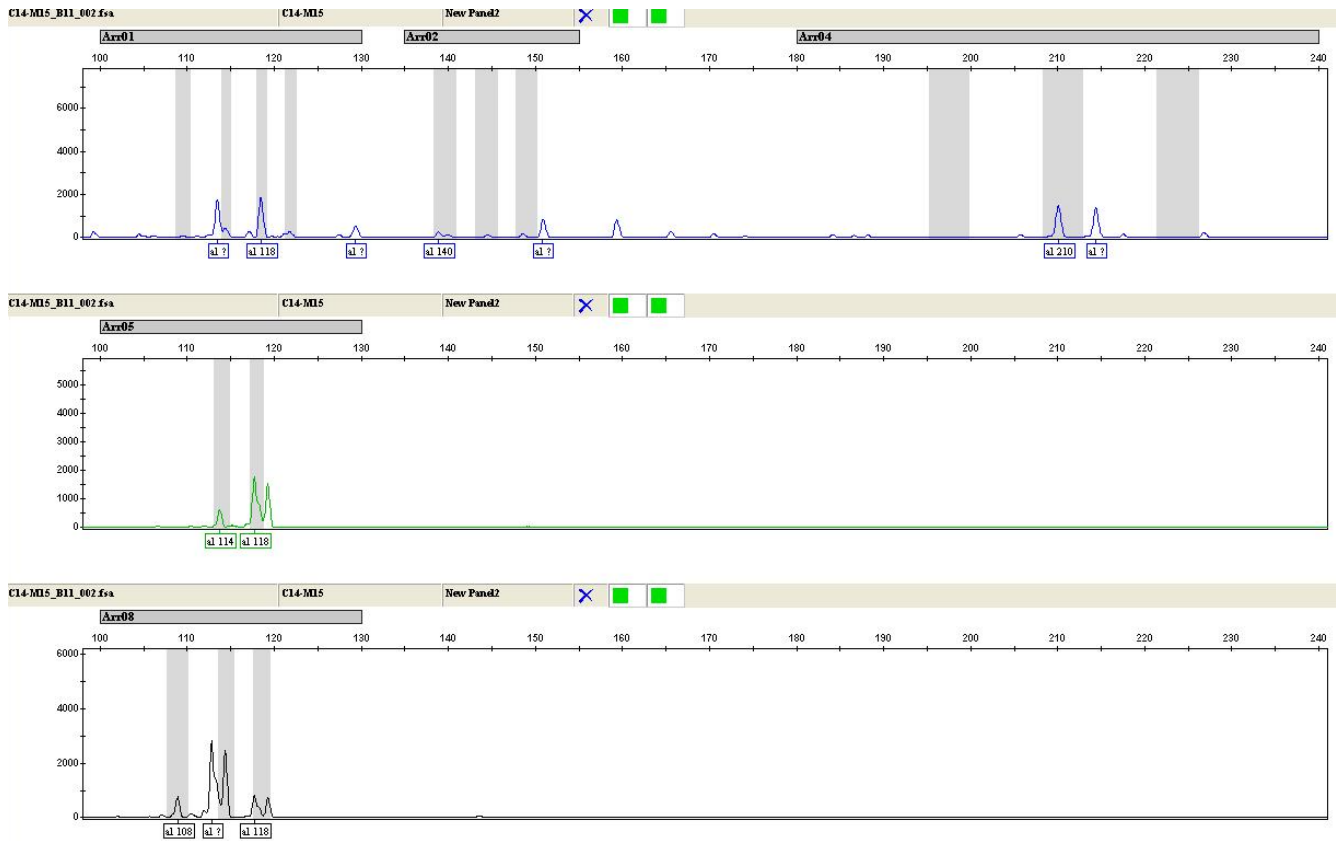


Figure 02. Multiplex PCR Panel electropherogram for *Potamotrygon leopoldi* showing the allele size range obtained using ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and the GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems) software. Colors were assigned to microsatellite primers labeled with 6-FAM (blue), HEX (green), and NED (black) fluorescent dyes.

Table 2 – Panel characteristics of the 10 microsatellites comprising the *P. leopoldi* multiplex panel, with 7 individuals genotyped from the Xingu River in the Amazon basin.

Locus (Contig)	Primer (5'→3')	Repeat Motif	Dye	Proportion in primer	N _A (Size Range)	H _O	H _E	F _{IS}
Pleop01-117959	F: CCCGGGGATGAAGAAAGTATCA	(ATCT) ₁₁	6FAM	1.0	4(110-122)	1.000	0.653	
	R: TCCTTCAACATAACCAACCACTGA			1.0				
Pleop02-36893	F:GAATGGGATGCTGAAATTGCTGA	(ATCT) ₁₂		1.0	7(134-167)	0.714	0.816	
	R:CACTAGACACAGGACTGCGTA			1.0				
Pleop03-66709	F:GTCCTTTGAAGCGGAGTCCTT	(ATAG) ₁₄		0.8	7(197-222)	0.857	0.785	
	R:TGCTATCTGTGATTCCTTTCCTGT			0.8				
	F:ACTGTCATTCATGTGCAAAGCT	(GATA) ₁₀	HEX	1.25		0.571	0.530	

Pleop05-169436	R:GGGACGCTGAAATTGCTGAAT			1.25	4(114-121)			
Pleop08-19319	F:TCAGAGTGAAGCAGGCAGTTT	(GATA) ₁₀	NED	1.0	3(108-118)	0.857	0.642	
	R:CAAATGGGATGCTGAAATTGCTG			1.0				
Average					5.0	0.799	0,685	
CPD								

Discussion

The rapid advancement of next-generation sequencing technologies allows for the swift acquisition of complete genome sequences, providing a valuable tool for the identification of microsatellite markers applicable across various species (JOHRI; DOANE; ALLEN; DINSDALE, 2019).

In this study, we identified a microsatellite panel from the draft genome generated for the *P. leopoldi* species, with the goal of conducting population genetics research and employing this tool for environmental monitoring and *P. leopoldi* conservation. Microsatellite markers with a repetition range of 15 to 20 tend to exhibit high polymorphism, a critical characteristic for population genetics studies. The generated microsatellite panel for *P. leopoldi* primarily comprises tetranucleotide markers and a few trinucleotide markers, chosen for their tendency to produce fewer stutter bands and exhibit fewer multiband patterns. Microsatellite markers are commonly distributed throughout eukaryotic and prokaryotic organism genomes, both within coding and non-coding regions.

In the *P. leopoldi* genome, microsatellite markers are very distributed along the genome. This distribution aligns with existing literature, indicating that microsatellite markers in promoter regions may influence transcriptional activity. This suggests that microsatellite polymorphisms are associated with the number of replication loci. Microsatellites with a higher number of repetitions are more prone to mutation/expansion than those with fewer repetitions, a correlation understood through the slippage mutation model, widely accepted as a mechanism of mutation (KELKAR *et al.*, 2010; SHINDE; LAI; SUN; ARNHEIM, 2003).

Furthermore, the microsatellite class could be a variable to consider. Our results indicate that tetranucleotide microsatellites have the lowest polymorphism rate compared to

dinucleotide microsatellites. Hence, it is essential to factor in the number of repetitions and microsatellite class when selecting markers for scientific studies. The prevalence of tetranucleotide repeats over trinucleotide repeats within introns and intergenic regions is a distinctive feature shared among all vertebrate taxa, distinguishing them from other taxonomic groups that have been examined (TÓTH *et al.*, 2000).

Recent studies on potamotrygonids have intensified to gather more data for understanding the population genetics and biology of *Potamotrygon*. These studies have employed dinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for *Potamotrygon wallacei*, utilizing nine microsatellite markers of di, tri, tetra, and pentanucleotide types (FERREIRA *et al.*, 2023). The species *P. leopoldi* has also utilized dinucleotide and tetranucleotide microsatellites in a multiplex panel with five markers developed by Torres *et al.*, 2022. However, our results indicate that the use of tetranucleotide markers offers a better cost-benefit ratio, as they can be developed at a lower cost while delivering highly reliable results. Nevertheless, it is crucial to emphasize the imperative need for standardizing allelic nomenclature and internal size references to optimize effectiveness and precision.

Forensic characteristics were evaluated for the results obtained, when compared with results in the literature we can verify that they were satisfactory values. The values for CPD in this panel allow for a distinction between individuals, which is similar to other multiplex panels. As an example, we can use several panels developed for Amazonian species used for conservation and support in aquaculture, such as HAMOY e SANTOS (2012), who proposed a panel for *Colossoma macropomum* and FAZZI-GOMES *et al.* (2021), who developed a panel for *Arapaima gigas*. For freshwater stingrays, only microsatellite markers with di-nucleotide microsatellite markers were developed without multiplex panel, which create more cost-benefit when analyze a number of samples. For traceability purposes we need a great power of discrimination and exclusion, and the best cost-benefit, as we can see in the panel developed for *P. leopoldi*.

To validate the findings of this study, the development of a multiplex panel using five tetranucleotide microsatellite markers was necessary to assess the conservation status, traceability, and parental proximity in cultivated and natural populations of *P. leopoldi*. This panel offers advantages over markers described in the literature, owing to the high polymorphism, greater stability, and clearer banding patterns associated with tetranucleotide markers.

It is essential to highlight that for decades, the capture of freshwater stingrays was recurrent and lacked proper regulation, leading to the implementation of norms to govern the capture and prevent population collapse. Nevertheless, illegal capture and exportation persist, especially for endemic species like *P. leopoldi*.

Acknowledgments

We thank the Federal University of Pará, Federal University of Rio Grande do Norte and Rural Federal University of the Amazon for all the support.

REFERENCES

CHARVET-ALMEIDA, P.; GÊNES, M. L. c., 2008, **Neotropical Freshwater Stingrays: diversity and conservation status**.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **molecular Ecology Resources**, 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERREIRA, A. M. V.; VIANA, P. F.; MARAJÓ, L.; FELDBERG, E. Karyotypic variation of two populations of the small freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa & Araújo 2016: A classical and molecular approach. **PLOS ONE**, 18, n. 1, p. e0278828, 2023.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genet Mol Res**, 11, n. 1, p. 141-146, Jan 26 2012.

JOHRI, S.; DOANE, M.; ALLEN, L.; DINSDALE, E. Taking Advantage of the Genomics Revolution for Monitoring and Conservation of Chondrichthyan Populations. **Diversity**, 11, n. 4, 2019.

KELKAR, Y. D.; STRUBCZEWSKI, N.; HILE, S. E.; CHIAROMONTE, F. *et al.* What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. **Genome Biol Evol**, 2, p. 620-635, 2010.

LASSO, C.; ROSA, R.; MORALES-BETANCOURT, M.; GARRONE NETO, D. *et al.* **Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina**. 2016. ISBN impreso: 978-958-8889-98-6; ISBN digital: 978-958-8889-99-3.

LI, D.; WANG, S.; SHEN, Y.; MENG, X. *et al.* A multiplex microsatellite PCR method for evaluating genetic diversity in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquaculture and Fisheries**, 3, n. 6, p. 238-245, 2018/11/01/ 2018.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Mol Biol Evol**, 21, n. 6, p. 991-1007, Jun 2004.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, p. 294-307, 2006.

RAMOS, F. M.; ARAUJO, M. L.; PRANG, G.; FUJIMOTO, R. Y. Ornamental fish of economic and biological importance to the Xingu River. **Braz J Biol**, 75, n. 3 Suppl 1, p. 95-98, Aug 2015.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, 43, n. 1, p. 223-225, Jan 1989.

RISTOW, P. G.; D'AMATO, M. E. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): A streamlined workflow for forensic statistics. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, 6, p. e52-e54, 2017/12/01/ 2017.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Mol Ecol Resour**, 8, n. 1, p. 103-106, Jan 2008.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S. R. N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B. *et al.* Identificação de loci microsatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66, p. 1941-1945, 2014.

TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L. *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Res**, 11, n. 8, p. 1441-1452, Aug 2001.

TORRES, Y.; CHARVET, P.; FARIA, V. V.; DE CASTRO, A. L. F. Evidence of multiple paternity for the endemic Xingu River stingray. **Journal of Fish Biology**, 100, n. 5, p. 1315-1318, 2022.

TORRES, Y.; FARIA, V. V.; CHARVET, P. Current status and future perspectives of Neotropical freshwater stingrays (Potamotrygoninae, Myliobatiformes) genetics. **Environmental Biology of Fishes**, 105, n. 8, p. 1111-1127, 2022.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res**, 40, n. 15, p. e115, Aug 2012.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

6. Discussão Geral

Embora os estudos com elasmobrânquios ainda se encontram em avanço no mundo se faz necessário o esforço e a utilização de novas técnicas como as tecnologias de sequenciamento de nova geração para fomentar mais pesquisas sobre a genética dos mesmos, é de extrema importância entender como as populações desses animais está estruturada geneticamente, fazendo com que haja planos de manejo direcionados e dessa forma organizar a captura de forma sustentável e diminuindo o número de espécies que entram em extinção até mesmo sem ser estudada.

Este trabalho buscou gerar três artigos, presentes nos capítulos I, II e III deste manuscrito. O primeiro capítulo visou demonstrar a utilização da tecnologia de 3ª Geração de sequenciamento de nova geração com a finalidade de realizar a montagem de um draft genômico a partir de dados gerados pela plataforma PacBio. Através deste estudo inicial foi possível realizar a formação de *contigs* e posteriormente *assembly* que nos permitiu conhecer um pouco da estrutura do genoma, apesar de não conseguir fechar ele de forma completa foi possível montar e anotar o primeiro mitogenoma da espécie *P. leopoldi* e caracterizar fazendo inferências sobre a migração de arraias de água salgada para a água doce e foi possível também selecionar alguns marcadores microssatélites para a montagem de um painel multiplex que será de extrema importância para estudos de genética de população, bem como a utilização deste na fiscalização para atestar a origem de animais que são enviados para exportação.

O sequenciamento do genoma da espécie *P. leopodi* utilizando plataforma Sequel I da empresa Pacific Bioscience resultou na aquisição do genoma completo da espécie com a cobertura de 11x a partir de amostras de indivíduos machos e fêmeas, o que nos proporciona um fator de variabilidade dentro da espécie e entre gêneros. Foram executados diversos algoritmos com o intuito de realizar a correção de bases, devido a baixa cobertura adquirida e também resultante de erros esperados pela técnica de sequenciamento escolhida. Mediante as correções de base, verificação de redundâncias, e a testagem de diversos montadores de genoma disponíveis o presente trabalho obteve uma estimativa de 970M de sequencia montada, dados suficientes para realizar as demais etapas do trabalho.

O segundo capítulo deste documento buscou realizar a montagem do genoma mitocondrial da *P. leopoldi* com a finalidade de se fazer o entendimento de como esta espécie

estava posicionada em relação a taxonomia e evidenciar alguns aspectos evolutivos, bem como descrever pela primeira vez o genoma mitocondrial da espécie em estudo.

Com a aquisição de dados públicos provenientes do trabalho de ZHOU *et al.* (2022) e dados sequenciados nesse estudo foi possível realizar a montagem do genoma mitocondrial que contém 17.504 pares de base demonstrando ser o maior mitogenoma dentre os descritos para as espécies da família Potamotrygonidae. A descrição do mitogenoma cria bases de dados para a comparação com demais espécies do gênero *Potamotrygon*. Além disso, foram aplicadas diversas análises com a finalidade de obter comparações em relação ao rearranjo de genes e compreendendo de forma mais clara como a *P. leopoldi* se comporta diante as demais espécies, e com os dados obtidos foi possível observar que a *P. leopoldi* tem seus genes com um padrão extremamente conservado quando comparada com outras espécies da ordem myliobatiformes, que compreende arraiais de modo geral, sejam elas marinhas ou dulcícolas.

A montagem do mitogenoma também proporcionou o posicionamento da espécie *P. leopoldi* em relação a sua taxonomia. A análise filogenética evidencia o comportamento monofilético do clado dos Myliobatiformes onde o gênero Potamotrygonidae tem um grande suporte nodal para diferenciar das demais famílias, sendo as espécies *P. leopoldi*, *P. orbigny* e *P. falkneri* consideradas espécies irmãs. Outra característica da análise que podemos verificar é a proximidade da família Dasyatidae com a Potamotrygonidae, considerando estas famílias irmãs, fato que também foi observado por Nachtigall *et al.*, 2022.

Foi realizada também a análise do mitogenoma que permitiu que fossem feitas inferências a respeito de questões evolutivas, no qual a *P. leopoldi* deriva de ancestrais que antes ocupavam ambientes marinhos ou lacustres e depois de uma série de eventos geológicos passou a se adaptar. Algumas assinaturas no mitogenoma puderam ser evidenciadas como a pressão positiva nos genes *ND1*, *ND4*, *ND5*, *COX I*, e *COX II*. Esses achados em forma de assinaturas na comparação das regiões codificadoras de proteína comparados com outras espécies da ordem myliobatiformes demonstram que houveram modificações na estrutura do genoma mitocondrial no grupo de arraiais de água doce. Muitas dessas alterações se devem especialmente pela mudança de ambiente, é sabido que o ambiente dulcícola possui cerca de 20% a mais de oxigênio do que no ambiente marinho e isso pode ter proporcionado uma maior proporção de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que houvessem danos significativos na estrutura do mitogenoma da *P. leopoldi*.

No terceiro capítulo desta tese, foi sugerido um painel de marcadores microssatélites, estes foram procurados a partir dos *assemblies* criados a partir do sequenciamento realizado na plataforma PacBio, no qual foi gerada um volume de dados de aproximadamente 970M.

Com o sequenciamento do genoma nuclear foi possível realizar a busca de marcadores microssatélites, nestes foram utilizadas várias ferramentas de bioinformática com o intuito de fazer a melhor montagem e posteriormente fazer as buscas dos marcadores. Foram utilizados critérios de escolha dentre elas o número de repetições dos *motifs* de repetição de 4 nucleotídeos (tetranucleotídeos) e repetido no mínimo 10 vezes e no máximo 20 vezes. Estes marcadores buscados no genoma da espécie *P. leopoldi* compôs o painel multiplex desenvolvido.

O painel multiplex foi desenhado para a espécie *P. leopoldi* possuem várias finalidades e aplicações, dentre elas é de extrema importância a identificação de parentais para que seja possível realizar atividades como a rastreabilidade dos animais que serão utilizados nas atividades comerciais, especialmente exportação, além de criar uma ferramenta que pode ser utilizada posteriormente para fins de conservação, melhoramento genético e entre outras. Inicialmente o painel era dotado de 10 marcadores microssatélites, visando aumentar o seu poder de discriminação dentro do painel, porém, com as diversas tentativas de padronização foi verificado que 4 desses marcadores apresentavam anelamento em regiões diversas do genoma da *P. leopoldi*, com isso foram retirados do painel para evitar erros de leitura e a tomada de decisões equivocadas.

O trabalho conseguiu realizar a busca de marcadores aproximadamente 38.000 marcadores microssatélites, sendo divididos em classes di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, os quais foram filtrados e selecionados com o intuito de reunir estes em uma reação única de PCR, dando maior celeridade na busca de resultados e também otimizando o uso dos recursos laboratoriais da melhor forma possível, evitando o desperdício desnecessário de material e com alto poder de discriminação. Na contagem dos marcadores encontrados foi evidenciada o grande número de repetições do tipo tetranucleotídeos, que de acordo com a literatura em vertebrados é comum que haja uma alta prevalência de marcadores tetranucleotídeos em vertebrados (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000).

O grupo de 5 loci demonstrou ser eficaz na avaliação da diversidade genética da população sob investigação, fornecendo dados que permitem a identificação de relações de parentesco em testes de atribuição populacional, no entanto, deve ser realizados mais testes

moleculares para a validação do painel multiplex, com provável necessidade de aumento no número de marcadores para a obtenção de uma estatística mais robusta, aumentando o poder de determinação e de exclusão para ser utilizada como ferramenta forense. Portanto, esse sistema multiplex pode ser uma ferramenta valiosa e poderosa para estudos em biologia forense, conservação e genética populacional, tanto em pequena como em larga escala. Além disso, ele pode ser aplicado com sucesso no manejo de populações naturais da espécie *P. leopoldi*, auxiliando no controle dos estoques populacionais da espécie, além de ser uma ferramenta que possibilita o controle e rastreabilidade de animais proveniente de aquicultura.

REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genet Res Int**, 2014, p. 691759, 2014.

ALHAKAMI, H.; MIREBRAHIM, H.; LONARDI, S. A comparative evaluation of genome assembly reconciliation tools. **Genome Biology**, 18, n. 1, p. 93, 2017/05/18 2017.

AMADO, M. V.; HRBEK, T.; GRAVENA, W.; FANTIN, C. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish *Symphysodon discus* and cross-species amplification in other Heroini cichlid species. **Molecular Ecology Resources**, 8, n. 6, p. 1451-1453, 2008.

ARIAS, C. F.; DIKOW, R. B.; MCMILLAN, W. O.; DE LEÓN, L. F. De Novo Genome Assembly of the Electric Fish *Brachyhyopomus occidentalis* (Hypopomidae, Gymnotiformes). **Genome Biology and Evolution**, 13, n. 10, 2021.

BEHEREGARAY, L. B.; MÖLLER, L. M.; SCHWARTZ, T. S.; CHAO, N. L. *et al.* Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. **Molecular Ecology Notes**, 4, n. 3, p. 330-332, 2004.

BHUMMAKASIKARA, T.; KONGRIT, C.; SIRIPUNKAW, C.; CHANSUE, N. *et al.* Development of microsatellite DNA primers for the giant freshwater stingray, *Himantura chaophraya* (Batoidea: Dasyatidae) in Thailand, and cross-species amplification in other stingrays. **Conservation Genetics Resources**, 5, n. 2, p. 453-455, 2013/06/01 2013.

BIGELOW, H. B.; SCHROEDER, W. C. Fishes of the Western North Atlantic. Sawfishes, guitarfishes, skats and rays; chimaeroids. **Memoir Sears Foudation for Marine Research**, p. 1-588, 1953.

BISWAS, J.; MAURYE, P. Aquaculture Biotechnology: Prospects and challenges. *In*, 2017.

BOISVERT, S.; RAYMOND, F.; GODZARIDIS, É.; LAVIOLETTE, F. *et al.* Ray Meta: scalable de novo metagenome assembly and profiling. **Genome Biology**, 13, n. 12, p. R122, 2012/12/22 2012.

BRADNAM, K. R.; FASS, J. N.; ALEXANDROV, A.; BARANAY, P. *et al.* Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. **Gigascience**, 2, n. 1, p. 10, Jul 22 2013.

BROCK, G. J.; ANDERSON, N. H.; MONCKTON, D. G. Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. **Hum Mol Genet**, 8, n. 6, p. 1061-1067, Jun 1999.

BROOKS, D.; MAYES, M.; THORSON, T., 1981, **Systematic Review of Cestodes Infecting Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) Including Four New Species from Venezuela.**

BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of Fish Biology**, 72, n. 2, p. 355-374, 2008.

BUTLER, J.; MACCALLUM, I.; KLEBER, M.; SHLYAKHTER, I. A. *et al.* ALLPATHS: de novo assembly of whole-genome shotgun microreads. **Genome Res**, 18, n. 5, p. 810-820, May 2008.

CAMARGO, M.; GIARRIZZO, T.; ISAAC, V. REVIEW OF THE GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF FISH FAUNA OF THE XINGU RIVER BASIN, BRAZIL. **Ecotropicos**, 10, p. 123-147, 2004.

CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., *et al.* (Ed.). **Check List of The Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 22-28.

CARVALHO, M. R. d.; 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). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 51, p. 101-138, 2011.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D. N.; DAVISON, L. J. *et al.* Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 3, p. 1041-1046, Feb 4 1997.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 126, n. 4, p. 455-476, Aug 2000.

CHARVET, P.; SANTANA, F. M.; DE LIMA, K. L.; LESSA, R. Age and growth of the endemic Xingu River stingray *Potamotrygon leopoldi* validated using fluorescent dyes. **J Fish Biol**, 92, n. 6, p. 1985-1999, Jun 2018.

CHARVET-ALMEIDA, P.; DE ARAÚJO, M. L. G.; DE ALMEIDA, M. P. Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, 35, p. 165-171, 2005.

CHARVET-ALMEIDA, P.; GÊNES, M. L. c., 2008, **Neotropical Freshwater Stingrays: diversity and conservation status.**

CHARVET-ALMEIDA, P.; SILVA, P. C.; ROSA, R. S.; BARTHEM, R., 2005, Santos - SP. **Observações preliminares sobre a alimentação de *Potamotrygon leopoldi* (Potamotrygonidae) no médio rio Xingu - Pará.**

CHEN, Z.; ERICKSON, D. L.; MENG, J. Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing. **BMC Genomics**, 21, n. 1, p. 631, 2020/09/14 2020.

CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; DRIESEL, A. J. *et al.* Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Res**, 14, n. 6, p. 1147-1159, Jun 2004.

CHIN, A.; MOURIER, J.; RUMMER, J. L. Blacktip reef sharks (*Carcharhinus melanopterus*) show high capacity for wound healing and recovery following injury. **Conserv Physiol**, 3, n. 1, p. cov062, 2015.

CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, 255, n. 1, p. 1-29, 2006/05/31/ 2006.

CITES. CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA, APENDIX II. UNEP. Geneva 2023.

COMEXSTAT. Exportação e Importação Geral do Brasil. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, C. E. e. S. 2023.

CRUZ, V. P.; VERA, M.; MENDONÇA, F. F.; PARDO, B. G. *et al.* First identification of interspecies hybridization in the freshwater stingrays *Potamotrygon motoro* and *P. falkneri* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). **Conservation Genetics**, 16, n. 1, p. 241-245, 2015/02/01 2015.

DA SILVA, A. R. B. **Isolamento de marcadores microssatélites para o estudo de populações insulares e continentais de *Rhinela marina* (ANURA, BUFONIDAE) na Amazônia.** . 2014. 117 f. - Instituto de Estudos Costeiros Universidade Federal do Pará., Bragança - PA.

DE 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 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxa**, 2776, n. 1, 2011.

DENTON, J. F.; LUGO-MARTINEZ, J.; TUCKER, A. E.; SCHRIDER, D. R. *et al.* Extensive Error in the Number of Genes Inferred from Draft Genome Assemblies. **PLOS Computational Biology**, 10, n. 12, p. e1003998, 2014.

DOMINGUES, R. R.; HILSDORF, A. W. S.; GADIG, O. B. F. The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. **Conservation Genetics**, 19, n. 3, p. 501-525, 2017.

DOMINGUEZ DEL ANGEL, V.; HJERDE, E.; STERCK, L.; CAPELLA-GUTIERREZ, S. *et al.* Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. **F1000Res**, 7, 2018.

DUDGEON, C. L.; BLOWER, D. C.; BRODERICK, D.; GILES, J. L. *et al.* A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. **J Fish Biol**, 80, n. 5, p. 1789-1843, Apr 2012.

FAZZI-GOMES, P.; AGUIAR, J.; CABRAL, G. F.; MARQUES, D. *et al.* Genomic approach for conservation and the sustainable management of endangered species of the Amazon. **PLOS ONE**, 16, n. 2, p. e0240002, 2021.

FAZZI-GOMES, P.; GUERREIRO, S.; PALHETA, G. D. A.; MELO, N. *et al.* High genetic diversity and connectivity in *Colossoma macropomum* in the Amazon basin revealed by microsatellite markers. **Genet Mol Biol**, 40, n. 1, p. 142-146, Jan-Mar 2017.

FAZZI-GOMES, P. F.; GUERREIRO, S. L. M.; PALHETA, G. D.; MELO, N. F. *et al.* High genetic diversity and connectivity in *Colossoma macropomum* in the Amazon basin revealed by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, p. 0, Feb 06 2017.

FERRARIS, C. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. **Copeia**, 2000, p. 314-315, 01/01 2000.

FRANKHAM, R. Conservation biology: ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. **Heredity (Edinb)**, 95, n. 3, p. 183, Sep 2005a.

FRANKHAM, R. Stress and adaptation in conservation genetics. **J Evol Biol**, 18, n. 4, p. 750-755, Jul 2005b.

FREDERICO, R. G.; FARIAS, I. P.; ARAÚJO, M. L. G. d.; CHARVET-ALMEIDA, P. *et al.* Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, 10, p. 71-80, 2012.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES.** 2020. Disponível em: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

FURLAN, E.; STOKLOSA, J.; GRIFFITHS, J.; GUST, N. *et al.* Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. **Ecol Evol**, 2, n. 4, p. 844-857, Apr 2012.

GARMAN, S. On the pelvis end external sexual organs of selachiens, with especial reference to the new genera *Potamotrygon* and *Disceu*. **Proceeding of the Boston Society of Natural History**, 19, p. 197-215, 1877.

GONÇALVES, B. P.; WASKO, A. P. Genética da conservação aplicada ao tráfico ilegal de aves. **Saúde, Ética & Justiça**, 18, n. spe, 2013.

GOODWIN, S.; GURTOWSKI, J.; ETHE-SAYERS, S.; DESHPANDE, P. *et al.* Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. **Genome Res**, 25, n. 11, p. 1750-1756, Nov 2015.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, 17, n. 6, p. 333-351, 2016/06/01 2016.

HAMOY, I.; ARARIPE, J.; GUERREIRO, S.; SANTOS, S. Genética Molecular Aplicada à Conservação de Peixes Amazônicos. *In*: LOBÃO DE SOUZA, R. A. (Ed.). **Ecosistemas Aquáticos: Tópicos especiais**. Belém: EdUFRA, 2018. p. 275-293.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genet Mol Res**, 11, n. 1, p. 141-146, Jan 26 2012.

HARA, Y.; YAMAGUCHI, K.; ONIMARU, K.; KADOTA, M. *et al.* Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. **Nature Ecology & Evolution**, 2, n. 11, p. 1761-1771, 2018/11/01 2018.

HAYES, B.; SONESSON, A. K.; GJERDE, B. Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. **Aquaculture**, 250, n. 1, p. 70-81, 2005/11/14/ 2005.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. 2017. 978-3-319-55836-3
978-3-319-55838-7.

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. EMBRAPA. Corumbá 2006.

HOLMAN, L. E.; GARCIA DE LA SERRANA, D.; ONOUFRIOU, A.; HILLESTAD, B. *et al.* A workflow used to design low density SNP panels for parentage assignment and traceability in aquaculture species and its validation in Atlantic salmon. **Aquaculture**, 476, p. 59-64, 2017.

HUANG, Q. Y.; XU, F. H.; SHEN, H.; DENG, H. Y. *et al.* Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. **Am J Hum Genet**, 70, n. 3, p. 625-634, Mar 2002.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**, 9, n. 9, p. 868-877, Sep 1999.

hydrochemistry and geology in the brazilian amazon region **Amazoniana**, 1, n. 3, p. 267-277, 1968.

ICMbio. Planos de Ação Nacional: Plano de Ação Nacional para Conservação do Xingu. . 2019.

ITIS. **Integrated Taxonomic Information System (ITIS)**. Disponível em: www.itis.gov. Acesso em: 05/05/2021.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1**. 2023. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>.

JOHRI, S.; DOANE, M.; ALLEN, L.; DINSDALE, E. Taking Advantage of the Genomics Revolution for Monitoring and Conservation of Chondrichthyan Populations. **Diversity**, 11, n. 4, 2019.

JORGENSEN, S. J.; MICHELI, F.; WHITE, T. D.; VAN HOUTAN, K. S. *et al.* Emergent research and priorities for shark and ray conservation. **Endangered Species Research**, 47, p. 171-203, 2022.

JUNG, H.; VENTURA, T.; CHUNG, J. S.; KIM, W.-J. *et al.* Twelve quick steps for genome assembly and annotation in the classroom. **PLOS Computational Biology**, 16, n. 11, p. e1008325, 2020.

KCHOUK, M.; GIBRAT, J.-F.; ELLOUMI, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. **Biology and Medicine**, 09, 01/01 2017.

KELKAR, Y. D.; STRUBCZEWSKI, N.; HILE, S. E.; CHIAROMONTE, F. *et al.* What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. **Genome Biol Evol**, 2, p. 620-635, 2010.

KOREN, S.; SCHATZ, M. C.; WALENZ, B. P.; MARTIN, J. *et al.* Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads. **Nat Biotechnol**, 30, n. 7, p. 693-700, Jul 1 2012.

KOREN, S.; WALENZ, B. P.; BERLIN, K.; MILLER, J. R. *et al.* Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. **Genome Res**, 27, n. 5, p. 722-736, May 2017.

LAI, Y.; SUN, F. The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. **Molecular Biology and Evolution**, 20, n. 12, p. 2123-2131, 2003.

LARRAÍN, M. A.; DÍAZ, N. F.; LAMAS, C.; URIBE, C. *et al.* Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. **Food Research International**, 62, p. 104-110, 2014/08/01/ 2014.

LASSO, C.; ROSA, R.; MORALES, M.; GARRONE NETO, D. *et al.* **Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina.** 2016. ISBN impreso: 978-958-8889-98-6; ISBN digital: 978-958-8889-99-3.

LI, R.; FAN, W.; TIAN, G.; ZHU, H. *et al.* The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. **Nature**, 463, n. 7279, p. 311-317, 2010/01/01 2010.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Mol Biol Evol**, 21, n. 6, p. 991-1007, Jun 2004.

LIU, H.; PENG, D.; YANG, H.-J.; MU, Y. *et al.* Exploring the evolution of sustainable fisheries development: Focusing on ecological, environmental and management issues. **Ecological Informatics**, 75, p. 102004, 2023/07/01/ 2023.

- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, 238, p. 1-37, 2004.
- LOBODA, T.; DA SILVA, J. P.; FONTENELLE, J. P.; ROSA, R. *et al.* Familia Potamotrygonidae - Potamotrygon leopoldi. *In*, 2013. p. 193-194.
- LUCIFORA, L. O.; BALBONI, L.; SCARABOTTI, P. A.; ALONSO, F. A. *et al.* Decline or stability of obligate freshwater elasmobranchs following high fishing pressure. **Biological Conservation**, 210, p. 293-298, 2017.
- LUO, R.; LIU, B.; XIE, Y.; LI, Z. *et al.* SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. **Gigascience**, 1, n. 1, p. 18, Dec 27 2012.
- MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. Chapter 1 - Phylogeny and classification of Neotropical fish. *In*: BALDISSEROTTO, B.;URBINATI, E. C., *et al.* (Ed.). **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**: Academic Press, 2020. p. 1-19.
- MAQSOOD, H. M.; AHMAD, S. M. Advances in Molecular Markers and their Applications in Aquaculture and Fisheries . **Genetics of Aquatic Organisms**, 1, n. 1, p. 27-41, 2017.
- MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, 24, n. 3, p. 133-141, Mar 2008.
- MARRA, N. J.; STANHOPE, M. J.; JUE, N. K.; WANG, M. *et al.* White shark genome reveals ancient elasmobranch adaptations associated with wound healing and the maintenance of genome stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 116, n. 10, p. 4446-4455, 2019.
- MCCOMBIE, W. R.; MCPHERSON, J. D.; MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Technologies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 9, n. 11, Nov 1 2019.
- METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Res**, 10, n. 1, p. 72-80, Jan 2000.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, 11, n. 1, p. 31-46, 2010/01/01 2010.
- MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, 95, n. 6, p. 315-327, Jun 2010.
- MILLER, K. A.; NELSON, N. J.; SMITH, H. G.; MOORE, J. A. How do reproductive skew and founder group size affect genetic diversity in reintroduced populations? **Mol Ecol**, 18, n. 18, p. 3792-3802, Sep 2009.
- NACHTIGALL, P. G.; LOBODA, T. S.; PINHAL, D. Signatures of positive selection in the mitochondrial genome of neotropical freshwater stingrays provide clues about the transition

from saltwater to freshwater environment. **Molecular Genetics and Genomics**, 298, n. 1, p. 229-241, 2023/01/01 2023.

NAVARRO, A.; BADILLA, R.; ZAMORANO, M. J.; PASAMONTES, V. *et al.* Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. **Aquaculture**, 285, n. 1, p. 30-37, 2008/12/07/ 2008.

NETO, J. D. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de elasmobrânquios sobre-explotados ou ameaçados de sobre-exploração no Brasil. IBAMA. Brasília: IBAMA: 154 p. p. 2011.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, p. 294-307, 2006.

ORY, D.; CUENOT, Y.; VIGOUROUX, R.; COVAIN, R. *et al.* Complete mitochondrial genome of the river stingray *Potamotrygon orbignyi* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Mitochondrial DNA B Resour**, 4, n. 2, p. 3153-3154, Sep 20 2019.

PAXIUBA, W.; INOMATA, S.; MARISA; FERNANDES, M. COMÉRCIO DE RAIAS DE ÁGUA DOCE NA REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL ORNAMENTAL FISH TRADE OF THE FRESHWATER STINGRAYS IN THE MIDDLE NEGRO RIVER, AMAZON STATE, BRAZIL. 2010.

PAYSEUR, B. A.; NACHMAN, M. W. Microsatellite variation and recombination rate in the human genome. **Genetics**, 156, n. 3, p. 1285-1298, Nov 2000.

PEREIRA, C. M. B.; DE MATOS GUERREIRO, S. L.; DA SILVA, D. T.; DE AZEVEDO, R. K. *et al.* Morphology and molecular phylogeny of *Hoferellus jutubensis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) found parasitising *Ageneiosus inermis* (Siluriformes: Auchenipteridae), in the Brazilian Amazon region. **Parasitology International**, 86, p. 102445, 2022/02/01/ 2022.

PHILLIPPY, A. M. New advances in sequence assembly. **Genome Res**, 27, n. 5, p. xi-xiii, May 2017.

QUEIROZ, A. L. L. **Aplicações da genética na conservação e combate ao tráfico de animais silvestres**. 2021. 181 f. - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte.

RADWAN, J.; BIEDRZYCKA, A.; BABIK, W. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? **Biol Conserv**, 143, n. 3, p. 537-544, Mar 2010.

RANDI, E.; DAVOLI, F.; PIERPAOLI, M.; PERTOLDI, C. *et al.* Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. **Animal Conservation**, 6, n. 2, p. 93-100, 2003.

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. **Conservation Biology**, 17, n. 1, p. 230-237, 2003.

REGITANO, L.; VENERONI, G. Marcadores Moleculares e suas Aplicações no Melhoramento Animal. **Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos**, 2009.

REIF, W. E. Wound healing in Sharks. **Zoomorphologie**, 90, n. 2, p. 101-111, 1978/06/01 1978.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RHOADS, A.; AU, K. F. PacBio Sequencing and Its Applications. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, 13, n. 5, p. 278-289, Oct 2015.

RIBEIRO, A. M. **Fauna Brasileira, Peixes**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, 1923.

ROBLEDO, D.; PALAIOKOSTAS, C.; BARGELLONI, L.; MARTINEZ, P. *et al.* Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. **Rev Aquac**, 10, n. 3, p. 670-682, Aug 2018.

RODRIGUES JÚNIOR, C. E.; DANIEL, S. N.; MARTINS, D. G.; HASHIMOTO, D. T. *et al.* Use of genetic markers to identify the illegal trade of billfish in the second largest fishing warehouse of Latin America. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, 30, n. 6, p. 1251-1254, 2020.

ROLLI, J.; GIRARDET, S.; MONACHON, C.; RICHARD, C. Microsatellite Analysis of Perch (*Perca fluviatilis*) and its Genetic Authentication of Geographical Localization. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, 68, n. 10, p. 726-731, // 2014.

ROSA, R. S.; CASTELLO, H. P.; THORSON, T. B. *Plesiotrygon iwamae*, a New Genus and Species of Neotropical Freshwater Stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Copeia**, 1987, n. 2, p. 447-458, 1987.

SANTOS, G. M.; JEGU, M.; MERONA, B. Catálogo de Peixes comerciais do baixo rio Tocantins; Projeto Tucuruí. MANAUS, E. Manaus: CNPq/INPA: 83 p. 1984.

SCHATZ, M. C.; DELCHER, A. L.; SALZBERG, S. L. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. **Genome Res**, 20, n. 9, p. 1165-1173, Sep 2010.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, 109, n. 6, p. 365-371, Sep 2000.

SHARIAT, B.; MOVAHEDI, N. S.; CHITSAZ, H.; BOUCHER, C. HyDA-Vista: towards optimal guided selection of k-mer size for sequence assembly. **BMC Genomics**, 15 Suppl 10, n. Suppl 10, p. S9, 2014.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research**, 31, n. 3, p. 974-980, 2003.

SIMPSON, J. T.; WONG, K.; JACKMAN, S. D.; SCHEIN, J. E. *et al.* ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. **Genome Res**, 19, n. 6, p. 1117-1123, Jun 2009.

SONG, H. M.; MU, X. D.; WEI, M. X.; WANG, X. J. *et al.* Complete mitochondrial genome of the ocellate river stingray (*Potamotrygon motoro*). **Mitochondrial DNA**, 26, n. 6, p. 857-858, 2015.

STEVENS, J. D.; BONFIL, R.; DULVY, N. K.; WALKER, P. A. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. **ICES Journal of Marine Science**, 57, n. 3, p. 476-494, 2000.

SWINGLAND, I. Conservation and Evolution, by O. H. Frankel and M. E. Soulé. Cambridge University Press, 1981. Hardback £25. Paperback £7.95. **Oryx**, 16, n. 4, p. 358-358, 1982.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S. R. N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B. *et al.* Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66, p. 1941-1945, 2014.

THORSON, T. B.; COWAN, C. M.; WATSON, D. E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. **Science**, 158, p. 375-377, 1967.

THORSON, T. B.; LACY, E. J. Age, Growth Rate and Longevity of *Carcharhinus leucas* Estimated from Tagging and Vertebral Rings. **Copeia**, 1982, n. 1, p. 110-116, 1982.

THORSON, T. B.; WATSON, D. E. Reassignment of the African freshwater stingrays, *Potamotrygon garouaensis*, to the genus *Dasyatis*, on physiologic grounds. **Copeia**, 4, p. 701-712, 1975.

TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; ARAÚJO, M. L. G. d.; ALMEIDA, M. P. d. *et al.* A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (*Potamotrygonidae*, *Myliobatiformes*). **Genetics and Molecular Biology**, 31, p. 324-336, 2008.

TORRES, Y.; CHARVET, P.; FARIA, V. V.; DE CASTRO, A. L. F. Evidence of multiple paternity for the endemic Xingu River stingray. **Journal of Fish Biology**, 100, n. 5, p. 1315-1318, 2022.

TORRES, Y.; FARIA, V. V.; CHARVET, P. Current status and future perspectives of Neotropical freshwater stingrays (*Potamotrygoninae*, *Myliobatiformes*) genetics. **Environmental Biology of Fishes**, 105, n. 8, p. 1111-1127, 2022.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, 10, n. 7, p. 967-981, July 1, 2000 2000.

VARI, R.; MALABARBA, L. Neotropical Ichthyology: An Overview. *In*, 1998. p. 1-12.

VENKATESH, B.; LEE, A. P.; RAVI, V.; MAURYA, A. K. *et al.* Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. **Nature**, 505, n. 7482, p. 174-179, 2014/01/01 2014.

WATTANADILOKCHATKUN, P.; PANTHUM, T.; JAISAMUT, K.; AHMAD, S. F. *et al.* Characterization of Microsatellite Distribution in Siamese Fighting Fish Genome to Promote Conservation and Genetic Diversity. **Fishes**, 7, n. 5, p. 251, 2022.

WOOD, C. M.; MATSUO, A. Y.; GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W. *et al.* Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. **J Exp Biol**, 205, n. Pt 19, p. 3039-3054, Oct 2002.

ZARDOYA, R. Recent advances in understanding mitochondrial genome diversity. **F1000Res**, 9, 2020.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome research**, 18, n. 5, p. 821-829, 2008.

ZHOU, J.; LIU, A.; HE, F.; ZHANG, Y. *et al.* Draft Genome of White-blotched River Stingray Provides Novel Clues for Niche Adaptation and Skeleton Formation. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Dec 2 2022.

ZHU, Y.; QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. **J Mol Evol**, 50, n. 4, p. 324-338, Apr 2000.



Communication

The Complete Mitogenome of Amazonian *Hyphessobrycon heterorhabdus* (Characiformes: Characidae) as a Valuable Resource for Phylogenetic Analyses of Characidae

Luciano Fogaça de Assis Montag ^{1,†}, Ricardo Koroiva ^{1,2,*}, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ³, Leandro Magalhães ³, Giovanna C. Cavalcante ³, Caio S. Silva ³, Sávio Guerreiro ³, Daniel H. F. Gomes ⁴, Jorge E. S. de Souza ⁴, Sandro J. de Souza ⁴, Lidia Brasil Seabra ¹, Maria Dayanne Lima de Lucena ¹, Erival Gonçalves Prata ¹, Izabella Cristina da Silva Penha ¹, Thaisa Sala Michelan ¹, Raphael Ligeiro ¹ and Leandro Juen ¹

¹ Laboratório de Ecologia e Conservação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66075110, Brazil; lfamontag@gmail.com (L.F.d.A.M.)

² Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58397-000, Brazil

³ Laboratório de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém 66075110, Brazil;

⁴ Bioinformatics Multidisciplinary Environment (BioME), Instituto Metrópole Digital, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 59078900, Brazil

* Correspondence: ricardo.koroiva@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Montag, L.F.d.A.; Koroiva, R.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Magalhães, L.; Cavalcante, G.C.; Silva, C.S.; Guerreiro, S.; Gomes, D.H.F.; Souza, J.E.S.d.; Souza, S.J.d.; et al. The Complete Mitogenome of Amazonian *Hyphessobrycon heterorhabdus* (Characiformes: Characidae) as a Valuable Resource for Phylogenetic Analyses of Characidae. *Fishes* **2023**, *8*, 233. <https://doi.org/10.3390/fishes8050233>

Academic Editors: Manuel Alejandro Merlo Torres and Silvia Portela-Bens

Received: 3 April 2023

Revised: 25 April 2023

Accepted: 26 April 2023

Published: 28 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Hyphessobrycon heterorhabdus* (Ulrey, 1894), popularly known as ‘Flag Tetra’ in English speaking countries, belongs to the genus *Hyphessobrycon* of the family Characidae, and is widely present in the eastern Amazon basin. Here, using Illumina sequencing, we report the complete mitogenome sequence of *H. heterorhabdus*. Overall, the mitogenome has 17,021 bp, containing 13 protein-coding, 22 tRNA, and 2 rRNA genes. Non-ambiguous nucleotide compositions of the *H. heterorhabdus* mitogenome are A: 29.2%, T: 29.4%, G: 15.6%, and C: 25.8%. As recently indicated, the phylogenetic analyses did not support four separate genera (*Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia*, and *Psalidodon*) of Characidae. Understanding the *H. heterorhabdus* mitogenome is important for taxonomic purposes as well as for the molecular characterization of environmental pollutants. Thus, the mitogenome described here will be a valuable resource for studies on environmental changes, evolutionary genetics, species delimitation, and phylogenetic analyses in Characidae.

Keywords: mitochondrial genome; fish DNA; mitochondrial DNA; heteroplasmy; Characidae; phylogeny; Amazon

Key Contribution: In this study, the whole mitogenome sequence of *H. heterorhabdus* was completed. In addition, the phylogenetic relationship within the family Characidae was investigated.

1. Introduction

Hyphessobrycon heterorhabdus (Ulrey, 1894), commonly known as ‘Flag Tetra’ in English-speaking countries, is considered one of the most common fishes in the highland streams of the eastern Amazon (e.g., Ref. [1]) and occurs in Brazil in the coastal drainages from Pará to the Curuá-Una River basin and the lower Tapajós River [2]. It is a nektonic species with body morphology adapted for foraging in the water column and at the surface [3,4], an omnivore with a tendency to eat insects [5], and a popular freshwater ornamental fish [6].

Communication

The First Mitochondrial Genome of an Odonata Endemic to South America, *Chalcopteryx rutilans* (Rambur, 1842) (Odonata: Polythoridae), and Its Implications for the Phylogeny of the Zygoptera

Leandro Juen ^{1,†}, Ricardo Koroiva ^{1,*,†}, Fernando Geraldo de Carvalho ¹, Cristian Camilo Mendoza-Penagos ¹, Joás da Silva Brito ¹, Lenize Batista Calvão ¹, Victor Rennan Santos Ferreira ¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ², Caio S. Silva ², Sávio Guerreiro ², Giovanna C. Cavalcante ², Leandro Magalhães ², Jorge E. S. de Souza ³, Daniel H. F. Gomes ³, Luciano Fogaça de Assis Montag ¹, Thaisa S. Michelin ¹ and Raphael Ligeiro ¹

¹ Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém 66075-110, PA, Brazil; leandrojuen@gmail.com (L.J.)

² Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém 66075-110, PA, Brazil

³ Bioinformatics Multidisciplinary Environment (BioME), Instituto Metrópole Digital, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal 59078-900, RN, Brazil

* Correspondence: ricardo.koroiva@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Juen, L.; Koroiva, R.; Geraldo de Carvalho, F.; Mendoza-Penagos, C.C.; Brito, J.d.S.; Calvão, L.B.; Ferreira, V.R.S.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Silva, C.S.; Guerreiro, S.; et al. The First Mitochondrial Genome of an Odonata Endemic to South America, *Chalcopteryx rutilans* (Rambur, 1842) (Odonata: Polythoridae), and Its Implications for the Phylogeny of the Zygoptera. *Diversity* **2023**, *15*, 908. <https://doi.org/10.3390/d15080908>

Academic Editors: Hyun Park and Chang-Bae Kim

Received: 6 July 2023

Revised: 28 July 2023

Accepted: 29 July 2023

Published: 1 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Chalcopteryx rutilans* Rambur, 1842 (Polythoridae, Odonata) is a species widely distributed in central Amazonia. Due to its sensitivity to environmental changes, it is a bioindicator species used to evaluate the environmental conditions of streams in federally protected areas. By sequencing *C. rutilans* mitogenome, we report the first whole mitogenome from the Polythoridae family and the first from an Odonata species endemic to South America. The entire mitogenome has 15,653 bp and contains 13 protein-coding, 22 tRNA, and two rRNA genes. The nucleotide composition of the mitogenome is 42.7%, T: 25.5%, C: 19.4%, and G: 12.4%. The AT and GC skews of the mitogenome sequence were 0.249 and -0.220 , respectively. *C. rutilans* was recovered as a sister to *Pseudolestes mirabilis* Kirby, 1900 (Pseudolestidae), demonstrating the absence of mitogenomes of species from multiple families in the current literature. Mitogenome data from this study will provide useful information for further studies on the phylogeny and conservation of Polythoridae.

Keywords: mitogenome; phylogenetic analysis; damselfly; biodiversity; Amazon

1. Introduction

Odonata (Hexapoda: Insecta) is an order of insects known as dragonflies and damselflies. It is divided into three suborders: Zygoptera (about 3000 species), Anisoptera (about 3000 species), and Anisozygoptera (only three species) [1]. Despite their attractive coloration and their importance in the food web and biomonitoring of aquatic environments, genomic knowledge of Odonata is still far behind that of the other insect orders [2]). The few whole genomes and mitogenomes available are concentrated in research groups and species found in countries with large economies, such as England, the USA, and China [3–5]. At the same time, they are rare or absent in poor or developing countries, such as those in South America.

The genus *Chalcopteryx* Selys, 1853 (Insecta: Odonata) is an endemic South-American damselfly of the family Polythoridae (61 species, [1]) that inhabits streams and rivers where it flies above the water or perches on aquatic macrophytes and on branches of marginal vegetation and is distinguished by the unique coloration of its hind wings [6]. Their species lays its eggs on plant debris in the streambed and is characterized by great environmental



Growth, survival, and myogenic gene expression in the post-larvae of *Colossoma macropomum* provisioned with *Artemia* nauplii

Debora Sayumi Doami Melo · André Luiz Alves de Sá · Sávio Lucas de Matos Guerreiro · Joane Natividade · Paola Fabiana Fazzi Gomes · Rodrigo Takata · Ednaldo da Silva Filho · Glauber David Almeida Palheta · Nuno Filipe Alves Correia de Melo · Fabio Carneiro Sterzelecki · Igor Hamoy

Received: 18 November 2022 / Accepted: 12 March 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

Abstract *Artemia* nauplii are widely used as fish larvae feed due to its beneficial nutritional characteristics for larval development; however, efficient feeding strategies are needed to balance its high costs. Therefore, we evaluated the effects of different densities of *Artemia* nauplii (100, 250, 500, 750, and 1000 nauplii/post-larvae) on the growth, survival, water quality, and myogenic gene expression of tambaqui (*Colossoma macropomum*) post-larvae cultivated in a recirculating aquaculture system. After 2 weeks of trial, there was a significant decrease in dissolved oxygen concentration with the increase in nauplii density, but it did not interfere with larval performance and survival. In the first week, larvae fed with fewer than 500 nauplii/post-larvae presented slower growth, while in the second week, larvae fed with 1000 nauplii/post-larvae had the highest final

weight and length. Regression analysis suggests that the optimum feeding density of *Artemia* nauplii during the first week is 411 nauplii/post-larvae, while for the second week, the growth increased proportionally to the feeding densities. The relative expression of the *myod*, *myog*, and *mstn* genes was higher in larvae fed with fewer than 500 nauplii/post-larvae. Although low-growing larvae showed increased expression of *myod* and *myog* genes, responsible for muscle hyperplasia and hypertrophy, respectively, *mstn* expression may have played a significant inhibitory role in larval development. Further research is needed to better determine the effects of the live food on the zootechnical performance and the expression of the myogenic genes in the initial phase of the life cycle of the tambaqui post-larvae.

Keywords Larviculture · RAS · Tambaqui · Live food · qPCR

D. S. D. Melo · A. L. A. de Sá · I. Hamoy (✉)
Laboratório de Genética Aplicada (LGA), Instituto Socioambiental E Dos Recursos Hídricos (ISARH), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brazil
e-mail: ighamoy@gmail.com

S. L. de Matos Guerreiro
Laboratório de Genética Humana E Médica (LGHM), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Pará, Belém, Pará, Brazil

J. Natividade · P. F. F. Gomes · G. D. A. Palheta · F. C. Sterzelecki
Laboratório de Biosistemas Aquáticos Amazônicos (BIOAQUAM), ISARH, UFRA, Belém, Pará, Brazil

R. Takata
Departamento de Pesquisa E Produção, Fundação Instituto de Pesca Do Estado Do Rio de Janeiro (FIPERJ), Rio de Janeiro, Cordeiro, Brazil

E. da Silva Filho
Laboratório de Sorologia E Biologia Molecular (LSBM), Instituto de Ciências Agrárias, UFRA, Belém, Pará, Brazil

N. F. A. C. de Melo
Programa de Pós-Graduação Em Aquicultura E Recursos Aquáticos (PPGAQRAT), ISARH, UFRA, Belém, Pará, Brazil

Published online: 27 March 2023

Springer

LOSS OF GENETIC DIVERSITY AMONG PIRARUCU BROODSTOCKS IN FISH FARMS: A PILOT STUDY

Jeremias Silva dos Santos¹, Sávio Guerreiro², Natalia Bianca Caires Medeiros¹,
Kaliandra Alves¹, Igor Hamoy², Marília Nunes-Rodrigues^{2*}

SAP 27896 Received: 04/08/2021 Accepted: 28/03/2022

Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 21, n. 1, jan./mar., p. 106-109, 2022

ABSTRACT - Molecular markers can be used to monitor genetic variability in cultivated fish stocks with the aim of developing better aquaculture techniques and increasing productivity. In view of the above, the objective of the present work was to evaluate the genetic variability in pirarucu broodstocks in fish farms in the southeast and northeast of the of Pará state, Brazil. The samples were genotyped using four microsatellite markers, and genetic diversity indices were calculated for each broodstock. A total of 16 alleles were identified from the four loci tested in the 33 pirarucu samples, with means of 3.00, 2.75, and 2.25 alleles per locus in broodstocks from Tucumã, Parauapebas, and Moju municipalities, respectively. The Parauapebas broodstock had the highest mean observed heterozygosity. In the broodstocks from Tucumã and Parauapebas, the markers AgCAM16 and AgCAM18 were not at Hardy-Weinberg equilibrium. This pilot study showed that there were considerable losses of genetic variability in pirarucu breeding centers in the municipalities of Tucumã, Parauapebas and Moju compared to the variability in the natural populations of this fish species.

Keywords: *Arapaima gigas*, aquaculture, molecular markers, microsatellites, population genetics.

PERDA DE DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ESTOQUES DE REPRODUTORES DE PIRARUCU: UM ESTUDO PILOTO

RESUMO - Os marcadores moleculares podem ser usados para monitorar a variabilidade genética em estoques de peixes cultivados com o objetivo de desenvolver melhores técnicas de aquicultura e aumentar a produtividade. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a variabilidade genética em reprodutores de pirarucu em pisciculturas no sudeste e nordeste do estado do Pará, Brasil. As amostras foram genotipadas usando quatro marcadores microssatélites e os índices de diversidade genética foram calculados para cada estoque de reprodutor. Foram identificados um total de 16 alelos nos quatro locos testados nas 33 amostras de pirarucu, com médias de 3,00, 2,75 e 2,25 alelos por locus em estoques de reprodutores dos municípios de Tucumã, Parauapebas e Moju, respectivamente. O estoque de reprodutores de Parauapebas apresentou a maior heterozigosidade média observada. Nos estoques de Tucumã e Parauapebas, os marcadores AgCAM16 e AgCAM18 não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este estudo piloto mostrou que houve perdas consideráveis de variabilidade genética nos centros de reprodução de pirarucu nos municípios de Tucumã, Parauapebas e Moju em comparação com a variabilidade nas populações naturais desta espécie de peixe.

Palavras-chave: *Arapaima gigas*, aquicultura, marcadores moleculares, microssatélites, genética de populações.

INTRODUCTION

The pirarucu (*Arapaima gigas*) is among the 15 most intensively farmed fish species in Brazil. Production has taken a leap in recent years with 189.265 thousand tons produced in 2020 (IBGE, 2020), contributed to the growth of Brazilian fish farming. Fish breeding farms play key roles in maintaining genetic variability, which is fundamental to preventing excessive endogamy and the consequent loss of the adaptive capacity that forms the basis for breeding programs (AMARAL et al., 2019).

Molecular markers can be used to monitor genetic variability in cultivated fish stocks with the aim of developing better aquaculture techniques and increasing productivity (DUDU et al., 2015; FAZZI-GOMES et al. (2021b); LOPERA-BARRERO et al., 2015). Our area of

interest, the Carajás region (Southeast mesoregion, Pará state), has not implemented any type of strategic plan for the sector; therefore, we hypothesized that the pirarucu stocks there would have low genetic diversity. We expected the genetic diversity of *A. gigas* broodstocks to be lower than that of wild populations because, although previous studies by our group have found moderate genetic differentiation and high genetic variability among natural *A. gigas* populations in the Lower Amazon region (FAZZI-GOMES et al., 2017), studies of cultivated broodstocks of other Amazonian fish species have generally reported reduced genetic variability (LOPERA-BARRERO et al., 2015; AGUIAR et al., 2019). Therefore, the objective of this study was to assess the genetic variability of pirarucu broodstocks in breeding farms in the Southeast and Northeast

¹Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus Parauapebas, PA, Brasil.

²Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus Belém, PA, Brasil. E-mail: danyelle.rodrigues@ufra.edu.br. *Corresponding author.



Morphological and phylogenetic characterisation of *Unicauda tavaresii* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae): a parasite of the circumorbital tissue of the eye of two characiform fishes from the Amazon region of Brazil

Marcelo Francisco da Silva^{1,2} · Thales Geovane Rodrigues Maciel² · Diehgo Tuloza da Silva¹ · Sávio Lucas de Matos Guerreiro³ · Edilson Rodrigues Matos⁴ · Igor Guerreiro Hamoy⁵

Received: 19 December 2019 / Accepted: 24 August 2020 / Published online: 20 September 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Myxozoans of the family Myxobolidae are common parasites in fish. The diversity and ecology of the species of the genus *Unicauda* are poorly known, which hampers the understanding of the distribution and prevalence of this group of parasites. In the present study, cysts containing parasites whose morphology was consistent with the genus *Unicauda* were found in the circumorbital region of the ocular conjunctiva of the freshwater fish *Moenkhausia grandisquamis* Müller & Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) and *Triporthus angulatus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes: Triporthidae). The spores have an oval body and long caudal appendage, with a mean total length of $65.2 \pm 5.9 \mu\text{m}$ and width of $5.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$, with two oval and symmetrical polar capsules of $4.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$ in length and $1.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in width, containing polar filaments with five or six coils. An integrated comparative analysis of the morphological characteristics of this parasite and partial sequences of the SSU rDNA gene supported the identification of a new species of histozoic parasite of the genus *Unicauda* found in fish from the Tocantins River basin, in the eastern Brazilian Amazon region. The new species was denominated by *Unicauda tavaresii* n. sp.

Keywords SSU rDNA · Fish parasite · Myxozoa · Tropical region · Brazilian Amazon

Section Editor: Astrid Holze

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06866-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Edilson Rodrigues Matos
edilson.matos9@gmail.com

¹ Postgraduate Program in Biology of Infectious and Parasitic Agents, Federal University of Pará - PPGBAIP/UFPA, Belém, Pará, Brazil

² State University of the Tocantins Region of Maranhão - UEMASUL, Imperatriz, Maranhão, Brazil

³ Postgraduate Programme in Genetics, Federal University of Pará - PPGGEN/UFPA, Belém, Pará, Brazil

⁴ Carlos Azevedo Research Laboratory, Federal Rural University of the Amazon (UFRA), Avenida Presidente Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém, Pará 66077-901, Brazil

⁵ Laboratory of Applied Genetics, Federal Rural University of Amazonia - LGA/UFRA, Belém, Pará, Brazil

Introduction

The known diversity of a number of histozoic and coelozoic parasites that infect fish, belonging to the class Myxosporea Bütschli, 1881, has recently been amplified considerably through the systematic integration of morphological and phylogenetic analyses (Kent et al. 2001; Lom and Dyková 2006). These studies have helped to decipher the relationships among the taxa, both actinosporans and myxosporeans, which present an enormous diversity of structural types (Azevedo et al. 2014; Rosser et al. 2016).

The phylogenetic relationships among the representatives of the family Myxobolidae Thélohan, 1892 (Myxosporea, Bivalvulida) are still the subject of considerable debate (Vidal et al. 2018; Liu et al. 2019), in part, because of a general lack of data on some of the rarer taxa, such as the species of the genus *Unicauda*. This genus was initially suggested to have a close relationship with the genus *Henneguya* but has only a single caudal appendage, which is not continuous with the structure of the spore body (Cone and Melendy 2000;



An Acad Bras Cienc (2022) 94(Suppl. 3): e20211394 DOI 10.1590/0001-376520220211394
Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

ANIMAL SCIENCE

CSN1S1 and CSN3 gene variants in female Murrah buffaloes in the Brazilian Amazon

NATALIA B.C. MEDEIROS, SÁVIO L.M. GUERREIRO, RAIRIANA S.R. PEREIRA, ANDRE L. SÁ, MARCOS RODRIGUES, RAFAEL MEZZOMO, RAYLON P. MACIEL, IGOR G. HAMOY & MARÍLIA D.N. RODRIGUES

Abstract: The characteristics of milk are controlled by several genes, with emphasis on the four genes from casein, CSN1S1; CSN1S2; CSN2 and CSN3, which are responsible encoding of fractions the milk protein. The study of genetic variants in these genes, seek to investigate alleles, insertions or deletions, that can directly reflect on productive characteristics, indicating differences in milk quality, composition and yield. The CSN1S1 and CSN3 genes were analyzed in lactating Murrah buffaloes using nucleotide sequencing. An SNP was found in the amplified fragment of the CSN1S1 gene, located in nucleotide number 2,123 of the promoter region in position nt-258 (A/G). As for the CSN3 gene, two SNPs of exon number 4 were identified in codons 33 (ACC/ATC) and 34 (ACC/ACT) of the analyzed fragment. This study contributes to important associations between genetic variants and the desired characteristics of milk and its derivatives in future studies, because the variants found may be associated with the quality of milk, enabling genetic selection to be assisted by molecular markers, indicating a major advance that makes it possible to select animals early.

Key words: Amazon, *Bubalus bubalis*, milky quality, single nucleotide polymorphism.

INTRODUCTION

Firslty introduced in Amazon in 19th century, the buffalo (*Bubalus bubalis*) adaptation to Amazon environment was exceptional, and the acceptance of its beef and milk lead to a fascinating herd increased in the last decades (Sheikh et al. 2006). However, few attentions are paid to genetics characteristics of herds to increase products quality (Sheikh et al. 2006).

The characteristics of milk are controlled by several genes, in particular, the four casein genes, CSN1S1, CSN1S2, CSN2, and CSN3, which are responsible for encoding the four fractions of the protein α -casein - α -casein s1, α - casein s2, β - casein and κ - casein (El Nahas et al. 2013).

The CSN1S1 gene is located on chromosome 7 and is formed by 19 exons (NCBI- Gene ID

102396531-). Most studies that investigated the polymorphism of this gene involved the exons 17 and 19 (El Nahas et al. 2013). However, the studies have only found polymorphisms in the promoter region of this gene, as this region is fundamental for the transcription of the gene (Alves & Souza 2013). The CSN3 gene is located on chromosome 7 across five exons (NCBI- Gene ID 102395364). This study aimed to investigate the occurrence of variants in the CSN1S1 and CSN3 genes in buffalo females of the Murrah racial breed.

MATERIALS AND METHODS

The experimental procedures were authorized by the Ethics Committee on the Use of Animals



Morphology and molecular phylogeny of *Hoferellus jutubensis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) found parasitising *Ageneiosus inermis* (Siluriformes: Auchenipteridae), in the Brazilian Amazon region

Camila Maria Barbosa Pereira^a, Sávio Lucas de Matos Guerreiro^b, Diehgo Tuloza da Silva^a, Rodney Kozłowski de Azevedo^c, Edilson R. Matos^{a,*}, Igor G. Hamoy^b

^a Carlos Azevedo Research Laboratory, Institute of Animal Health and Production, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará 66.077-901, Brazil

^b Laboratory of Applied Genetics, Socio-Environmental and Water Resources Institute, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará 66.077-901, Brazil

^c PPG in Environmental Systems Analysis, CESMAC University Center, Maceió, Alagoas 57081-350, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Myxozoa
Morphology
Molecular description

ABSTRACT

The present study describes *Hoferellus jutubensis* n. sp., a myxozoan parasite found in the urinary bladder of the driftwood catfish *Ageneiosus inermis*, captured on Jutuba Island in the state of Pará, northern Brazil. A total of 30 *A. inermis* specimens were examined, of which 26 (86.7%) had myxospores and polysporic plasmodia of varying shapes and sizes dispersed in the lumen of the urinary bladder, either floating freely or attached to the epithelium. In the apical view, the myxospores of *Hoferellus jutubensis* n. sp. are rounded, 6.1 ± 0.2 (5.7–6.3) μm long and 5.5 ± 0.3 (5.2–6.0) μm wide, with two sub-spherical polar capsules, equal in size and shape, 2.5 ± 0.2 (2.3–2.7) μm long and 1.7 ± 0.2 (1.4–2.2) μm wide. The phylogenetic analysis of a partial sequence of the SSU rDNA gene, indicated that the new species is the sister taxon of *Hoferellus azevedoi*, with these two species forming a Brazilian lineage of *Hoferellus*. The comparison of the morphological and molecular data with those of the existing members of the genus confirmed the species status of *Hoferellus jutubensis* n. sp., which adds one further *Hoferellus* taxon to the known myxosporean diversity of the Amazon basin.

1. Introduction

The Amazon basin has the greatest diversity of fish found in any freshwater system, worldwide, due to the vast extension of the basin, its ecological heterogeneity, and complex geomorphology [1–3]. The driftwood catfish *Ageneiosus inermis* (Linnaeus, 1766) is the most amply distributed species of the genus *Ageneiosus* Lacépède, 1803 in South America. In the Amazon region, it constitutes a commercially valuable natural resource for local riverside populations [4–6]. Fish are the vertebrates most vulnerable to parasitism, given that their aquatic way of life facilitates the propagation, reproduction, and life cycle of many different types of parasite [7,8]. Parasitic infections often have deleterious consequences for the fish host, while fisheries are impacted negatively by the reduced fertility of stocks, increased morbidity and mortality, the loss of quality of fish products, and the possible transmission of parasites to human consumers [9,10,11].

Myxozoans are a prominent group of cnidarian micro-parasites, which infect aquatic organisms. These obligate endoparasites infect

vertebrate (primarily fish) and invertebrate hosts, in both freshwater and marine environments [12–15]. A number of new myxozoan species have been described in Brazil in recent years, primarily in the Amazon region, although in most cases, the species represent a few, relatively common genera, in particular *Henneguya* and *Myxobolus* [16–21]. While some of these genera are relatively diverse, others, such as *Hoferellus* Berg, 1898, are represented by a few Amazonian taxa, in this specific case, a single species, *Hoferellus azevedoi* [22].

Most species of the genus *Hoferellus* are coelozoic, although some of these parasites have conspicuous intracellular development, infecting freshwater fish [22] and, in one case, an anuran host [23]. *Hoferellus* may affect the renal system of the host, as in the case of *Hoferellus carassii* Akhmerov, 1960, which was first described in the carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), and has been identified as the cause of renal disease in the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), causing polycystitis, a swollen kidney, and abdominal distension [24–26].

Most *Hoferellus* species have been described based on the morphology of their myxospores, and few molecular data are available

* Corresponding author.

E-mail address: edilson.matos9@gmail.com (E.R. Matos).






<https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102445>

Received 18 February 2021; Received in revised form 4 August 2021; Accepted 25 August 2021

Available online 1 September 2021

1383-5769/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Genetic variability of tambaqui broodstocks in the Brazilian state of Pará

Leandro de Araújo Ferreira¹, Paola Fabiana Fazzi-Gomes^{1,2} ,
Sávio Guerreiro¹ , Marília Danyelle Nunes Rodrigues³ ,
Ândrea Kely Ribeiro-dos-Santos² , Sidney Santos², Igor Hamoy^{1*} 

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos, Laboratório de Genética Aplicada, Belém, PA, Brasil.

² Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Humana e Médica, Belém, PA, Brasil.

³ Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Parauapebas, Parauapebas, PA, Brasil.

*Corresponding author:

igor.hamoy@ufra.edu.br

Received: May 22, 2018

Accepted: March 16, 2019

How to cite: Ferreira, L. A.; Fazzi-Gomes, P. F.; Guerreiro, S.; Rodrigues, M. D. N.; Ribeiro-dos-Santos, A. K.; Santos, S. and Hamoy, I. 2019. Genetic variability of tambaqui broodstocks in the Brazilian state of Pará. *Revista Brasileira de Zootecnia* 48:e20180106. <https://doi.org/10.1590/rbz4820180106>

Copyright: This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



ABSTRACT - The present study evaluated the genetic variability of the broodstocks of tambaqui hatcheries in the Brazilian state of Pará. Samples were obtained from the caudal fin of 110 broodstocks from one hatchery in each of four municipalities (Santarém, Peixe-Boi, Breu-Branco, and Ulianópolis), representing all the individuals of each hatchery stock. The samples were genotyped using the multiplex system microsatellite markers. Data were used to calculate observed and expected heterozygosity, number of alleles per locus, and allelic richness. The effective population size and inbreeding coefficient were also calculated. The genetic differentiation between populations was evaluated by using F_{ST} , and population structuring by the most likely number of genetically homogenous populations and Unweighted Pair Group Method (UPGMA); the arithmetic means were based on Nei's. The indices indicated a loss of genetic variability in the broodstocks from Ulianópolis, Peixe-Boi, and Breu-Branco in comparison with wild tambaqui populations, although this was not apparent in the Santarém stock. A moderate level of genetic differentiation was found among the tambaqui broodstocks based on the F_{ST} estimates, which were reinforced by the structuring found in the Bayesian analysis and UPGMA. This reflects the domestication process, given that no such structuring is found in natural tambaqui populations. This moderate genetic differentiation associated with the loss of genetic variability found in the four tambaqui broodstocks from the state of Pará provides important insights for the development of future programs of genetic improvement, as well as the conservation of the genetic diversity of these stocks.

Keywords: *Colossoma macropomum*, fish, genetic diversity, hatcheries

Introduction

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most intensively-farmed native fish species in Brazil, with a total production of 136,990 tons in 2016 (IBGE, 2016). Tambaqui farming is considered an important alternative for the exploitation of the wild stocks of this species, and, given the economic importance of the species on both regional and national levels, it has been included in the Brazilian Program of Genetic Improvement (Lopes et al., 2009).

Understanding the genetic variability of captive stocks is fundamental to any program of genetic improvement (Moreira et al., 2007) or species conservation. The loss of genetic variability in farmed



Morphology and phylogeny of *Coccomyxa bragantinsensis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) found parasitising the Coco Sea catfish, *Bagre bagre* (Siluriformes: Ariidae), captured off the coast of Northern Brazil

José Pompeu Araujo Neto^a, Csaba Székely^b, Kálmán Molnár^b, Camila Maria Barbosa Pereira^a, Sávio Lucas de Matos Guerreiro^c, Igor G. Hamoy^c, Edilson R. Matos^{a,*}

^a Carlos Azevedo Research Laboratory, Institute of Animal Health and Production, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará 66.077-901, Brazil

^b Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, POB 18, H-1581 Budapest, Hungary

^c Laboratory of Applied Genetics, Institute for Socio-Environmental and Water Resources, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará, 66.077-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Myxozoa
Morphology
Molecular characteristics

ABSTRACT

The present study describes *Coccomyxa bragantinsensis* n. sp., which was found parasitising the gallbladder of the Coco Sea catfish, *Bagre bagre*, captured off Ajuruteua beach, in the region of Bragança in Pará state, northern Brazil. Most (77.5%) of the 40 fish specimens examined (31/40) had myxospores floating in the bile liquid. These spores are partially ellipsoid, with a tapering anterior extremity and a rounded, elongated posterior extremity with a single piriform polar capsule containing a helicoidal polar filament, with 5–6 coils. A partial sequence of 957 bp of the SSU rDNA gene was obtained from the specimens and deposited in GenBank (xxx). The new species described here – *Coccomyxa bragantinsensis* n. sp. – is phylogenetically similar to *Coccomyxa morovi*, although it differs from all the other *Coccomyxa* species and is the first species of this genus to be described from Brazil on the basis of molecular evidence.

1. Introduction

Fish are the vertebrates that are infected with the greatest diversity of parasites, which reflects the fact that the aquatic environment facilitates the transmission and dispersal of these organisms [1–3]. Fish parasites include members of the class Myxosporea Bütschli, 1881, which are among the most common pathogenic organisms found in freshwater and marine fishes [4,5].

Myxozoans are a diverse and amply distributed group, with more than 2400 known species, and new species being described periodically [6–8]. Myxozoans are endoparasites, and may be either coelozoic, when found in the body cavity of the host and in organs such as the urinary and gallbladders, or histozoic, in the case of the species that parasitise cells, tissue or even blood vessels [9–11].

One prominent myxozoan genus is *Coccomyxa* Léger & Hesse, 1907, which currently has 11 established species. These species are all coelozoic endoparasites of marine fish hosts, being found in the gallbladder, except for *Coccomyxa hoffmani* (Cheung & Nigrelli, 1990) which has a histozoic way of life, and develops in the cartilage of the gills of the striped eel-tail catfish *Plotosus anguillari* [12–20].

Up to now, the species of the genus *Coccomyxa* have been described based primarily on the morphology of the spores examined by light microscopy, with only limited phylogenetic analyses [18–20]. Modern molecular approaches permit the more reliable identification of species [20–22].

The present study describes a new species of *Coccomyxa*, based on the morphological and molecular analysis of specimens found parasitising the gallbladders of the Coco sea catfish, *Bagre bagre* Linnaeus, 1758, collected off Ajuruteua beach in Pará state, northern Brazil, which was denominated *Coccomyxa bragantinsensis* n. sp. This is the first record of the genus *Coccomyxa* from the Amazon region.

2. Material and methods

The *Bagre bagre* specimens analysed in the present study were collected between July 2021 and March 2022 off Ajuruteua beach. This 2.5 km-long beach is located on the Atlantic coast of northern Brazil, 36 km north of the city of Bragança, in the northeastern extreme of the state of Pará (00°49' S, 46°36' W).

Once collected, the specimens were transported in a cooler to the

* Corresponding author.

E-mail address: edilson.matos9@gmail.com (E.R. Matos).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102815>

Received 27 June 2023; Received in revised form 4 October 2023; Accepted 7 October 2023

Available online 20 October 2023

1383-5769/© 2023 Published by Elsevier B.V.