



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira

PPGBC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

Damires Sanches Pereira

**DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE ARRAIAS
(MYLIOBATIFORMES: POTAMOTRYGONIDAE) DO RIO XINGU**

Orientador: Profa. Dr. Grazielle Fernanda
Evangelista Gomes

Coorientador: Profa. Dra. Magali Gonçalves
Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

ALTAMIRA - PA

JULHO – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS ALTAMIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

Damires Sanches Pereira

DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE ARRAIAS
(MYLIOBATIFORMES: POTAMOTRYGONIDAE) DO RIO XINGU

Orientador: Profa. Dra. Grazielle Fernanda
Evangelista Gomes

Coorientador: Profa. Dra. Magali Gonçalves
Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Pará, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade e Conservação para
obtenção do título de Mestre em
Biodiversidade e Conservação.

ALTAMIRA - PA

JULHO – 2018

DAMIRES SANCHES PEREIRA

**DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE ARRAIAS
(MYLIOBATIFORMES: POTAMOTRYGONIDAE) DO RIO XINGU**

Orientadora:

Prof. Dra. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes
Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança

Coorientadores:

Prof. Dra. Magali Gonçalves Garcia
UFPA - Altamira

Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa
UFPA - Altamira

Banca Examinadora:

Dr^a. Aurycéia Jaquelyne Guimarães da Costa
Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança

Prof. Dr^a. Juliana Araripe Gomes da Silva
Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança

Prof. Dr^a. Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha
Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança

Suplentes:

Prof. Dra. Gláucia Caroline Silva de Oliveira
Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança

ALTAMIRA - PA
2018

**Dedico esta dissertação ao meu irmão,
por razões que só ele pode compreender:**

Damiro Sanches (*in memoriam*)

**“Um homem que ousa
desperdiçar uma hora de
tempo não descobriu o
valor da vida.”**

— Charles Darwin

Agradecimentos

Ao Programa de Biodiversidade e Conservação-PPGBC, assim como a Universidade Federal do Pará-UFPA-Campus Altamira, um Campus do interior que tenho orgulho de fazer parte.

À minha orientadora, profa. Dra. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes pela confiança, correções, revisões, sugestões, amizade e apoio durante a realização deste.

Ao prof. Dr. Leandro Melo de Sousa que me apresentou as arraias e encorajou nas aventuras pelo rio Xingu.

À doutoranda e professora Ivana Veneza pelo auxílio, apoio, paciência e principalmente pelos ensinamentos, conselhos e companheirismo. O que seria dos meus dias de laboratório sem você? Tua amizade é essencial!

Ao Instituto de Estudos Costeiros (IECOS) - UFPA - Bragança, aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada-LAGA, pelo auxílio com pequenos detalhes que fizeram toda a diferença, em especial ao Raimundo Everest com ajuda nas análises e ao Danilo Jorge pela amizade e dicas durante o trabalho. Obrigada pela disponibilização de materiais e equipamentos para realização de parte deste trabalho.

Aos mestrandos e amigos Caçador, Nara, Nini e Beatriz pela companhia, auxílio, companheirismo, por me escutar e compartilhar vários momentos desde o início.

Aos pescadores Dani, Moreno, Nica, Joel, Magno pelos conselhos e auxílio durante as coletas, agradeço pelos ensinamentos das técnicas de coleta e de vida, pela paciência e carinho, assim como os pilotos da voadeira que nos acompanhou nessa aventura.

À equipe da Consultoria Ambiental Ichthyology, por todo apoio logístico durante as coletas na área próximo a Hidrelétrica de Belo Monte.

À equipe do ICMBIO: Patrícia, Victor e Wagner pelo apoio logístico nas coletas em Unidades de Conservação.

Às minhas amigas “SODA²” e os amigos “VoltaDosQueNãoForam”, que mesmo distantes se faziam presentes, mandando as fotos das festas que eu estava perdendo em Altamira (rs). Obrigada pelas mensagens de força e perseverança quando aqui ía mal.

Aos meus pais Ana Mira e Damião, por desde cedo me deixarem livre, pra traçar minha história com minhas próprias pernas. A minha irmã Luana por me ouvir nos momentos de aflição, sabendo sempre me acalmar.

À CAPES, pela concessão da bolsa. E a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho ser concluído, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo Geral	9
Abstract	10
Introdução Geral	11
1.1 Considerações Gerais	11
1.2. Ictiofauna da Região Neotropical	11
1.3. Ordem Myliobatiformes	12
1.4. Família Potamotrygonidae (Garman 1877)	13
1.4.1. Gênero <i>Potamotrygon</i>	13
1.4.2. Gênero <i>Paratrygon</i>	20
1.5. Importância Econômica das Arraias de Água doce	22
1.6. Marcadores Moleculares na Ictiofauna	22
1.6.1. Estudos genéticos com Potamotrygonídeos	23
1.7. Justificativa	24
Objetivos	25
1.8.1. Objetivo Geral	25
1.8.2. Objetivos Específicos	25
Literatura Citada	26
DNA mitocondrial revela indícios de Especiação e Hibridização em Arraias (POTAMOTRYGONIDAE: MYLIOBATIFORMES) da Bacia do rio Xingu	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
Amostragem	38
Procedimentos Laboratoriais	39
Banco de Dados	39
Inferências Filogenéticas e Identificação de Espécies	40
Delimitação de Espécies	41
RESULTADOS	42
Caracterização dos Bancos de Dados	42
Identificação Molecular e Delimitação de Espécies	43
Divergência Genética	44
Inferências Filogenéticas	45
DISCUSSÃO	46

Delimitação das Espécies e Índícios de Híbridização	46
Especiação Simpátrica em <i>Paratrygon</i>	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
LITERATURA CITADA.....	50
APÊNDICE	56

Resumo Geral

A família Potamotrygonidae possui espécies de importância ornamental e de grande valor no comércio exterior, tornando-se um dos peixes mais caros utilizados em aquarofilia. Apesar da ampla distribuição geográfica de *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *Paratrygon aiereba*, existem muitas espécies endêmicas de uma única bacia, como *Potamotrygon leopoldi*, com distribuição restrita à bacia do rio Xingu e seus afluentes. Área de constante interferência antrópica e complexidade de espécies presentes, é de extrema importância a utilização de ferramentas moleculares para uma melhor identificação dessas espécies, fazendo com que assim seja possível entender a variação morfológica existente nas mesmas. Além disso, as demais espécies da família, que ocorrem no rio Xingu, têm mostrado problemas diante da ampla distribuição geográfica e tendência à subestruturação populacional. Muitas dessas espécies são complexos de espécies ou espécies crípticas, o que dificulta o entendimento sobre a real diversidade neste táxon, tornando pertinente a utilização de ferramentas moleculares para uma caracterização precisa e eficiente a fim de gerar informações capazes de auxiliar programas de manejo e conservação para arraias de água doce. Portanto, neste estudo foram abordados três métodos de delimitação de espécies (GMYC, ABGD, PTP) em duas regiões mitocondriais (Cyt b e COI *Barcode*) em um grupo de cinco espécies de arraias de água doce (*Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi* e *Paratrygon aiereba*), com amostragens distribuídas em 22 áreas de coleta ao longo da bacia do Xingu, sendo 20 áreas ao longo do rio principal e uma em cada tributário, rio Iriri e Rio Bacajá. Nossos resultados demonstram compartilhamento de haplótipos e associação a distribuição geográfica dessas espécies, com replicação de coloração do dorso em diferentes ramos das árvores de agrupamento de vizinhos, máxima verossimilhança e inferência bayesiana, indicando um possível caso de hibridização entre *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P. scobina* no rio Xingu. A comparação entre o DNA mitocondrial Cyt b e COI mostrou que a região *Barcode* é mais adequada do que Cyt b, sendo eficiente em discriminar espécimes as suas respectivas espécies e também indicando especiação em *Paratrygon*. O método GMYC utilizando sequências de COI, mostrou ser mais sensível que os outros métodos, separando as espécies em seus respectivos grupos.

Palavras-chave: *Potamotrygon*, *Paratrygon*, Cyt b, DNA *barcode*, ABGD, GMYC, PTP, especiação, hibridização.

Abstract

The family Potamotrygonidae possesses species of ornamental importance that has great value in the foreign commerce, becoming one of the most expensive fish used in Aquarioffilia. Despite the wide geographic distribution of *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* and *Paratrygon aiereba*, there are many endemic species of a single basin, such as *Potamotrygon leopoldi*, with distribution restricted to the Xingu basin and its tributaries. A constant area of anthropic interference and complexity of species present, it is extremely important to use molecular tools to better understand these species, making it possible to understand the morphological variation in them. In addition, the other species of the family, which occur in the Xingu River, have shown problems with the wide geographic distribution and tendency towards population substructuring. Many of these species are complexes of species or cryptic species, which makes it difficult to understand the real diversity in this taxon, making use of molecular tools for a precise and efficient characterization in order to generate information capable of assisting management and conservation programs for freshwater stingrays. Therefore, three methods of species delimitation (GMYC, ABGD, PTP) in two mitochondrial regions (Cyt b e COI Barcode) in a group of five species of freshwater stingrays (*Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi* e *Paratrygon aiereba*), with samples collected in 22 collection areas along the Xingu basin, with 20 areas along the main river and one in each tributary, Iriri River and Bacajá River. Our results demonstrate haplotype sharing and the association of the geographic distribution of these species, with replication of back dyeing in different branches of neighbors clustering trees, maximum likelihood and Bayesian inference, indicating a possible case of hybridization between *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P.* in the Xingu River. The comparison between mitochondrial DNA Cyt b and COI showed that the Barcode region is more adequate than Cyt b, being efficient in discriminating specimens from their respective species and also indicating speciation in *Paratrygon*. The GMYC method using COI sequences showed to be more sensitive than the other methods, separating the species in their respective groups.

Key words: *Potamotrygon*, *Paratrygon*, Cyt b, DNA barcode, ABGD, GMYC, PTP, speciation, hybridization.

Introdução Geral

1.1 Considerações Gerais

Os vários conceitos alternativos de espécies frequentemente levam a discordâncias sobre limites ou números de espécies (De Queiroz 2007). Nos últimos anos, com a explosão na disponibilidade de sequências de DNA e a emergência de novas teorias da biologia sistemática e genética de populações, vê-se o desenvolvimento de novos métodos para delimitação molecular de espécies, como por exemplo o método *Generalized Mixed Yule-Coalescent* (GMYC) (Pons et al. 2006) que usa a mudança na taxa de ramificação ao longo de uma árvore filogenética para detectar a altura em que os eventos de especiação se transformam em coalescente; o *Poisson Tree Process* (PTP) (Zhang et al. 2013), que remove a dependência de uma árvore ultramétrica precisa e usa o número de substituições de nucleotídeos ao invés de procurar o ponto de transição das derivações, e no método *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD), onde as maiores distâncias genéticas intraespecíficas devem ser inferiores a menor distância genética entre indivíduos de espécies diferentes (Puillandre et al. 2012).

Na última década, uma ferramenta que se popularizou bastante foi a do DNA *barcode*, em que as espécies devem apresentar monofília recíproca e a divergência intraespecífica é sempre menor do que a divergência interespecífica (Hebert et al. 2003), considerado uma ferramenta eficiente e acessível globalmente para delimitar e identificar novas espécies (Hubert et al. 2008; Mabragaña et al. 2011; Mejía, León-Romero, and Soto-Galera 2012; de Oliveira Ribeiro et al. 2012; Ward 2009).

1.2. Ictiofauna da Região Neotropical

A região Neotropical tem sido objeto de um grande número de estudos da biogeografia de peixes (Frederico et al. 2012). Além disso, para diversas regiões, ainda existem lacunas quanto ao conhecimento relacionado a delimitação de espécies que considerem as singularidades de cada rio. A bacia do Xingu, por exemplo, é marcada por uma série de eventos geológicos que ocorreram da parte superior para o estuário inferior do rio, o que levou à formação de numerosas cachoeiras e corredeiras. Os recursos dessa paisagem favoreceram a biodiversidade e influenciaram padrões de distribuição da fauna aquática (Camargo, Giarrizzo, and Isaac 2004; Silva 2012).

A fauna de peixes de água doce da região Neotropical destaca-se pela riqueza e diversidade, bem como por padrões ecológicos, biológicos, comportamentais e biogeográficos. No Brasil, considerado um dos países megadiversos do mundo e com a maior área dentro do Neotrópico, são registradas aproximadamente 2.625 espécies válidas de água doce (Van Der Laan, Eschmeyer, and Fricke 2014). Isso representa mais da metade das 5.160 espécies estimadas por (Böhlke, Weitzman, and Menezes 1978; Reis et al. 2016) somente para a América do Sul. A estimativa mais realista para a região Neotropical, no entanto, pode ser a de (Reis et al. 2016) que, baseado na compilação do número de espécies nominais descritas nas últimas décadas, considera que o número total de espécies dessa região biogeográfica aponta para uma diversidade final entre 8000 e 9000 espécies, representando quase um quarto de todas as espécies de peixes do mundo e um oitavo da diversidade global de vertebrados.

As famílias mais numerosas da região neotropical são Characidae (597 espécies), Loricariidae (800 espécies), Cichlidae (220 espécies) e Cinolebiidae (174 espécies), pertencentes às ordens Characiformes, Siluriformes, Perciformes e Cyprinodontiformes, respectivamente. Dentre os grupos pouco representados, destacam-se por sua importância econômica, filogenética e bioecológica, as arraias de água doce (Família Potamotrygonidae – ordem Myliobatiformes) pertencentes ao grupo Elasmobranchii (Arraias, tubarões e quimeras), possuindo espécies endêmicas na maioria das bacias, inclusive a do rio Xingu (Buckup, Menezes, and Ghazzi 2007).

1.3. Ordem Myliobatiformes

A ordem Myliobatiformes é representada por 12 famílias (Zanobatidae, Hexatrygonidae, Dasyatidae, Potamotrygonidae, Urotrygonidae, Gymnuridae, Plesiobatidae, Urolophidae, Aetobatidae, Myliobatidae, Rhinopteridae e Mobulidae). A família Potamotrygonidae, descrita por Garman, 1877, é o único grupo de espécies de Elasmobranchii inteiramente de água doce (Carvalho, Lovejoy, and Rosa 2003).

As populações dessa ordem seguem padrões ecológicos inerentes a animais *K*-estrategistas, possuindo grande longevidade, pequena taxa de crescimento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e longos períodos de gestação, apresentando desta forma uma capacidade reduzida de recuperação a impactos negativos, consideradas vulneráveis a impactos antrópicos devido a sua distribuição restrita e degradação crescente de seus habitats (Charvet-Almeida, Góes de Araújo, and de Almeida 2005; Charvet-Almeida,

Lins, and Almeida 2008), como é o caso da região do Xingu, que depois da construção da Hidrelétrica de Belo Monte vem passando por alterações no curso do rio e modificações de habitat, o que pode está afetando a distribuição das espécies de arraias.

1.4. Família Potamotrygonidae (Garman 1877)

Estudos com base em biogeografia histórica, sugerem que as raias de água doce se originaram de espécies marinhas, diferenciadas em função de transgressões que abrangeram o alto Amazonas no começo do Período Mioceno, antes do fechamento do ístimo do Panamá (Lovejoy, Bermingham, and Martin 1998). Com a volta do oceano ao seu nível normal, esse grupo teria ficado preso dentro do continente, resultando no compartilhamento de um ancestral comum, o gênero *Himantura*, filogeneticamente mais próximo aos potamotrigonídeos (Dunn, McEachran, and Honeycutt 2003; Lovejoy 1996).

Esta família é endêmica da região Neotropical (Carvalho et al. 2003) e possui distribuição restrita aos rios da América do Sul que deságuam no Caribe e Atlântico (Rosa, Charvet-Almeida, and Quijada 2010). Nos últimos dez anos, uma série de revisões taxonômicas e descrições de espécies foram realizadas com 13 novas espécies descritas, somando, atualmente, um total de 32 espécies válidas (Carvalho and Lovejoy 2011; Carvalho and Ragno 2011; Fontenelle and De Carvalho 2017).

A família Potamotrygonidae é um grupo monofilético, possuindo as seguintes sinapomorfias: processo pré-pélvico longo presente na porção anterior medial da cintura pélvica, glândula retal reduzida e baixa concentração de uréia no sangue (Carvalho et al. 2003). Compreende quatro gêneros: *Paratrygon* Duméril (1865), gênero monoespecífico, *Potamotrygon* Garman (1877), com 27 espécies, *Plesiostrygon* Rosa, Castello & Thorson (1987) e *Heliotrygon* (Carvalho and Lovejoy 2011) com duas espécies descritas cada (Fontenelle and De Carvalho 2017). Indicam, com base em caracteres neuroanatômicos, que os gêneros *Paratrygon* e *Heliotrygon* são grupos irmãos, assim como os gêneros *Potamotrygon* e *Plesiostrygon*, concordando com estudos morfológicos e moleculares anteriores (Espurt et al. 2009; Lovejoy 1996; Lovejoy et al. 1998).

1.4.1. Gênero *Potamotrygon*

Este gênero é o mais diverso da família Potamotrygonidae, com 27 espécies descritas (Carvalho and Lovejoy 2011; Carvalho et al. 2003; Carvalho and Ragno 2011;

Fontenelle and De Carvalho 2017; Fontenelle, Da Silva, and De Carvalho 2014; Loboda and Carvalho 2013; Rosa, De Carvalho, and Wanderley 2008; da Silva and de Carvalho 2011) das quais, quatro tem ocorrência no rio Xingu, são elas: *Potamotrygon leopoldi*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon scobina*.

Essas espécies, entre outras do gênero, fazem parte do grupo roseta-ocelado por terem surgido recentemente no tempo evolutivo (~2,4 Ma) e sido originadas a partir de uma espécie ancestral que ocupava a calha principal do rio Amazonas (Toffoli et al. 2008).

✓ **Espécie *Potamotrygon leopoldi* (CASTEX & CASTELO, 1970)**

A espécie *Potamotrygon leopoldi* (**Figura 1**) conhecida popularmente como arraia do Xingu, arraia de fogo ou arraia negra, acaba se diferenciando de seus congêneres devido à presença de ocelos brancos-amarelos em contraste com o fundo do dorso preto (Rosa et al. 2008). Encontrada em habitats com correnteza moderada e fundos com aglomerados rochosos (Carvalho et al. 2003; Kirchhoff et al. 2014). Alimentam-se principalmente de invertebrados (Charvet-Almeida et al. 2008).

Possui registro de coleta no alto-rio Xingu, perto da confluência do rio Maiuá-Missú, no município de São José do Xingu, Mato Grosso (Rosa 1985) até o médio-Xingu nas proximidades de Vitória do Xingu, Pará (**Figura 2**). Com registro apenas para o bacia do Xingu, caracterizado como rio de águas claras e grandes cachoeiras que podem servir como uma barreira geográfica para algumas espécies, desempenhando assim um papel importante no isolamento destas populações (Frederico et al. 2012).

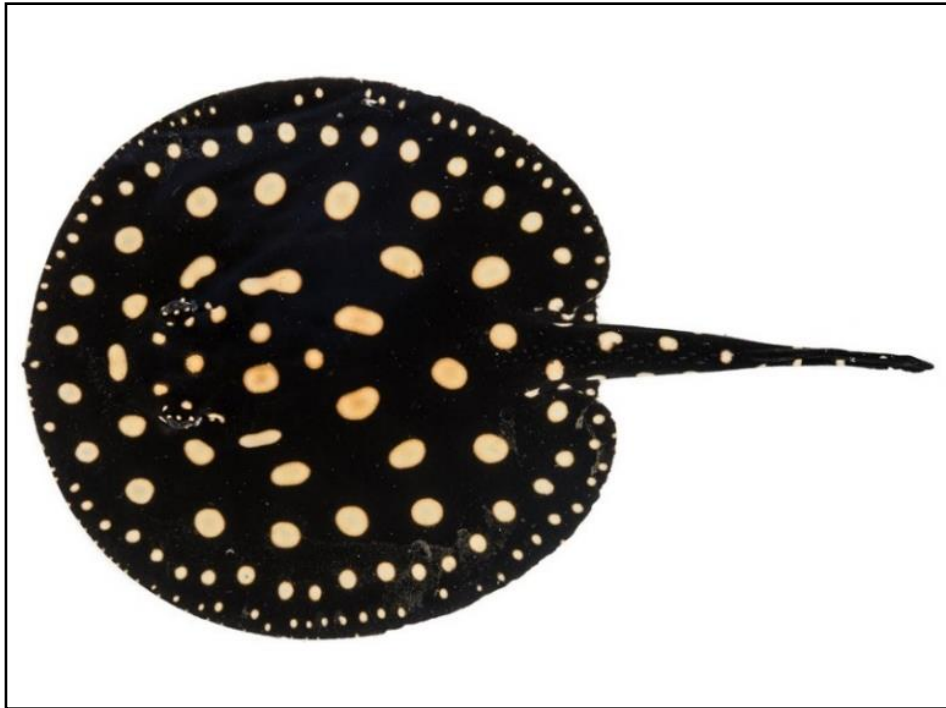


Figura 1. Exemplar adulto da espécie *Potamotrygon leopoldi*. (Foto: Leandro Sousa).

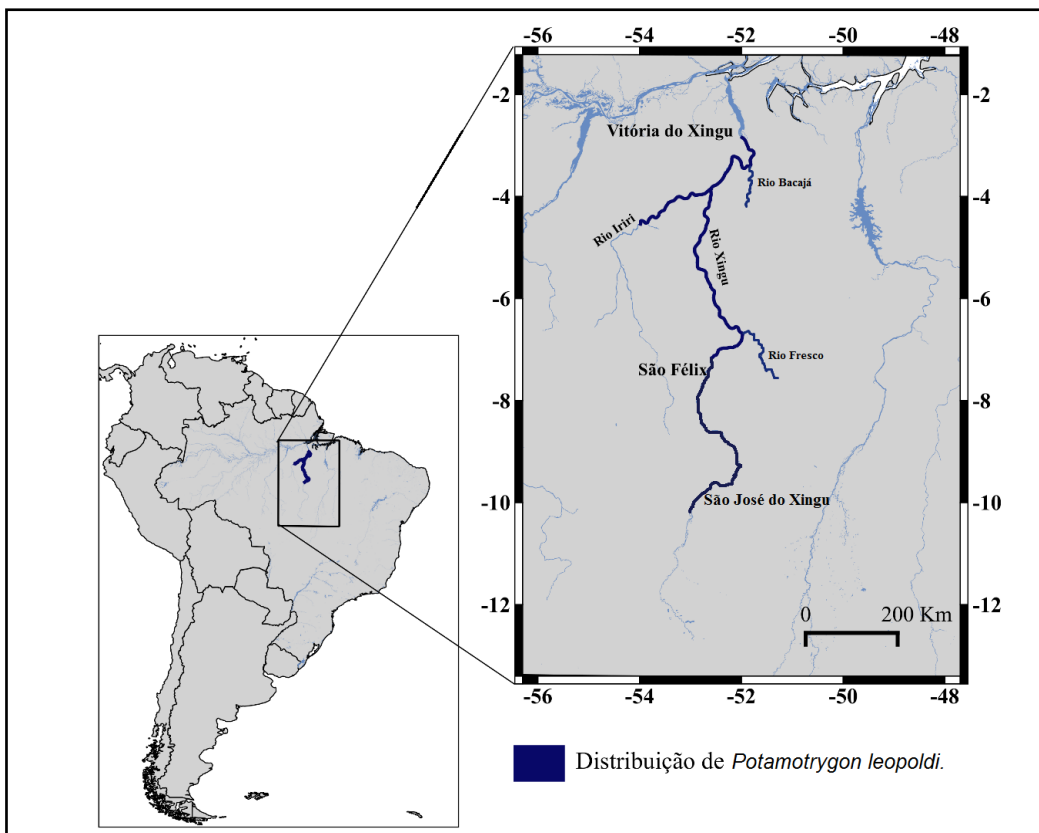


Figura 2. Mapa de distribuição de *Potamotrygon leopoldi*.

✓ **Espécie *Potamotrygon orbignyi* (CASTELNAU, 1855)**

A espécie *Potamotrygon orbignyi* (**Figura 3**) possui uma variação de coloração extensa (Silva 2009) e sua dieta consiste em peixes, insetos e crustáceos, evidenciando hábitos mais especializados (Filho 2006), os espécimes maiores podem pesar cerca de 5 kg.

É uma espécie com ampla distribuição geográfica, que ocorre na bacia do Orinoco, desde a Amazônia colombiana, Guiana, Suriname até o baixo rio Amazonas (**Figura 4**). Os aspectos da biologia reprodutiva estudados por (Filho 2006) mostram que os machos atingem a maturidade sexual com 23 cm de largura do disco (LD) e as fêmeas com 18,5 cm LD, sendo que estas dão à luz em média dois filhotes durante qualquer época do ano, com período de gravidez estimada em 11 meses (Winemiller 1989) relacionado ao ciclo hidrológico do rio no período chuvoso (Charvet-Almeida et al. 2005).



Figura 3. Exemplar adulto da espécie *Potamotrygon orbignyi*. (Foto: Leandro Sousa).



Figura 4. Mapa da região neotropical com a distribuição geográfica de *Potamotrygon orbignyi*, área em verde (Retirado de Rosa, 1985).

✓ **Espécie *Potamotrygon motoro* (MÜLLER & HENLE, 1841)**

A espécie *Potamotrygon motoro* (**Figura 5**) foi considerada um complexo de espécies após a última revisão taxonômica (Loboda and Carvalho 2013) registrando-a como a espécie de arraia mais amplamente distribuída, ocorrendo em todas as bacias hidrográficas onde ocorrem espécies da família (**Figura 6**). Fato que pode justificar casos de hibridização da espécie *P. motoro* com *P. falkneri* endêmica do rio Paraná (Cruz et al. 2014).

Sua dieta generalista é composta por insetos, moluscos, anelídeos e peixes (Almeida et al. 2010; Shibuya, Zuanon, and Tanaka 2012). O ciclo reprodutivo de *P. motoro* está relacionado ao ciclo hidrológico do rio no período seco, com seis meses de gestação e temporada de nascimento no período chuvoso, observando uma média de sete embriões (Charvet-Almeida et al. 2005).



Figura 5. Exemplar adulto da espécie *Potamotrygon motoro*. (Foto: Leandro Sousa).

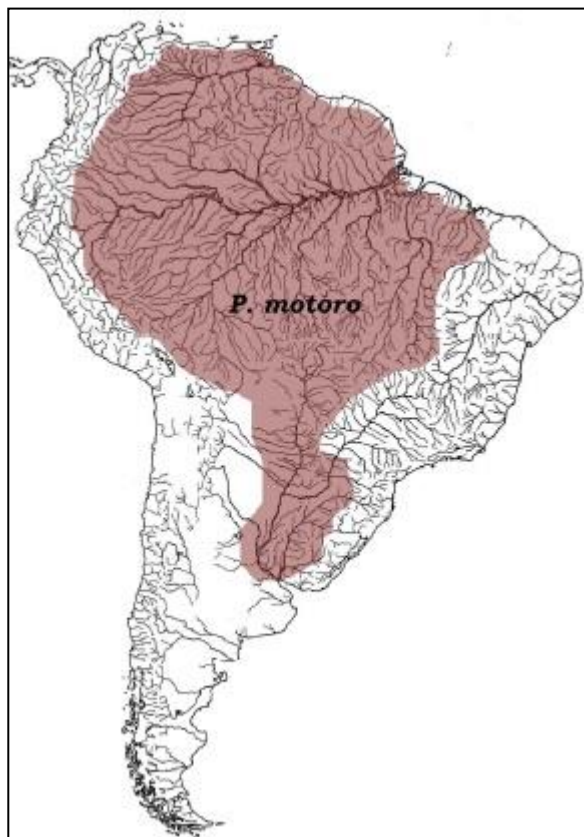


Figura 6. Distribuição geográfica de *Potamotrygon motoro* (segundo Rosa 1985).

✓ **Espécie *Potamotrygon scobina* (GARMAN, 1913)**

Atualmente considerada um complexo de espécies (Fontenelle and De Carvalho 2017) *P. scobina* (**Figura 7**) tem sua distribuição registrada para a drenagem média e baixa do rio Amazonas, de Manaus a Belém, com registro de indivíduos com padrão de coloração semelhante a *P. scobina* nos rios Negro, Xingu Aripuanã, Caura e Mavaca (**Figura 8**). Apresentam um número médio de embriões que variam de um a 16 embriões (Charvet-Almeida et al. 2005).



Figura 7. Exemplar adulto da espécie *Potamotrygon scobina* (Foto: Leandro Sousa).

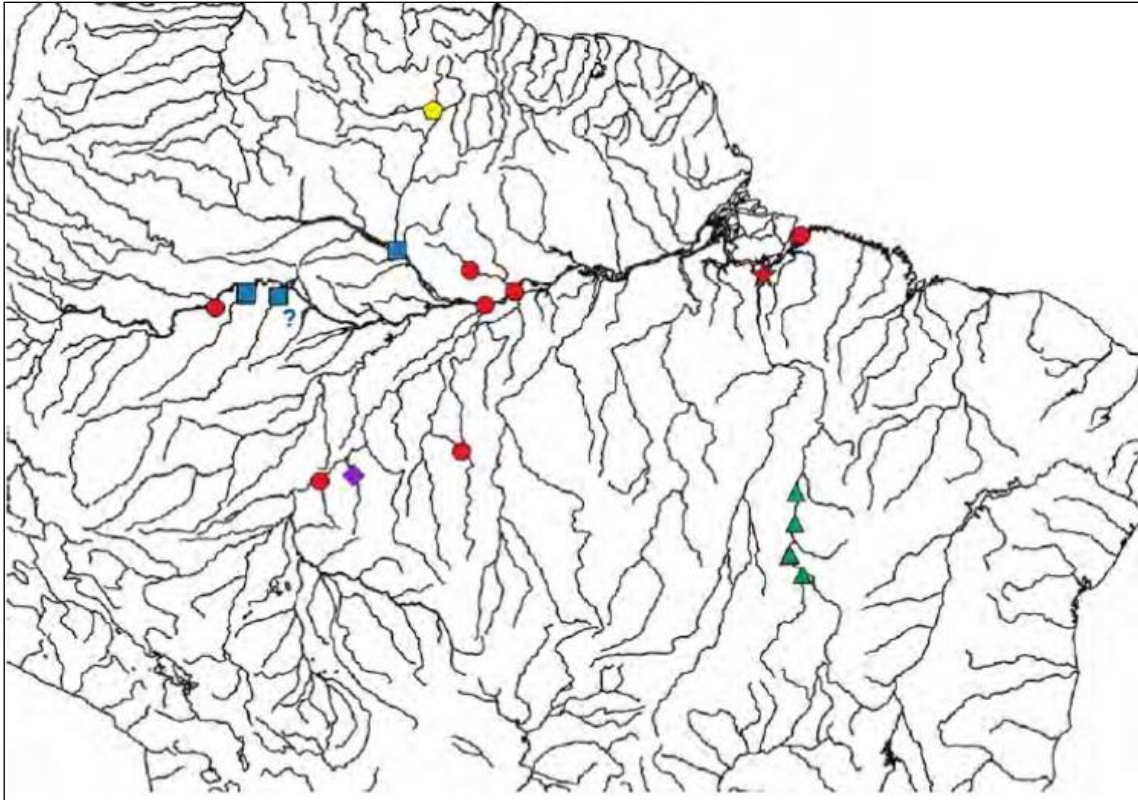


Figura 8. Distribuição geográfica do complexo *Potamotrygon scobina* (Fontenelle and De Carvalho 2017) e respectivos pontos de coleta e de morfotipos.

1.4.2. Gênero *Paratrygon*

Paratrygon: grego, para no lado de + grego, trygon = um raio de picada. Gênero basal da família (Marques 2000), descrito até o momento como monotípico, sendo a única espécie, *Paratrygon aiereba*.

✓ Espécie *Paratrygon aiereba* (MÜLLER & HENLE, 1841)

A espécie *Paratrygon aiereba* (**Figura 9**) com ampla distribuição geográfica (**Figura 10**) é comum em áreas rasas e perto de bancos de areia, considerada uma das maiores arraias da família, podem atingir 25 kg de peso.

Com ciclo reprodutivo relacionado ao ciclo hidrológico do rio, a idade estimada de maturidade para *P. aiereba* chega a aproximadamente 35 anos, com gestação de 9 meses e temporada de nascimento no período chuvoso (Charvet-Almeida et al. 2005). As fêmeas parecem ter apenas dois embriões por gestação e se alimentam principalmente de peixes (Lasso et al. 2016).



Figura 9. Exemplar adulto da espécie *Paratrygon aiereba* (Foto: Leandro Sousa).

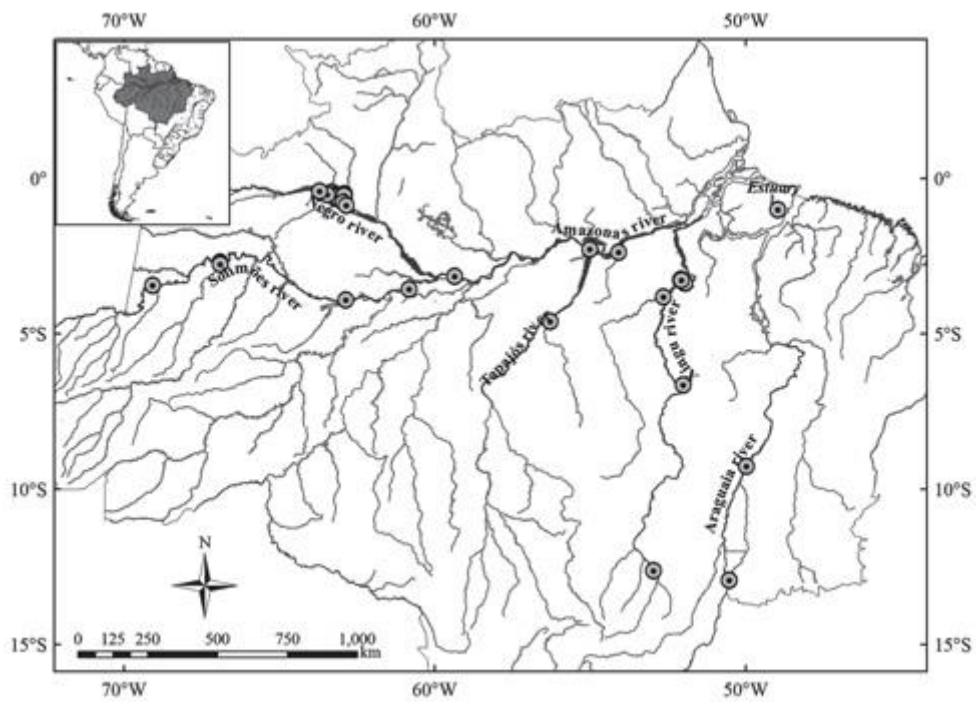


Figura 10. Distribuição geográfica de *Paratrygon aiereba* (Frederico et al. 2012) e respectivos pontos de coleta.

1.5. Importância Econômica das Arraias de Água doce

A pesca comercial de arraias na região da bacia do rio Negro, para fins de alimentação, tem ocorrido principalmente sobre as espécies *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro*, que são raias de maior porte e que apresentam padrão reprodutivo K-estrategista (Duncan, Inomata, and Fernandes 2010).

Em relação à pesca ornamental, de acordo com as cotas de exportação regulamentada pelo IBAMA (1998-2008), as principais espécies exportadas foram: *P. motoro*= 37,5%; *Potamotrygon* sp. = 34,2%; *P. schroederi*= 12,8%; *P. orbignyi*= 11,9%, *P. leopoldi*= 2%, *P. henlei*= 1,6%. Considerando o sistema de cotas, desde 1998 foram exportadas mais de 130 mil raias de água doce vivas pelos Estados do Amazonas e Pará. Contudo, se incluídos os dados de mortalidade pós-captura, rejeição e mortalidade, mais de 190 mil raias foram removidas de seus ambientes. Globalmente, o valor estimado do comércio das raias de água doce foi de US\$ 20 milhões nos últimos 10 anos, enquanto que os pescadores locais receberam apenas 0,3% deste total (Duncan et al. 2010).

Na cidade de Altamira, mais de 200 espécies de peixes são comercializadas como ornamentais (Carvalho Júnior et al. 2009). As espécies da família Potamotrigonidae possuem alto valor comercial e o aumento do valor de mercado leva ao aumento da pesca seletiva e, além disso, mudanças ambientais implicam grandes mudanças sociais, uma vez que grande parte da população local depende da pesca ornamental como fonte de renda (Ramos et al. 2015). Enquanto o Brasil não desenvolve protocolos para a produção comercial de peixes ornamentais, essas populações vivem da pesca extrativista. Em países asiáticos, considerados grandes importadores, os avanços tecnológicos foram registrados na aquicultura para várias espécies brasileiras de alto valor comercial, como as arraias (Carvalho Júnior et al. 2009).

Assim, já pode-se observar uma perda de lucros para o Brasil. Por causa disso, é de interesse prioritário dos pescadores e exportadores locais que sejam feitas pesquisas que visem permitir o desenvolvimento do comércio ornamental na região do Xingu.

1.6. Marcadores Moleculares na Ictiofauna

Nos últimos anos, o uso de marcadores moleculares vem sendo cada vez mais aplicado no estudo da Filogeografia na área de conservação de espécies (Bertorelle et al. 2003), sendo possível conhecer a história evolutiva de uma espécie, a estruturação

populacional, tamanho efetivo populacional e níveis de fluxo gênico com a utilização de ferramentas moleculares (Allendorf, Hohenlohe, and Luikart 2010; Steiner et al. 2013). Em casos de arraias com alto grau de policromatismo, é comum a ocorrência de erros na descrição taxonômica utilizando chaves de identificação pela coloração do dorso, sendo recomendado o uso de ferramentas moleculares para auxiliar a resolução deste tipo de problema taxonômico (Carvalho et al. 2003).

Alguns dos marcadores mais usados em estudos populacionais na ictiofauna pertencem ao genoma mitocondrial (mtDNA). Dentre as regiões mitocondriais, temos o gene Citocromo b, que codifica a síntese de uma enzima presente na cadeia respiratória do processo de respiração celular que ocorre na mitocôndria (Quinn 1994), sendo um marcador bastante utilizado devido à presença de regiões conservadas e variáveis (Avisé 2009), tanto para abordagens genéticas populacionais, como para identificação específica de táxons.

(Hebert et al. 2003), propuseram um sistema de bioidentificação molecular global baseado em uma sequência específica de DNA, um fragmento da porção 5' do gene mitocondrial Citocromo oxidase C, subunidade I (COI). Este marcador foi escolhido como gene padrão para o DNA *barcode* por possuir sequência conservada o suficiente para o desenvolvimento de iniciadores com ampla aplicabilidade em diversos grupos de organismos, além de excelentes resultados para discriminar espécies, com variação intraespecífica máxima bastante inferior quando comparada aos valores mínimos de distância interespecífica, para a maioria das comparações, especialmente considerando a ictiofauna (Ward et al. 2005).

1.6.1. Estudos genéticos com Potamotrygonídeos

Nos últimos anos, a crescente disponibilidade de sequências de DNA está possibilitando o aumento de estudos genéticos com diversas ordens, como os Myliobatiformes.

Análises (Frederico et al. 2012) com a espécie *Paratrygon aiereba*, que é uma das três espécies da família que possui uma ampla distribuição, indicaram um possível complexo de espécies para este táxon, sugerindo restrições ao fluxo gênico ao longo dos rios, e ainda, que as populações dos rios Negro, Solimões-Amazonas e Xingu possuem reduzida diversidade genética. Em vista disso medidas de conservação para esta espécie

devem ser tomadas em nível local, considerando cada rio separadamente, ao invés de empregar escalas regionais maiores.

O trabalho de (Toffoli et al. 2008) relata que a aplicação da metodologia do DNA *barcode* em Potamotrygonidae é válida para designar espécimes às respectivas espécies, com exceção do complexo *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*, que compartilham haplótipos, portanto não são monofiléticas, o que pode estar relacionado ao compartilhamento incompleto de linhagens ou devido à hibridização introgressiva. As divergências intraespecíficas são tão grandes quanto as divergências interespecíficas e também excedem o limite sugerido de 2% de divergência (Toffoli et al. 2008).

(Pereira et al. 2013) testaram a eficácia da ferramenta do DNA *barcode* em um compilado com mais de 254 espécies de água doce neotropical, dentre essas, duas espécies da família Potamotrygonidae, confirmando a eficácia da metodologia em uma fauna recentemente irradiada e megadiversa. O poder das sequências do código de barras para identificar espécies, mesmo com baixa divergência interespecífica como no caso de *P. motoro* e *P. falkneri*, nos dá uma ideia da distribuição de divergência genética intra-específica. Os resultados também revelaram divergências genéticas ocultas sugestivas de isolamento reprodutivo e especiação críptica em algumas espécies.

Quanto a trabalhos visando a identificação mais apurada das espécies do Xingu, não há registros na literatura sobre análises já realizadas, apesar da importância que as espécies possuem tanto no cenário pesqueiro, quanto bioecológico. Além disso, para a Bacia do Xingu há uma necessidade de estudos de caracterização molecular de espécies da ictiofauna, já que existem evidências da ocorrência de complexos de espécies para alguns táxons.

1.7. Justificativa

Potamotrygon leopoldi é um peixe ornamental que possui grande valor no comércio exterior, tornando-se um dos peixes mais caros utilizados em aquarofilia (Duncan et al. 2010; Ramos et al. 2015), com distribuição restrita à bacia do rio Xingu e seus afluentes (Carvalho et al. 2003). Vale ressaltar que já foram realizados trabalhos sobre toxicidade do veneno (Kirchhoff et al. 2014) e caracterização com a ferramenta DNA *barcode* (Toffoli et al. 2008).

Observa-se uma variação morfológica da *P. leopoldi* ao longo de sua área de distribuição, podendo observar padrões de coloração: i) Dorso preto com bolas brancas e

ii) Dorso preto com manchas brancas em formas de anéis completos/incompletos em forma de letras, conhecida pela população como ‘raia de letra’, sendo de extrema importância a utilização de ferramentas moleculares para uma melhor compreensão da história evolutiva dessa espécie, fazendo com que assim seja possível entender a variação existente na mesma.

Além disso, as demais espécies da família, que ocorrem no rio Xingu, têm mostrado problemas diante da ampla distribuição geográfica e tendência à subestruturação populacional. Muitas dessas espécies são complexos de espécies ou espécies crípticas, o que dificulta o entendimento sobre a real diversidade neste táxon, tornando pertinente a utilização da ferramenta do DNA *Barcode* para uma caracterização molecular precisa e eficiente a fim de gerar informações capazes de auxiliar programas de manejo e conservação para arraias de água doce, de acordo com o que está sendo exportado ou em quais áreas estão sendo pescadas e quais espécies é permitido vender (Frederico et al. 2012).

Portanto, no presente trabalho, investigamos a partir de marcadores do genoma mitocondrial (Cytocromo b e COI *barcode*), a caracterização molecular das espécies de arraias de água doce ocorrentes no rio Xingu.

Objetivos

1.8.1. Objetivo Geral

- ✓ Delimitar espécies de arraias de água doce na bacia do rio Xingu através de ferramentas moleculares.

1.8.2. Objetivos Específicos

- ✓ Discriminar espécies de arraias de água doce do rio Xingu;
- ✓ Comparar diferentes abordagens e variáveis metodológicas na delimitação das espécies de arraias;
- ✓ Descrever os níveis de distância genética intra e interespecífica a partir de sequências mitocondriais.

Literatura Citada

- Allendorf, Fred W., Paul A. Hohenlohe, and Gordon Luikart. 2010. "Genomics and the Future of Conservation Genetics." *Nature Reviews Genetics* 11(10):697–709. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2844>).
- Almeida, M. P., P. M. O. Lins, P. Charvet-Almeida, and R. B. Barthem. 2010. "Diet of the Freshwater Stingray *Potamotrygon Matoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil)." *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia* 70(1):155–62.
- Awise, J. C. 2009. "Phylogeography: Retrospect and Prospect." *Journal of Biogeography* 36(1):3–15.
- Bertorelle, Giorgio, Michael W. Bruford, Heidi C. Hauffe, and Annapaola Rizzoli. 2003. "Population Genetics for Animal Conservation Cristiano Vernesi Frontmatter More Information Population Genetics for Animal Conservation © Cambridge University Press Cambridge University Press 978-0-521-86630-9 - Population Genetics for." *Ecologia*.
- Böhlke, JE, SH Weitzman, and NA Menezes. 1978. "Estado Atual Da Sistemática Dos Peixes de Água Doce Da América Do Sul." *Acta Amazônica* 8(4):657–77. Retrieved (<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=E-LIM.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=007060>).
- Buckup, P. a, N. a Menezes, and M. S. Ghazzi. 2007. *Catálogo Das Espécies de Peixes de Água Doce Do Brasil*.
- Camargo, Maurício, Tommaso Giarrizzo, and Victória Judith Isaac. 2004. "Review of the Geographic Distribution of Fish Fauna of the Xingu River Basin, Brazil." *Ecotropia* 10:123–47.
- Carvalho, M. R., N. R. Lovejoy, and R. S. Rosa. 2003. "Potamotrygonidae (River Stingrays)." P. 729 in *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre.
- Carvalho, Marcelo R. D. E. and Nathan R. Lovejoy. 2011. "Morphology and Phylogenetic Relationships of a Remarkable New Genus and Two New Species of

- Neotropical Freshwater Stingrays from the Amazon Basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).” *Zootaxa* 2776:13–48.
- Carvalho, Marcelo R. de and Maira P. Ragno. 2011. “An Unusual, Dwarf New Species of Neotropical Freshwater Stingray, Plesiotrygon Nana Sp. Nov., from the Upper and Mid Amazon Basin: The Second Species of.” *Papéis Avulsos de Zoologia* 51(7):101–38. Retrieved (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0031-10492011000700001&script=sci_arttext&tlng=pt).
- Carvalho Júnior, Jaime Ribeiro et al. 2009. “Sobre a Pesca De Peixes Ornamentais Por Comunidades Do Rio Xingu, Pará-Brasil: Relato De Caso.” *Boletim Do Instituto de Pesca* 35(3):521–30.
- Charvet-Almeida, P., PMO Lins, and MP Almeida. 2008. “Diet Composition of the Whiptail Stingray *Dasyatis Colarensis* Santos, Gomes & Charvet-Almeida, 2004 (Chondrichthyes: Dasyatidae) in the Colares Island Region, Para, Brazil. AN - 1323813164; 17832317.” *Arquivos de Ciencias Do Mar* 41(2):29–33. Retrieved (http://search.proquest.com/docview/1323813164?accountid=27991%5Cnhttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:asfabiological&atitle=Diet+composition+of+the+whiptail+s).
- Charvet-Almeida, Patricia, Maria Lúcia Góes de Araújo, and Mauricio Pinto de Almeida. 2005. “Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Patamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin.” *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 35(February):165–71.
- Cruz, V. P. et al. 2014. “First Identification of Interspecies Hybridization in the Freshwater Stingrays *Potamotrygon Motoro* and *P. Falkneri* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae).” *Conservation Genetics* 16(1):241–45.
- Duncan, Wallace Paxiuba, Sandrelly Oliveira Inomata, and Marisa Narciso Fernandes. 2010. “Comércio de Raias de Água Doce Na Região Do Médio Rio Negro, Estado Do Amazonas, Brasil.” *Rev. Bras. Eng. Pesca* 5(2):13–22.
- Dunn, Katherine A., John D. McEachran, and Rodney L. Honeycutt. 2003. “Molecular Phylogenetics of Myliobatiform Fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with

- Comments on the Effects of Missing Data on Parsimony and Likelihood.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27(2):259–70.
- Espurt, Nicolas et al. 2009. “The Nazca Ridge and Uplift of the Fitzcarrald Arch: Implications for Regional Geology in Northern South America.” (2007).
- Filho, Getulio Rincon. 2006. “ASPECTOS TAXONÓMICOS, ALIMENTAÇÃO E REPRODUÇÃO DA RAIA DE ÁGUA DOCE *Potamotrygon* (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE) NO RIO Orbignyi (CASTELNAU) (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE) NO RIO PARANÁ-TOCANTINS.” 145.
- Fontenelle, João Pedro and Marcelo R. De Carvalho. 2017. *Systematic Revision of the *Potamotrygon Scobina* Garman, 1913 Species-Complex (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with the Description of Three New Freshwater Stingray Species from Brazil and Comments on Their Distribution and Biogeography.*
- Fontenelle, João Pedro, João Paulo C. B. Da Silva, and Marcelo R. De Carvalho. 2014. “*Potamotrygon Limai*, Sp. Nov., a New Species of Freshwater Stingray from the Upper Madeira River System, Amazon Basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).” *Zootaxa* 3765(3):249–68.
- Frederico, Renata G., Izeni P. Farias, Maria Lúcia Góes de Araújo, Patricia Charvet-Almeida, and José A. Alves-Gomes. 2012. “Phylogeography and Conservation Genetics of the Amazonian Freshwater Stingray *Paratrygon Aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).” *Neotropical Ichthyology* 10(1):71–80.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. “Biological Identifications through DNA Barcodes.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512):313–21. Retrieved (<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2002.2218>).
- Hubert, Nicolas et al. 2008. “Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes.” *PLoS ONE* 3(6).

- Kirchhoff, Kim N., Ines Klingelhöfer, Hans Martin Dahse, Gertrud Morlock, and Thomas Wilke. 2014. "Maturity-Related Changes in Venom Toxicity of the Freshwater Stingray *Potamotrygon Leopoldi*." *Toxicon* 92:97–101.
- Van Der Laan, Richard, William N. Eschmeyer, and Ronald Fricke. 2014. *Family-Group Names of Recent Fishes*.
- Lasso, Carlos A., Ricardo S. Rosa, Mónica A. Morales-Betancourt, Domingos Garrone-Neto, and Marcelo Carvalho. 2016. *Rayas de Agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam Y Guayana Francesa: Diversidad, Bioecología, Uso Y Conservación. Serie Recursos Hidrobiológicos Y Pesqueros Continentales de Colomb*.
- Loboda, Thiago Silva and Marcelo Rodrigues de Carvalho. 2013. "Systematic Revision of the *Potamotrygon Matoro* (Müller & Henle, 1841) Species Complex in the Paraná-Paraguay Basin, with Description of Two New Ocellated Species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)." *Neotropical Ichthyology* 11(4):693–737.
- Lovejoy, N. R. 1996. "Systematic of Myliobatoid Elasmobranchs: Whith Emphasis on Phylogeny and Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes)." *Zoological Journal of the Linnean Society* 117:207–57.
- Lovejoy, Nathan R., Eldredge Bermingham, and Andrew P. Martin. 1998. "Marine Incursion into South America."
- Mabragaña, Ezequiel, Juan Martín Díaz de Astarloa, Robert Hanner, Junbin Zhang, and Mariano Castro. 2011. "DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters." *PLoS ONE* 6(12):1–11.
- Marques, Fernando P. L. 2000. "EVOLUTION OF NEOTROPICAL FRESHWATER STINGRAYS AND THEIR."
- Mejía, Omar, Yatzil León-Romero, and Eduardo Soto-Galera. 2012. "DNA Barcoding of the Ichthyofauna of Pánuco-Tamesí Complex: Evidence for Taxonomic Conflicts in Some Groups." *Mitochondrial DNA* 23(6):471–76.

- de Oliveira Ribeiro, Amanda et al. 2012. "DNA Barcodes Identify Marine Fishes of São Paulo State, Brazil." *Molecular Ecology Resources* 12(6):1012–20.
- Pereira, Luiz H. G., Robert Hanner, Fausto Foresti, and Claudio Oliveira. 2013. "Can DNA Barcoding Accurately Discriminate Megadiverse Neotropical Freshwater Fish Fauna?" *BMC Genetics* 14:1–14.
- Pons, Joan et al. 2006. "Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects." *Systematic Biology* 55(4):595–609.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet, and G. Achaz. 2012. "ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation." *Molecular Ecology* 21(8):1864–77.
- De Queiroz, Kevin. 2007. "Species Concepts and Species Delimitation." *Systematic Biology* 56(6):879–86.
- Quinn, Thomas P. 1994. "Shortcomings of the Cytochrome B Gene as a Molecular Marker." (January 1994):0–2.
- Ramos, Fm, Mlg Araújo, G. Prang, and Ry Fujimoro. 2015. "Ornamental Fish of Economic and Biological Importance to the Xingu River." *Brazilian Journal of Biology* 75(3):95–98.
- Reis, R. E. et al. 2016. "Fish Biodiversity and Conservation in South America." *Journal of Fish Biology* 89(1):12–47.
- Rosa, R. .. 1985. "A Systematic Revision of the South American Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae." *Unpubl. Phd. Diss., The College of William and Mary, Virginia*.
- Rosa, R. S., P. Charvet-Almeida, and C. C. D. Quijada. 2010. "Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays." Pp. 241–86 in *Sharks and their relatives II: Biodiversity, adaptive physiology and conservation*.
- Rosa, Ricardo S., Marcelo R. De Carvalho, and C. D. A. Wanderley. 2008. "Potamotrygon Boesemani (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a New Species of Neotropical Freshwater Stingray from Surinam." *Neotropical*

Ichthyology 6(1):1–8.

- Shibuya, Akemi, Jansen Zuanon, and Sho Tanaka. 2012. “Feeding Behavior of the Neotropical Freshwater Stingray *Potamotrygon Motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae).” *Neotropical Ichthyology* 10(1):189–96.
- da Silva, João Paulo C. B. and Marcelo R. de Carvalho. 2011. “A Taxonomic and Morphological Redescription of *Potamotrygon Falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae).” *Neotropical Ichthyology* 9(1):209–32.
- Silva, João Paulo Capretz Batista. 2009. “Revisão Taxonômica E Morfológica Do Complexo *Potamotrygon Orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae).”
- Silva, Juliana De Paula. 2012. “Avaliação Da Diversidade de Padrões de Canais Fluviais E Da Geodiversidade Na Amazônia - Aplicação E Discussão Na Bacia Hidrografica Do Rio Xingu.” 277.
- Steiner, Cynthia C., Andrea S. Putnam, Paquita E. A. Hoeck, and Oliver A. Ryder. 2013. “Conservation Genomics of Threatened Animal Species.” *Annual Review of Animal Biosciences* 1(1):261–81. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-031412-103636>).
- Toffoli, Daniel et al. 2008. “A Test of the Utility of DNA Barcoding in the Radiation of the Freshwater Stingray Genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes).” *Genetics and Molecular Biology* 31(1 SUPPL. 1):324–36.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last, and P. D. N. Hebert. 2005. “DNA Barcoding Australia’s Fish Species.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462):1847–57. Retrieved (<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2005.1716>).
- Ward, Robert D. 2009. “DNA Barcode Divergence among Species and Genera of Birds and Fishes.” *Molecular Ecology Resources* 9(4):1077–85.
- Winemiller, K. O. 1989. “Patterns of Variation in Life History among South American

Fishes in Seasonal Environments.” *Oecologia* 225–41.

Zhang, Jiajie, Paschalia Kapli, Pavlos Pavlidis, and Alexandros Stamatakis. 2013. “A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements.” *Bioinformatics* 29(22):2869–76.

Artigo 1

**DNA mitocondrial revela indícios de Especiação e Hibridização em Arraias
(POTAMOTRYGONIDAE: MYLIOBATIFORMES) da Bacia do rio Xingu**

DNA mitocondrial revela indícios de Especiação e Hibridização em Arraias (POTAMOTRYGONIDAE: MYLIOBATIFORMES) da Bacia do rio Xingu

RESUMO

Neste estudo foram abordados três métodos de delimitação de espécies em duas regiões mitocondriais em um grupo de cinco espécies de arraias de água doce (*Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi* e *Paratrygon aiereba*), demonstrando uma grande associação entre haplótipos e distribuição geográfica dessas espécies, com replicação de coloração do dorso em diferentes ramos das árvores de agrupamento de vizinhos, máxima verossimilhança e inferência bayesiana. A comparação entre o DNA mitocondrial Cyt b e COI mostrou que a região *Barcode* é mais adequada para discriminar espécies. Nossos resultados demonstram compartilhamento de haplótipos e associação a distribuição geográfica dessas espécies, com replicação de coloração do dorso em diferentes ramos das árvores de agrupamento de vizinhos, máxima verossimilhança e inferência bayesiana, indicando um possível caso de hibridização entre *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P. scobina* no rio Xingu. A comparação entre o DNA mitocondrial Cyt b e COI mostrou que a região *Barcode* é mais adequada do que Cyt b, sendo eficiente em discriminar espécimes as suas respectivas espécies e também indicando especiação em *Paratrygon*. O método GMYC utilizando sequências de COI, mostrou ser mais sensível que os outros métodos, separando as espécies em seus respectivos grupos.

Palavra-chave: Cyt b, DNA *barcode*, ABGD, GMYC, PTP, arraia de água doce.

ABSTRACT

In this study three methods of species delimitation in two mitochondrial regions were studied in a group of five freshwater ray species (*Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi* and *Paratrygon aiereba*), demonstrating a great association between haplotypes and geographic distribution of these species, with replication of back dyeing in different branches of neighbors clustering trees, maximum likelihood and Bayesian inference. The comparison between mitochondrial DNA Cyt b and COI showed that the Barcode region is more suitable to discriminate species. Our results demonstrate haplotype sharing and the association of the geographic distribution of these species, with replication of back dyeing in different branches of neighbors clustering trees, maximum likelihood and Bayesian inference, indicating a possible case of hybridization between *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P.* in the Xingu River. The comparison between mitochondrial DNA Cyt b and COI showed that the Barcode region is more adequate than Cyt b, being efficient in discriminating specimens from their respective species and also indicating speciation in *Paratrygon*. The GMYC method using COI sequences showed to be more sensitive than the other methods, separating the species in their respective groups.

Key words: Cyt b, DNA barcoding, ABGD, GMYC, PTP, freshwater stingray.

INTRODUÇÃO

A família das arraias de água doce, Potamotrygonidae, abriga atualmente 32 espécies válidas, organizadas em quatro gêneros: *Paratrygon* Duméril (1865), gênero monoespecífico; *Potamotrygon* Garman (1877), com 27 espécies, *Pleisiotrygon* Rosa, Castello & Thorson (1987) e *Heliotrygon* Carvalho & Lovejoy (2011) com duas espécies descritas cada (Fontenelle and De Carvalho 2017). Apresenta distribuição restrita ao longo dos rios da América do Sul que deságuam no Caribe e Atlântico, com exceção da bacia do rio São Francisco e drenagens costeiras a oeste e sul do rio Parnaíba (Rosa, Charvet-Almeida, and Quijada 2010), sendo algumas espécies endêmicas de uma única bacia hidrográfica, como *Potamotrygon leopoldi* do rio Xingu, *P. falkneri* do rio Paraná, *P. henlei* e *P. rex* do rio Tocantins, *P. wallacei* do rio Negro, *P. signata* do rio Parnaíba, e *P. magdalenae* presente apenas na Colômbia. Por outro lado, outras espécies apresentam ampla distribuição geográfica, como *P. motoro*, *P. orbignyi* e *Paratrygon aiereba*, ocorrendo desde a bacia do rio Orinoco, na Venezuela, passando pela bacia do rio Amazonas até o sistema de La Plata, na Argentina e no Uruguai (Lasso et al. 2016; Rosa 1985).

Algumas dessas espécies possuem acentuada importância econômica no cenário internacional, sendo bastante apreciadas no comércio de peixes ornamentais (Duncan, Inomata, and Fernandes 2010). No rio Xingu, a pesca ornamental é a principal forma de exploração deste recurso, com relatos de famílias que trabalham com esta atividade há mais de 35 anos. O crescente interesse de empresas para a exploração desses recursos tem demandado uma forma de organização mais eficiente, com a determinação de cota/pesca de arraias por ano. Isso tem estimulado os órgãos competentes para a elaboração de critérios mais eficazes e sustentáveis para a distribuição dessas cotas (IBAMA 2015), especialmente considerando que o grupo possui características de espécies *K*-estrategistas, sendo mais vulneráveis à sobre-exploração (Martin 2005). Daí a necessidade de se reconhecer de forma acurada a diversidade do grupo, além de garantir que não seja subestimada ou extinta antes mesmo de ser descrita.

A carência de estudos com esses táxons pode contribuir para agravar este cenário, já que análises sobre demografia e dinâmica populacional ainda são escassas, além disso, algumas dessas espécies ornamentais são endêmicas de apenas uma bacia, como *P. wallacei* do rio Negro, que por muitos anos foi exportada como *Potamotrygon sp.* e *P. leopoldi* do rio Xingu, onde foi construída a hidrelétrica de Belo Monte, com alterações

no curso do rio e modificações de habitat, o que pode ter afetado sua distribuição. Por isso, torna-se necessário a utilização de ferramentas moleculares robustas que visem a identificação correta dessas arraias de água doce, afim de contribuir para um controle realmente efetivo sobre a exportação das espécies, gerando subsídios para a manutenção sustentável dos estoques e conseqüentemente deste comércio.

Além de tudo isso, Potamotrygonidae ainda é um grupo de sistemática mal resolvida, experimentando recentes revisões taxonômicas, associadas a complexos de espécies existentes no grupo (Filho 2006; Fontenelle and De Carvalho 2017; Loboda and Carvalho 2013; Silva 2009), e ao alto grau de policromatismo entre alguns indivíduos, com diferentes padrões de coloração observados para a mesma espécie (Almeida et al. 2008; Charvet-Almeida, Lins, and Almeida 2008; Filho 2006; Lasso et al. 2016), características que podem comprometer uma identificação morfológica acurada e precisa, podendo gerar inúmeros prejuízos, com influência direta na sustentabilidade dos recursos, mascarando o verdadeiro *status* de alguns estoques, com efeitos também na manutenção do comércio dessas espécies na região.

Como já mencionado, para grupos com acentuada relevância econômica, como as arraias Potamotrygonidae, e também como forma de subsidiar o gerenciamento pesqueiro, torna-se fundamental uma identificação segura dos táxons, sendo necessária a utilização de outras fontes de informação, além da morfologia.

A última década foi marcada por expressivos avanços na área de Biologia Molecular, com o aprimoramento de diversos métodos de identificação de espécies baseados em marcadores de DNA, especialmente regiões do genoma mitocondrial (Guimarães-Costa et al. 2017, 2016; de Oliveira et al. 2014) como a ferramenta do DNA *Barcode* (Hebert et al. 2003; Pereira et al. 2013; Ruocco et al. 2014; Toffoli et al. 2008).

Um fragmento do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase, subunidade I (COI) foi escolhido como marcador padrão para o DNA *Barcode* por possuir sequências conservadas, permitindo aplicar em diversos organismos e discriminar espécies, tanto relacionando espécimes de identificação taxonômica desconhecida a uma determinada espécie ou até mesmo para descobrir novas espécies, se mostrando bastante eficiente para discriminar espécies de peixes (Hebert et al. 2003; Pereira et al. 2013; Ward et al. 2005).

Outra região bastante utilizada na identificação molecular de peixes tem sido o gene Citocromo b, com inúmeros trabalhos demonstrando sua eficiência (Chen et al. 2013; Palacios-barreto et al. 2017). No caso das arraias de água doce, esta região mitocondrial já foi utilizada em trabalhos de identificação de espécies (Toffoli et al. 2008), de

filogeografia de *Paratrygon aiereba* (Frederico et al. 2012) e para sugerir casos de hibridização entre *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Cruz et al. 2014; Pereira et al. 2013).

Portanto, considerando a relevância dos potamotrigonídeos nos cenários pesqueiro e econômico na Bacia do rio Xingu, os complexos padrões policromáticos dentro das espécies e alta similaridade morfológica entre alguns táxons, o presente estudo teve como principal objetivo utilizar marcadores do genoma mitocondrial para identificar espécies dos gêneros *Potamotrygon* e *Paratrygon*, utilizando diferentes métodos de delimitação, discutindo, além da eficiência das regiões genômicas, a possibilidade de especiação dentro do grupo e hibridização.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram obtidos 161 indivíduos das respectivas espécies: *Potamotrygon leopoldi* (102); *Potamotrygon orbignyi* (26); *Potamotrygon motoro* (11); *Potamotrygon scobina* (10); quatro *Potamotrygon sp1*; quatro *Potamotrygon sp2* e quatro *Paratrygon aiereba*. As amostras foram coletadas ao longo da bacia do rio Xingu, sendo 20 localidades na calha principal, uma no Rio Bacajá (tributário da margem direita) e outra no rio Iriri (tributário da margem esquerda) (**Figura 1**). Os espécimes foram coletados por meio de espinhel de fundo, em média com 25 anzóis durante a cheia do rio, e durante a seca, com a combinação da técnica de puçá com espinhel.

Os indivíduos foram medidos, fotografados e identificados com base em dados morfológicos, consultando a literatura especializada (Filho 2006; Fontenelle and De Carvalho 2017; Loboda and Carvalho 2013; Lobota 2016; Rosa 1985; Silva 2009). Após o procedimento de coleta de tecido, os espécimes foram devolvidos com vida ao local que foram coletados, tendo o cuidado de verificar a cada nova coleta se o indivíduo já havia sido manipulado, para isso, foi determinado retirar o tecido muscular de apenas um local, na área da nadadeira pélvica.

O material biológico foi acondicionado em tubos criogênicos com álcool (95%) e armazenadas em refrigerador para os procedimentos laboratoriais subsequentes.

Procedimentos Laboratoriais

O material genético foi isolado por meio do kit comercial *Wizard Genomic-PROMEGA*, seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA obtido foi visualizada através de eletroforese submarina em gel de agarose concentrado a 1% corado com gel red, submetido a luz UV.

O fragmento do gene Cyt b foi isolado e amplificado usando os iniciadores FishCytbF (ACCACCGTTGTTCAACTACAAGAAC) e TrueCytbR (CCGACTTCCGGATTACAAGACCG) (Sevilla et al. 2007) através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com 15µL de volume final, sendo 2,5µL de DNTTP (1,25mM), 1,5µL de tampão (10x), 0,6µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,6µL de cada iniciador (50ng/µL), aproximadamente 100ng (1µL) de DNA total, 0,1µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água purificada para completar o volume final da reação. As seguintes condições de amplificação foram utilizadas: desnaturação inicial a 95°C a 4 segundos, desnaturação 95°C por 30s, hibridização a 54°C por 40s e extensão a 72°C a 90s, repetido por 35 ciclos, seguidos de uma extensão final a 72° por 5 minutos.

Os iniciadores COIFishF1 (TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC) e COIFishR1 (TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA) (Ward et al. 2005) foram usados para amplificação da região COI *Barcode*, utilizando as mesmas condições de PCR descritas para a Cytb, com o seguinte perfil de temperatura: desnaturação inicial a 95°C a 3segundos, desnaturação a 95°C por 30s, hibridização a 56°C por 45s, extensão a 72°C a 60s, repetidos por 35 ciclos e com extensão final a 72°C por 3m.

Após as PCRs, as amostras positivas foram purificadas com PEG (Polietileno Glicol) de acordo com protocolo descrito por Paithankar and Prasad (1991) e submetidas à reação de sequenciamento, realizado pelo método didesoxiterminal (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977) com reagentes do Kit *Big Dye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – PE Applied Biosystems)*. O produto precipitado foi submetido à eletroforese no sequenciador automático de capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

Banco de Dados

As sequencias de DNA obtidas foram editadas e alinhadas utilizando o programa BioEdit (Hall 1999), sendo o alinhamento automático realizado no aplicativo

CLUSTALW (Thompson, Higgins, and Gibson 1994), implementado neste programa. Foram construídas duas bases de dados, considerando cada marcador utilizado. Os sítios polimórficos e as possíveis mutações espécie específicas foram visualizados no programa MEGA v7.0 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016), assim como os códons de parada. Para auxiliar no processo de identificação das amostras, foi realizada a caracterização dos haplótipos (identificação do número e frequência) no programa DNasp (Librado and Rozas 2009).

Inferências Filogenéticas e Identificação de Espécies

Foram construídas árvores de Agrupamento de Vizinhos, utilizando o modelo Kimura 2 Parâmetros (K2P) (Kimura 1980) no programa MEGA v7.0 (Kumar et al. 2016) a fim de direcionar a subdivisão das amostras em grupos/táxons, para o cálculo da distância genética corrigida (modelo K2P). O suporte estatístico dos nós da árvore foi obtido a partir de 1.000 pseudoréplicas de *Bootstrap*. Calculou-se a média da distância entre espécies (grupo) e intraespecífica, para avaliar a presença de *Barcode gap*.

No programa BEAST (Drummond et al. 2018; Drummond and Rambaut 2007) foi gerada uma árvore de Inferência Bayesiana, lida utilizando o Programa R, com o pacote Splits. Foi usado o modelo de relógio relaxado log normal não correlacionado para todos os marcadores empregados neste estudo. O processo de Yule foi usado como *prior* da árvore de espécies e foi realizada uma corrida independente de 5×10^7 de gerações com os parâmetros amostrados a cada 5000 gerações. Os arquivos log foram inspecionados no Tracer v1.5 (Rambaut and Drummond 2009) para avaliar a convergência da cadeia, *mixing* adequado e comprimento do *burn-in*.

As Árvores de máxima verossimilhança (ML) (Pons et al. 2006) utilizando os genes COI e Cytb, foram construídas utilizando-se o programa RAxML v.8.29 (Stamatakis 2014). Os modelos de substituição de nucleotídeos que melhor se adaptaram aos conjuntos de dados foram escolhidos usando o critério de informação Akaike (AIC) e o programa jModelTest 0.1.10 (Darriba et al. 2012; Posada 2008). Os modelos escolhidos foram os seguintes: HKY+I (Hasegawa 1985) para o COI e TrN+I (Tamura and Nei 1993), para o Cytb.

As espécies *Himantura pacífica* (AF110638; Lovejoy, Bermingham, and Martin 1998) e *Himantura chophraya* (KX668133; (Khudamrongsawat, Bhummakasikara, and Chansue 2017), do gênero considerado grupo-irmão de Potamotrygonidae (Dunn,

McEachran, and Honeycutt 2003; Lovejoy 1996; Lovejoy et al. 1998) foram utilizadas como grupo externo para as análises com Cytb, juntamente com sequências de *Potamotrygon motoro* (JN020050), *P. orbignyi* (AF110625; Lovejoy et al. 1998) e *Paratrygon aiereba* (AF110629; Lovejoy et al. 1998) oriundas de outras bacias. Para as análises com COI, *Himantura uarnak* (NC_028325; Shen et al. 2015) foi inserida como grupo externo, além de *Potamotrygon motoro* (JN989157), *P. falkneri* (JN989145) (Pereira et al. 2013) e *Paratrygon aiereba* (KX688093; Kirchhoff et al. 2014) também de outras bacias.

Delimitação de Espécies

Foram utilizadas diferentes abordagens para delimitação de espécies considerando métodos baseados em árvores e teoria de coalescência ou distância genética, descritos a seguir:

Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD): Foi utilizada a versão web do ABGD disponível em < <http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> > . Este método foi empregado com base nos dados do Cytb e COI. Como os chamados métodos baseados em limiar de similaridade são altamente sensíveis ao limiar fornecido, foram utilizados os valores de Pmax (0,1). Todas as análises foram feitas usando distâncias simples (p). Foram usados dois valores de largura relativa do gap ($X = 0,2$) e o restante foi deixado como padrão. Para os resultados, foram consideradas as quatro primeiras partições geradas pelo programa.

Generalized Mixed Yule-Coalescent (GMYC): O GMYC requer como *input* uma árvore ultramétrica. Utilizou-se o modelo “*single threshold*” ($-\log ML = 434,24$), pois foi o que melhor se adequou aos dados. Foi utilizada uma árvore de gene estimada pelo programa BEAST v1.8.0 (Drummond et al. 2005; Drummond and Rambaut 2007), que foi rodado por 50 milhões de gerações e uma árvore amostrada a cada 5000 gerações, sob o modelo de substituição TrN + I, o modelo lognormal (não correlacionado) de relógio relaxado. Foi feita a análise com idade dos nós das árvores com processo de Yule. A convergência da cadeia foi avaliada no Tracer v1.6 ou através da inspeção dos gráficos e valores de ESS (*Effective Sampling Size*). A convergência da corrida foi considerada adequada com ESS acima de 2500. Por fim, as árvores amostradas foram sumarizadas no programa TreeAnnotator v1.8.0 usando um *burn-in* de 2500. Em seguida, o método

GMYC foi rodado no ambiente R através do pacote *splits* (Ezard, Fujisawa, and Barraclough 2014). As análises foram realizadas testando as opções *single* e *multiple threshold*.

Poisson Tree Process (PTP): Foi utilizada como *input*, uma árvore de gene baseada no Cyt b e outra no COI estimada usando o método de máxima verossimilhança pelo programa RAxML v.8.29 sob o modelo GTR GAMMA e um total de 10 réplicas. Foi também utilizada, como *input*, uma árvore baseada em distância genética simples (p), estimada pelo método de agrupamento de vizinhos no programa MEGA v7.0 (Kumar et al. 2016). As corridas foram realizadas através do servidor web bPTP disponível em <<http://species.h-its.org/ptp/>>. A análise foi submetida deixando as condições padrão do programa.

RESULTADOS

Caracterização dos Bancos de Dados

Considerando as cinco espécies deste estudo, obteve-se conjuntos de dados de 116 sequências para Cytb e 117 sequências para COI. O comprimento, após alinhamento e edição, para o gene Cytb foi de 670pb, observando a presença de 81 sítios polimórficos. Para o COI, o comprimento do banco alinhado foi de 500pb e com 75 sítios polimórficos. Para ambos os marcadores, não houve a presença de códons de parada. Na **Tabela 1**, é exibido, para cada espécie, o número de indivíduos sequenciados por marcador, bem como, o número de haplótipos total em cada espécie, assim como a identificação baseada em morfologia para cada indivíduo.

Dos 116 indivíduos sequenciados para o Cytb, foram observados 23 haplótipos, sendo o mais frequente compartilhado por 19 indivíduos de *P. leopoldi*. *Potamotrygon orbignyi* foi a espécie que apresentou uma maior variação no número de haplótipos, nove, sendo o Hap 12 mais frequente para esta espécie e também compartilhado com *P. scobina*.

Das 117 sequências de COI, 18 haplótipos foram identificados, com a espécie *Potamotrygon leopoldi* apresentando maior variação, com oito haplótipos, sendo o Hap 2 o mais frequente, compartilhado por 38 indivíduos, seguido pelo Hap 1, observado em 19 indivíduos. Os demais haplótipos apresentaram frequência inferior a 12 ou foram únicos. O haplótipo 9 foi compartilhado por 11 espécimes, incluindo representantes de *P. motoro*

e *P. orbignyi*, além de indivíduos *Potamotrygon* sp., da mesma forma como ocorreu com o hap 11, presente em indivíduos de *P. scobina* e *P. orbignyi*.

Identificação Molecular e Delimitação de Espécies

As árvores de Agrupamento de Vizinhos considerando as regiões mitocondriais utilizadas, geraram arranjos bastante similares, como mostrado na **Figura 2**. A topologia observada reuniu as espécies em diferentes grupos, sem obedecer, em alguns casos, a prévia identificação morfológica dos táxons, com diferentes espécies no mesmo grupo, ou haplótipos da mesma espécie em grupos diferentes, como aconteceu com *P. orbignyi* e *P. scobina*. Os gêneros de Potamotrygonidae estiveram sempre separados do grupo externo e separados entre si. As espécies de *Potamotrygon* foram todas reunidas em um único clado, fortemente suportado, separadas de *Paratrygon*, que apesar de ser considerado monotípico, apresentou haplótipos divergentes.

Os grupos observados, tanto para COI como para Cytb, foram em sua maioria, concordantes. Considerando a topologia obtida com o fragmento do gene Cytb, o primeiro grupo abrigou as espécies *P. leopoldi*, *P. orbignyi* e *P. scobina*, além dos indivíduos identificados apenas como *P. sp2.*, representadas por 14 haplótipos, e com uma média de distância intraespecífica de 0,4%. Um segundo grupo reuniu apenas os três haplótipos de *P. motoro*, retirados do banco público de sequências (Genbank), que não agrupou com os indivíduos identificados morfológicamente como *P. motoro* da bacia do Rio Xingu, reunidos todos em um terceiro grupo, juntamente com espécimes de *P. orbignyi*, *P. scobina* e os demais *P. sp1*, apresentando uma média de distância intraespecífica de 0,5%. Para o quarto grupo, considerou-se apenas o haplótipo de *P. orbignyi*, retirado do genbank. O grupo cinco reuniu os haplótipos de *P. aireba*, incluindo o representante do genbank, com uma média de divergência entre indivíduos de 2%. E por fim, as espécies do gênero *Himantura*, utilizadas para enraizar a árvore, chamadas de grupo seis.

No caso do COI, os arranjos foram concordantes, com exceção dos indivíduos de *P. scobina* que estiveram separados de *P. leopoldi* e *P. motoro*, agrupando apenas com *P. orbignyi*, com quem compartilhou haplótipos.

Essa mistura de indivíduos de diferentes espécies também foi observada nos resultados dos diferentes testes de delimitação. As análises do ABGD usando $P_{max} = 0,20$ e $P_{max} = 0,10$ produziram resultados parecidos quando a amplitude relativa do gap (X) foi igual a 2,0. Em ambos os casos, COI e Cyt b, (**Figura 3; Figura 4**), a análise

resultou em quatro partições e quatro grupos. Um grupo reuniu *P. leopoldi*-*P. orbignyi*, outro *P. motoro*-*P. scobina*-*P. orbignyi*, não correspondendo as quatro espécies de *Potamotrygon* de acordo com a identificação morfológica. Somente *Paratrygon*, gênero até então monotípico, foi subdividido em dois grupos distintos, corroborando os grupos prévios observados na topologia de Agrupamento de Vizinhos para o gene COI.

Em relação ao GMYC, os resultados foram diferentes, considerando os dois marcadores mitocondriais. Usando o processo de Yule para a região Cyt b, a delimitação de espécies resultou em quatro grupos coalescentes independentes: (1) *P. motoro*-*P. scobina*-*P. orbignyi*; (2) *P. leopoldi*-*P. scobina*-*P. orbignyi*, e dois grupos distintos de *Paratrygon aiereba* (**Figura 3**) Usando o processo de Yule para a região COI, a delimitação de espécies resultou em cinco grupos: (1) *P. motoro*-*P. scobina*-*P. orbignyi*; (2) *P. scobina*-*P. orbignyi*; (3) *P. leopoldi*; (4) *Paratrygon aiereba*; (5) *Paratrygon aiereba*, resultados que não corresponderam aos grupos de espécies definidos morfológicamente, mas que também divide o gênero monotípico *Paratrygon* (**Figura 4**).

Para o PTP, não houve diferenças nos resultados das análises quando usamos Cyt b ou COI (**Figura 3**; **Figura 4**). Ambos os resultados indicaram a existência de três OTUs, não conseguindo separar as espécies pela morfologia, agrupando *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P. scobina*-*P. leopoldi* em um único grupo, e *Paratrygon* sendo dividido em dois grupos.

Divergência Genética

Avaliando os níveis de divergência genética entre as cinco espécies analisadas, observou-se, considerando o fragmento do gene Cyt b, valores interespecíficos dentro do gênero *Potamotrygon* variando de 0,6%, nas comparações entre *P. leopoldi*-*P. orbignyi* a 1,5% entre *P. motoro*-*P. leopoldi* e *P. motoro*-*P. orbignyi*. Entre o gênero *Paratrygon* e as espécies de *Potamotrygon* os níveis de distância variaram de 9,2% a 9,6%.

Para o COI, a distância média interespecífica dentro de *Potamotrygon* variou de 0,7% nas comparações entre *P. motoro*-*P. scobina* a 2,2% entre *P. motoro*-*P. orbignyi*. As distâncias genéticas entre *Paratrygon* e outras espécies de *Potamotrygon* variaram de 12,7% a 13,9%. A divergência entre os haplótipos de *P. motoro* do rio Xingu e de *P. motoro* do rio Paraná (sequências disponíveis no Genbank) apresentou valores superiores a 2%.

Considerando os grupos observados nas árvores de Agrupamento de Vizinhos, todas as espécies utilizadas como grupo externo foram bastante divergentes dos

Potamotrygonídeos analisados, com valores superiores a 19% em todas as comparações e marcadores utilizados. Os grupos abrigando as diferentes espécies de *Potamotrygon* apresentaram divergências inferiores a 3% e em muitas comparações, inferiores a 2%, como entre o grupo que reuniu *P. leopoldi*-*P. orbignyi* e o grupo *P. motoro* Xingu-*P. scobina*-*P. orbignyi*, não deixando claro um limite interespecífico de distância genética, resultado bastante discordante da morfologia observada.

Nas distancias intraespecíficas para Cyt b, os valores entre os espécimes de *P. motoro* foram menores ou iguais a 0,3%, para *P. leopoldi* foram de 0,2%, *P. scobina*, 0,5%, *P. orbignyi* 0,6% e *Paratrygon aiereba* de 1,5%. Para COI, considerando todas as espécies analisadas, os valores foram inferiores a 0,4%, com exceção dos espécimes de *Paratrygon aiereba*, que apresentaram divergência superior a 1%. Dentro dos grupos, com espécies compartilhando o mesmo haplótipo, as distâncias intraespecíficas foram todas inferiores a 0,5%.

Inferências Filogenéticas

Uma vez que ambas as análises (ML e BI) apresentaram resultados altamente congruentes, gerando os mesmos arranjos, apenas a árvore BI é exibida. Porém, são mostrados os suportes gerados por ambas as análises. O grupo de espécies aqui estudado do gênero *Potamotrygon*, em nossas análises, constituiu um arranjo monofilético, com alto suporte (BI=0,98), porém, as relações entre as espécies não foram bem esclarecidas. Ambas as árvores apontam forte suporte para a relação entre os gêneros *Paratrygon* e *Potamotrygon*, clado que é o grupo irmão dos demais potamotrygonídeos. A linhagem formada pelo clado *Paratrygon* foi monofilética e irmã do gênero *Potamotrygon* (Figura 3).

Indivíduos de *P. orbignyi* coletados à montante de corredeiras no rio Xingu possuem haplótipos mais proximamente relacionados a espécie *P. leopoldi* que ocorre em simpratría, do que os outros indivíduos de *P. orbignyi* coletados no baixo Xingu. Enquanto que *P. orbignyi* e *P. scobina* coletados no baixo Xingu compartilham haplótipos com a espécie simpátrica *P. motoro* quando considerado o COI e com a espécie *P. leopoldi* quando considerado o Cyt b. Ambos os marcadores sugerem dois grupos de *P. orbignyi*, um do médio Xingu, mais intimamente relacionado com *P. leopoldi* e outro grupo do baixo Xingu compartilhando haplótipos com *P. scobina*.

Em todas as árvores analisadas, os ramos com espécimes de *Paratrygon* apresentam alto suporte (BI=1), formando ramos distintos para aqueles coletados no canal principal do baixo rio Xingu e outro ramo para o espécime coletado no rio Bacajá, afluente situado no médio Xingu, indicando uma possível nova espécie para o gênero.

DISCUSSÃO

Delimitação das Espécies e Indícios de Hibridização

Baseando-se em morfologia, foram incluídas na presente análise cinco espécies de arraia de água doce, distribuídas em dois gêneros, são elas: *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi* e *Paratrygon aiereba*. Utilizando marcadores mitocondriais para a identificação molecular, não foi possível observar uma separação clara entre os diferentes táxons analisados, especialmente considerando as espécies do gênero *Potamotrygon*. Apesar de haver estudos taxonômicos e filogenéticos sobre a família, ainda existem problemas quanto a identificação e a validade de várias espécies, devido principalmente à grande variação intraespecífica de coloração dorsal, caráter classicamente usado para a identificação taxonômica e que se encontra ineficiente para se separar e identificar espécies muito semelhantes, uma vez que a coloração dorsal varia muito dentro de certas espécies.

Diferentes espécies, baseando-se em morfologia, compartilharam o mesmo haplótipo mitocondrial. Por outro lado, os marcadores discriminaram com eficiência os diferentes gêneros e ainda sugeriram uma subdivisão dentro do monotípico *Paratrygon*, além de conseguirem agrupar os indivíduos sem identificação com sua respectiva espécie. O compartilhamento de haplótipos nos possibilitou definir alguns espécimes que não possuíam identificação a nível de espécie, agrupando *P. motoro* com *Potamotrygon* sp.1 e *P. leopoldi* a *Potamotrygon* sp.2, sugerindo a identificação dos mesmos as respectivas espécies.

Como já mencionado, a partir da análise dos haplótipos, observou-se o compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre diferentes táxons, como entre *P. orbignyi* e *P. scobina* e *P. motoro*, sugerindo uma possível hibridização entre essas espécies, já que trazem uma herança mitocondrial de um dos parentais e apresentam morfologia do outro, como já sugerido para outras bacias, como por exemplo na bacia do rio Paraná, onde alguns indivíduos com identificação morfológica de *P. motoro*

compartilham haplótipos do gene Cyt b e COI com *P. falkneri*, então confirmados com dados de microssatélites (Cruz et al. 2014). Outro estudo de hibridização em elasmobrânquios foi encontrado entre duas espécies de tubarões na Austrália, *Carcharhinus tilstoni*-*C. limbatus*, em que a identificação morfológica não era compatível com o DNA mitocondrial, para testar se a hibridização era real, sequenciaram um gene nuclear com mutações específicas das espécies (Morgan et al. 2012).

A divergência entre os haplótipos de *P. motoro* do rio Xingu e de *P. motoro* do rio Paraná (sequências disponíveis no Genbank) apresentou valores superiores a 2%, o que corrobora com a última revisão taxonômica da espécie, em que *P. motoro* é considerada um grupo de espécies, com várias espécies sinônimas distribuídas em diferentes bacias, além de descrever mais duas espécies, *P. pantanensis* e *P. amandae*, que antes eram identificadas como *P. motoro* (Loboda and Carvalho 2013).

Nas abordagens ABGD não houve diferença quanto a região utilizada, Cyt b e COI, em ambas definiram quatro grupos. O método agrupou as quatro espécies de *Potamotrygon* definidas morfolologicamente em apenas dois grupos, enquanto que a espécie até então monotípica de *Paratrygon* foi subdividida em dois grupos.

As análises de GMYC se adequaram melhor utilizando sequencias de COI, onde definiram cinco grupos, apesar de alguns destes não corresponderem as cinco espécies definidas morfolologicamente. Agrupando *P. motoro*-*P. orbignyi*-*P. scobina* em um único grupo, levantando a possibilidade de erros de identificação desses espécimes, sendo todos *P. motoro*. *P. orbignyi*-*P. scobina* em um grupo. *P. leopoldi* foram agrupadas com *P. orbignyi* em um único grupo e *Paratrygon aiereba* em dois grupos distintos correspondente a seu local de coleta.

Nas abordagens de PTP, não houve diferença quanto a região mitocondrial utilizada, ambas definiram três hipóteses de espécies, o que não corrobora com as cinco espécies definidas morfolologicamente neste trabalho. Apesar da confusão para delimitar as espécies dentro de *Potamotrygon*, todos os métodos foram unânimes e fortemente indicaram uma subdivisão dentro do até então, gênero monotípico, *Paratrygon*, sugerindo especiação para a bacia do Rio Xingu.

A distância genética do clado *Paratrygon* em relação a outras espécies de *Potamotrygon* foi elevada, variando de 12,7% a 13,9%, corroborando com outro trabalho realizado com o gênero *Paratrygon* (Frederico et al. 2012). Os valores de distância genética observados entre as duas linhagens dentro do gênero *Paratrygon* foram maiores (2,4%) do que os encontrados em comparações entre espécies de *Potamotrygon*.

O método GMYC mostrou ser mais sensível e que melhor dividiu as espécies de arraias de água doce, assim como para outros grupos de peixes (Silva et al. 2017; Tang et al. 2014). O ABGD e o PTP foram incapazes de distinguir vários pares de espécies que são facilmente reconhecidos pela morfologia, como *P. leopoldi*, por exemplo, que possui uma morfologia bastante singular. O menor número de grupo de espécies foi definido pelo método PTP, em outros estudos também tiveram o mesmo resultado em comparação a outros métodos (Silva et al. 2017; Tang et al. 2014).

Embora a região Cytb tenha mostrado uma maior variabilidade de haplótipos, (Cytb - 23 Hap e COI – 18 Hap), o marcador COI separou melhor as espécies do que Cytb, que não separou *P. orbignyi* e *P. scobina* de *P. leopoldi*, apesar de não ser possível visualizar um *Barcode gap* expressivo. Geralmente para a região Barcode, se considera 2% como limite mínimo inferior interespecífico (Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005). No entanto, no caso das arraias de água doce, para algumas comparações entre espécies com morfologia bem estabelecida, observou-se valores inferiores a 2%. Isso pode estar relacionado a história evolutiva do grupo, onde as espécies de *Potamotrygon* divergiram muito recentemente (Lovejoy 1994; Marques 2000). Apesar disso, a ferramenta do DNA Barcode foi bastante eficiente para discriminar as linhagens dentro do gênero *Paratrygon*.

Especiação Simpátrica em *Paratrygon*

A divergência intraespecífica dentro de *Paratrygon* sendo maior que a distância média interespecífica dentro de *Potamotrygon*, sugere que dentro de *Paratrygon* exista mais de uma espécie, ou seja, *Paratrygon* deixaria de ser um gênero monotípico. Esta alta divergência dentro desta espécie é congruente com outros dados moleculares de genes de ATPase subunidade 6 e COI, de 63 espécimes (Frederico et al. 2012) que separam esta espécie em três grupos: (1) Sistema Solimões-Amazonas-Estuário (SAE) e o Negro Rio (NEG); (2) o grupo do rio Xingu (XIN); (3) outro grupo do rio Araguaia (ARA).

Nossos dados demonstram uma subdivisão dentro do grupo 2, sugerindo que tenham duas espécies ocorrendo simpatricamente na bacia do rio Xingu, corroborando com a última revisão taxonômica do complexo *Paratrygon* que está sendo realizada (Lobota, 2016), onde descreve mais oito novos grupos específicos para o gênero, incluindo uma endêmica do rio Xingu (Lobota, com. pess.).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comparação entre o DNA mitocondrial Cyt b e COI mostrou que a região *Barcode* é mais adequada para discriminar espécies do que o Cyt b, apesar de ter uma diversidade de haplótipos maior, não discriminou os espécimes as suas respectivas espécies quanto o *Barcode*. O método GMYC utilizando sequencias de COI, mostrou ser mais sensível que os outros métodos, separando as espécies em seus respectivos grupos.

Foi demonstrada uma grande associação entre haplótipos e distribuição geográfica das espécies, com replicação de coloração do dorso em diferentes ramos da árvore, tendo diferentes espécies, baseado em morfologia, no mesmo grupo, compartilhando haplótipos, desta forma, o estudo sugere pela primeira vez hibridização no rio Xingu, apesar de os peixes serem mais propícios a hibridização do que outros vertebrados (Hashimoto et al. 2012), casos deste fenômeno não é comum entre os Elasmobrânquios, sendo registrado até o momento somente para duas espécies de tubarões na Austrália (Morgan et al. 2012) e duas espécies de arraias no rio Paraná, *P. motoro*-*P.falkneri* (Cruz et al. 2014). Embora nossos resultados não poderem ter apoio em metodologias mais rebuscadas, como o microsatélite, para confirmar a hibridização, levantam novos questionamentos para futuros estudos e experimentos.

A larga distribuição geográfica de *P. motoro* e a alta divergência interespecífica entre as sequências de espécimes do rio Xingu (deste trabalho) e sequencias do Rio Paraná (Pereira et al. 2013), sugere uma possível especiação, havendo a necessidade de uma revisão morfológica mais detalhada de *P. motoro* na bacia do rio Xingu. Este trabalho também sugere a especiação simpátrica de *Paratrygon* na bacia do Xingu, com indícios de espécie nova no rio Bacajá, afluente da margem direita do rio Xingu, corroborando com trabalhos de revisão taxonômica que vem sendo realizado com o gênero (Lobota 2016), indicando que o mesmo não é um gênero monotípico.

Casos como esses, de espécies com ampla distribuição geográfica e com divergência genética alta, como nas espécies de *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* mostram a importância de trabalhos taxonômicos e genéticos em conjunto e mais aprofundados, para uma melhor descrição da diversidade biológica e conservação de cada calha ou bacia, mostrando que a informação genética é essencial para estudar a adaptação, especiação e eventos de hibridização, a fim de conhecer os mecanismos para preservar a integridade genética das espécies de arraias de água doce.

LITERATURA CITADA

- Almeida, Maurício Pinto, Ronaldo Borges Barthem, Anderson Silva Viana, and Patricia Charvet-Almeida. 2008. “Freshwater Stingray Diversity (Chondrichthyes Potamotrygonidae) in the Amazon Estuary.” *Arquivos de Ciências Do Mar* 41(2):82–89.
- Charvet-Almeida, P., PMO Lins, and MP Almeida. 2008. “Diet Composition of the Whiptail Stingray *Dasyatis Colarensis* Santos, Gomes & Charvet-Almeida, 2004 (Chondrichthyes: Dasyatidae) in the Colares Island Region, Para, Brazil. AN - 1323813164; 17832317.” *Arquivos de Ciências Do Mar* 41(2):29–33. Retrieved (http://search.proquest.com/docview/1323813164?accountid=27991%5Cnhttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:asfabiological&atitle=Diet+composition+of+the+whiptail+s).
- Chen, Xiao, Weiming Ai, Dan Xiang, and Shaobo Chen. 2013. “Complete Mitochondrial Genome of the Red Stingray *Dasyatis Akajei* (Myliobatiformes: Dasyatidae).” 1736:1–2.
- Cruz, V. P. et al. 2014. “First Identification of Interspecies Hybridization in the Freshwater Stingrays *Potamotrygon Mоторо* and *P. Falkneri* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae).” *Conservation Genetics* 16(1):241–45.
- Darriba, Diego, Guillermo L. Taboada, Ramón Doallo, and David Posada. 2012. “jModelTest 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing.” *Nature Methods* 9(8):772.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus. 2005. “Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences.” (May 2014).
- Drummond, Alexei J. and Andrew Rambaut. 2007. “BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees.” *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Drummond, Alexei J., Marc A. Suchard, Dong Xie, and Andrew Rambaut. 2018. “Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1 . 7 Research Article.” 29(June):1969–73.
- Duncan, Wallace Paxiuba, Sandrelly Oliveira Inomata, and Marisa Narciso Fernandes. 2010. “Comércio de Raias de Água Doce Na Região Do Médio Rio Negro, Estado Do Amazonas, Brasil.” *Rev. Bras. Eng.Pesca* 5(2):13–22.

- Dunn, Katherine A., John D. McEachran, and Rodney L. Honeycutt. 2003. "Molecular Phylogenetics of Myliobatiform Fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with Comments on the Effects of Missing Data on Parsimony and Likelihood." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27(2):259–70.
- Ezard, T., T. Fujisawa, and T. Barraclough. 2014. "SPecies' LIimits by Threshold Statistics. R Package Version 3." Retrieved (https://r-forge.r-project.org/R/?group_id=333).
- Filho, Getulio Rincon. 2006. "ASPECTOS TAXONÓMICOS, ALIMENTAÇÃO E REPRODUÇÃO DA RAIÁ DE ÁGUA DOCE *Potamotrygon* (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE) NO RIO Orbigny (CASTELNAU) (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE) NO RIO PARANÁ-TOCANTINS." 145.
- Fontenelle, João Pedro and Marcelo R. De Carvalho. 2017. *Systematic Revision of the *Potamotrygon Scobina* Garman, 1913 Species-Complex (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with the Description of Three New Freshwater Stingray Species from Brazil and Comments on Their Distribution and Biogeography.*
- Frederico, Renata G., Izeni P. Farias, Maria Lúcia Góes de Araújo, Patricia Charvet-Almeida, and José A. Alves-Gomes. 2012. "Phylogeography and Conservation Genetics of the Amazonian Freshwater Stingray *Paratrygon Aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)." *Neotropical Ichthyology* 10(1):71–80.
- Guimarães-Costa, A. et al. 2017. "Exploring the Molecular Diversity of Eleotridae (Gobiiformes) Using Mitochondrial DNA." *Journal of Applied Ichthyology* 33(3):572–78.
- Guimarães-Costa, Aurycéia et al. 2016. "Molecular Evidence of Two New Species of *Eleotris* (Gobiiformes: Eleotridae) in the Western Atlantic." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 98:52–56.
- Hall, Thomas A. 1999. "BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT.pdf."
- Hasegawa, Masami. 1985. "Journal of Molecular Evolution ~)." 160–74.
- Hashimoto, D. T., A. J. Senhorini, F. Foresti, and F. Foresti-Porto. 2012. "Interspecific Fish Hybrids in Brazil : Management of Genetic Resources for Sustainable Use." *Reviews in Aquaculture* 108–18.

- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. "Biological Identifications through DNA Barcodes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512):313–21. Retrieved (<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2002.2218>).
- IBAMA. 2015. "PORTARIA MPA/SEMOC Nº 36, DE 15 DE JULHO DE 2015." 10.
- Khudamrongsawat, J., T. Bhummakasikara, and N. Chansue. 2017. "Preliminary Study of Genetic Diversity in the Giant Freshwater Stingray , Himantura Chaophraya (Batoidea : Dasyatidae) from the Remnant Populations in Thailand." 17(April):53–58.
- Kimura, Motoo. 1980. "Journal of Molecular Evolution ©." 16(1330).
- Kirchhoff, Kim N., Ines Klingelhöfer, Hans Martin Dahse, Gertrud Morlock, and Thomas Wilke. 2014. "Maturity-Related Changes in Venom Toxicity of the Freshwater Stingray Potamotrygon Leopoldi." *Toxicon* 92:97–101.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33(7):1870–74.
- Lasso, Carlos A., Ricardo S. Rosa, Mónica A. Morales-Betancourt, Domingos Garrone-Neto, and Marcelo Carvalho. 2016. *Rayas de Agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam Y Guayana Francesa: Diversidad, Bioecología, Uso Y Conservación. Serie Recursos Hidrobiológicos Y Pesqueros Continentales de Colomb.*
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. "DnaSP v5: A Software for Copenhensive Analysis of DNA Polymorphism Data." *Bioinformatics* 25:1451–52.
- Loboda, Thiago Silva and Marcelo Rodrigues de Carvalho. 2013. "Systematic Revision of the Potamotrygon Motoro (Müller & Henle, 1841) Species Complex in the Paraná-Paraguay Basin, with Description of Two New Ocellated Species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)." *Neotropical Ichthyology* 11(4):693–737.
- Lobota, Thiago Silva. 2016. "Revisão Taxonômica E Morfológica Do Gênero Paratrygon Duméril (1865) (Chondrichthyes : Myliobatiformes : Potamotrygonidae) Taxonomic and Morphological Revision of the Genus Paratrygon Duméril (1865) (Chondrichthyes : Myliobatiformes : Potamotrygoni." (1865).
- Lovejoy, N. R. 1996. "Systematic of Myliobatoid Elasmobranchs: Whith Emphasis on Phylogeny and Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Stingrays

- (Potamotrigonidae: Rajiformes).” *Zoological Journal of the Linnean Society* 117:207–57.
- Lovejoy, Nathan R. 1994. “Stingrays , Parasites , and Neotropical Biogeography : A Closer Look at Brooks et Al / S Hypotheses Concerning the Origins of Neotropical Freshwater Rays (Potamotrygonidae).” 46:218–30.
- Lovejoy, Nathan R., Eldredge Bermingham, and Andrew P. Martin. 1998. “Marine Incursion into South America.”
- Marques, Fernando P. L. 2000. “EVOLUTION OF NEOTROPICAL FRESHWATER STINGRAYS AND THEIR.”
- Martin, R.Aidan. 2005. “Conservation of Freshwater and Euryhaline Elasmobranchs : A Review.”
- Morgan, Jess A. T. et al. 2012. “Detection of Interspecies Hybridisation in Chondrichthyes : Hybrids and Hybrid Offspring between Australian (*Carcharhinus Tilstoni*) and Common (*C. Limbatus*) Blacktip Shark Found in an Australian Fishery.” 455–63.
- de Oliveira, Joiciane N. et al. 2014. “Molecular Data Indicate the Presence of a Novel Species of *Centropomus* (Centropomidae - Perciformes) in the Western Atlantic.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 77(1):275–80. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.019>).
- Paithankar, K. R. and K. S. N. Prasad. 1991. “Precipitation of DNA by Polyethylene Glycol and Ethanol.” *Nucleic Acids Research* 19(6):1346.
- Palacios-barreto, Paola et al. 2017. “Molecular Evidence Supporting the Expansion of the Geographical Distribution of the Brazilian Cownose Ray *Rhinoptera Brasiliensis* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) in the Western Atlantic.” (November).
- Pereira, Luiz H. G., Robert Hanner, Fausto Foresti, and Claudio Oliveira. 2013. “Can DNA Barcoding Accurately Discriminate Megadiverse Neotropical Freshwater Fish Fauna?” *BMC Genetics* 14:1–14.
- Pons, Joan et al. 2006. “Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects.” *Systematic Biology* 55(4):595–609.
- Posada, David. 2008. “jModelTest : Phylogenetic Model Averaging jModelTest : Phylogenetic Model Averaging.” (August 2008).
- Rambaut, A. and A. J. Drummond. 2009. “Tracer v1.5.” Retrieved (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>).
- Rosa, R. .. 1985. “A Systematic Revision of the South American Freshwater Stingrays

- (Chondrichthyes: Potamotrygonidae.” *Unpubl. Phd. Diss., The College of William and Mary, Virginia.*
- Rosa, R. S., P. Charvet-Almeida, and C. C. D. Quijada. 2010. “Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays.” Pp. 241–86 in *Sharks and their relatives II: Biodiversity, adaptive physiology and conservation.*
- Ruocco, Natalia Lorena, Luis Lucifora, Juan M. Díaz de Astarloa, Ezequiel Mabragaña, and Sergio M. Delpiani. 2014. “Morphology and DNA Barcoding Reveal a New Species of Eagle Ray from Morphology and DNA Barcoding Reveal a New Species of Eagle Ray.” (May).
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12):5463–67.
- Sevilla, Rafael G., Amalia Diez, Michael Norén, Olivier Mouchel, and Marc Jérôme. 2007. “Primers and Polymerase Chain Reaction Conditions for DNA Barcoding Teleost Fish Based on the Mitochondrial Cytochrome B and Nuclear Rhodopsin Genes.” 7(5):730–34.
- Shen, Kang-ning et al. 2015. “Mitochondrial DNA : The Journal of DNA Mapping , Sequencing , and Analysis Next Generation Sequencing Yields Complete Mitogenomes of Leopard Whipray (Himantura Leoparda) and Blue-Spotted Stingray (Neotrygon Kuhlii) (Chondrichthyes : Dasyatidae) Next.” (August):5–7.
- Silva, João Paulo Capretz Batista. 2009. “Revisão Taxonômica E Morfológica Do Complexo Potamotrygon Orbignyi (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae).”
- Silva, Raimundo et al. 2017. “Comparative Analyses of Species Delimitation Methods with Molecular Data in Snappers (Perciformes : Lutjaninae).” *Mitochondrial DNA Part A* 0(0):1–7. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1413364>).
- Stamatakis, A. 2014. ““RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies.”” In *Bioinformatics*. Retrieved (<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract?%0Akeytype=ref&ijkey=VTEqgUJYCDcf0kP>).
- Tamura, Koichiro and Masatoshi Nei. 1993. “Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and.” 10(3).
- Tang, Cuong Q., Aelys M. Humphreys, Diego Fontaneto, and Timothy G. Barraclough. 2014. “Effects of Phylogenetic Reconstruction Method on the Robustness of Species

- Delimitation Using Single-Locus Data.” 1086–94.
- Thompson, Julie D., Desmond G. Higgins, and Toby J. Gibson. 1994. “CLUSTAL W : Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting , Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice.” 22(22):4673–80.
- Toffoli, Daniel et al. 2008. “A Test of the Utility of DNA Barcoding in the Radiation of the Freshwater Stingray Genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes).” *Genetics and Molecular Biology* 31(1 SUPPL. 1):324–36.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last, and P. D. N. Hebert. 2005. “DNA Barcoding Australia’s Fish Species.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462):1847–57. Retrieved (<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2005.1716>).

APÊNDICE

Tabela 1. Número de indivíduos sequenciados por espécie considerando cada marcador, juntamente com o número de haplótipos observado por espécie (exibido dentro dos parênteses). Em destaque (cinza), espécies que compartilham o mesmo haplótipo.

Cyt b	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Paratrygon</i>
Haplótipos	<i>motoro</i>	<i>scobina</i>	<i>orbignyi</i>	<i>leopoldi</i>	sp.1	sp.2	<i>aiereba</i>
Hap-1	-	-	-	19	-	1	-
Hap-2	-	-	-	14	-	-	-
Hap-3	-	-	-	8	-	-	-
Hap-4	-	-	-	7	-	-	-
Hap-5	-	-	-	16	-	1	-
Hap-6	-	-	-	2	-	-	-
Hap-7	-	-	-	1	-	1	-
Hap-8	5	-	-	-	-	-	-
Hap-9	2	-	-	-	2	-	-
Hap-10	3	-	-	-	1	-	-
Hap-11	1	-	-	-	-	-	-
Hap-12	-	5	6	-	-	-	-
Hap-13	-	1	-	-	-	-	-
Hap-14	-	1	-	-	-	-	-

Hap-15	-	-	-	-	-	-	2
Hap-16	-	-	-	-	-	-	1
Hap-17	-	-	1	-	-	-	-
Hap-18	-	-	2	-	-	-	-
Hap-19	-	-	5	-	-	-	-
Hap-20	-	-	1	-	-	-	-
Hap-21	-	-	1	-	-	-	-
Hap-22	-	-	4	-	-	-	-
Hap-23	-	-	1	-	-	-	-
Hap-24	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	11 (4)	7(3)	22 (9)	67 (7)	3 (2)	3 (3)	3 (2)
COI	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Potamotrygon</i>	<i>Paratrygon</i>
Haplótipos	<i>motoro</i>	<i>scobina</i>	<i>orbignyi</i>	<i>leopoldi</i>	<i>sp.1</i>	<i>sp.2</i>	<i>aiereba</i>
Hap-1	-	-	-	19	-	2	-
Hap-2	-	-	-	38	-	1	-
Hap-3	-	-	-	2	-	-	-
Hap-4	-	-	-	1	-	-	-
Hap-5	-	-	-	1	-	-	-
Hap-6	-	-	-	2	-	1	-
Hap-7	-	-	-	2	-	-	-
Hap-8	-	-	-	3	-	-	-
Hap-9	8	-	1	-	2	-	-
Hap-10	3	-	1	-	1	-	-
Hap-11	-	5	6	-	-	-	-

Hap-12	-	1	-	-	-	-	-
Hap-13	-	-	-	-	-	-	1
Hap-14	-	-	-	-	-	-	1
Hap-15	-	-	5	-	-	-	-
Hap-16	-	-	8	-	-	-	-
Hap-17	-	-	1	-	-	-	-
Hap-18	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	11 (2)	6 (2)	23 (7)	68 (8)	3 (2)	4 (3)	2 (2)

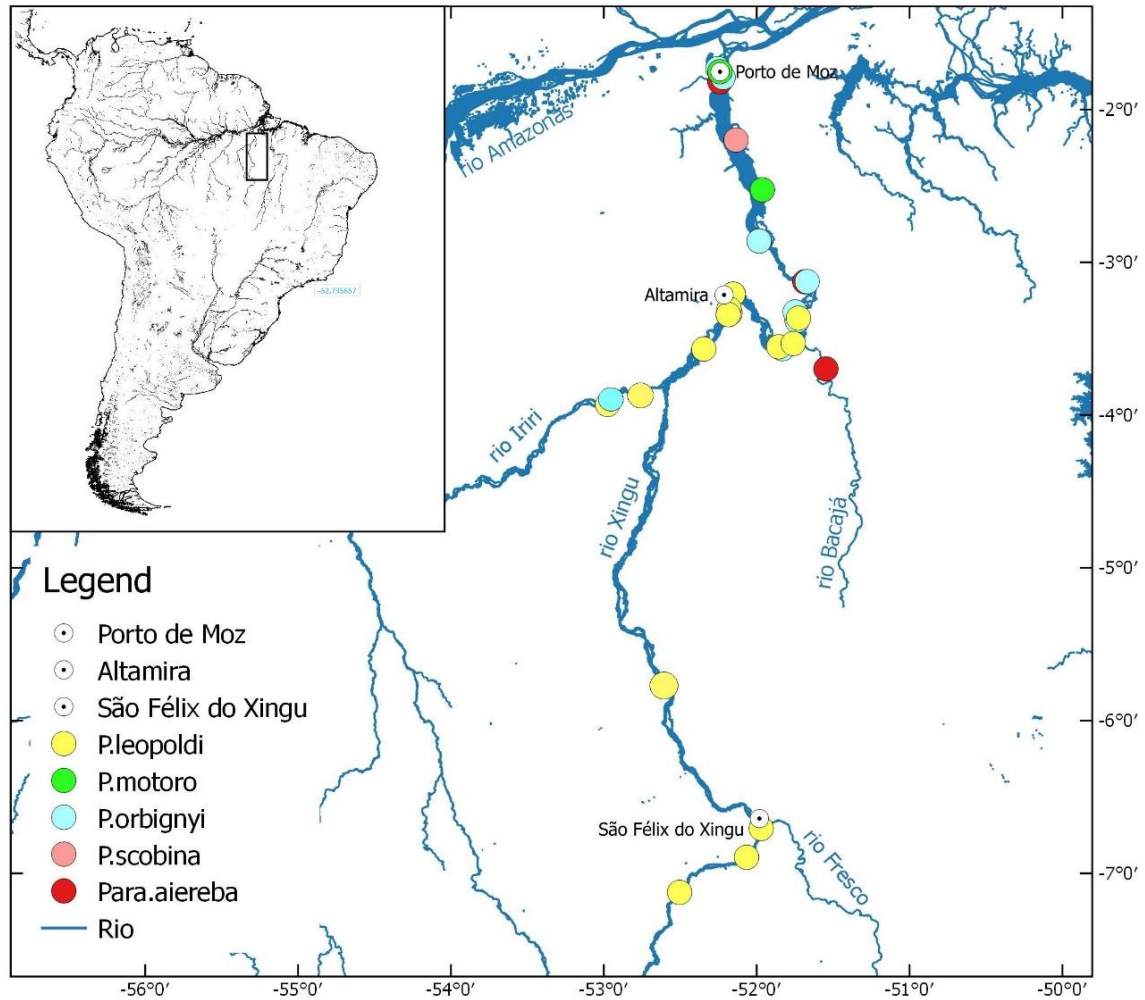


Figura 1: Mapa da área de estudo mostrando os locais de coleta e as respectivas espécies encontradas (*P. leopoldi*=amarelo; *P. orbignyi*=azul, *P. motoro*=verde, *P. scobina*=rosa, *Paratrygon aiereba*=vermelho).

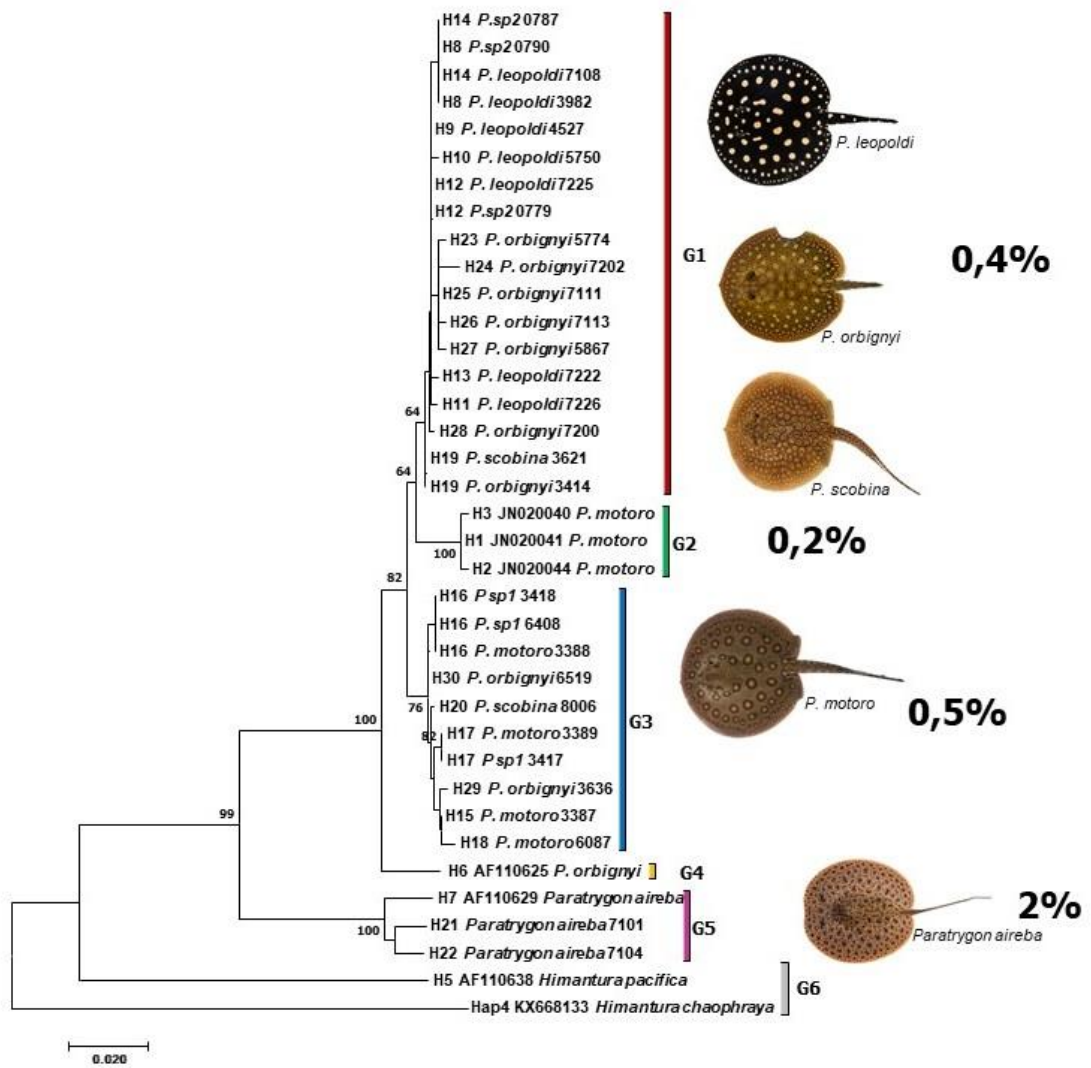


Figura 2: Árvore de Agrupamento de Vizinhos Cyt b.

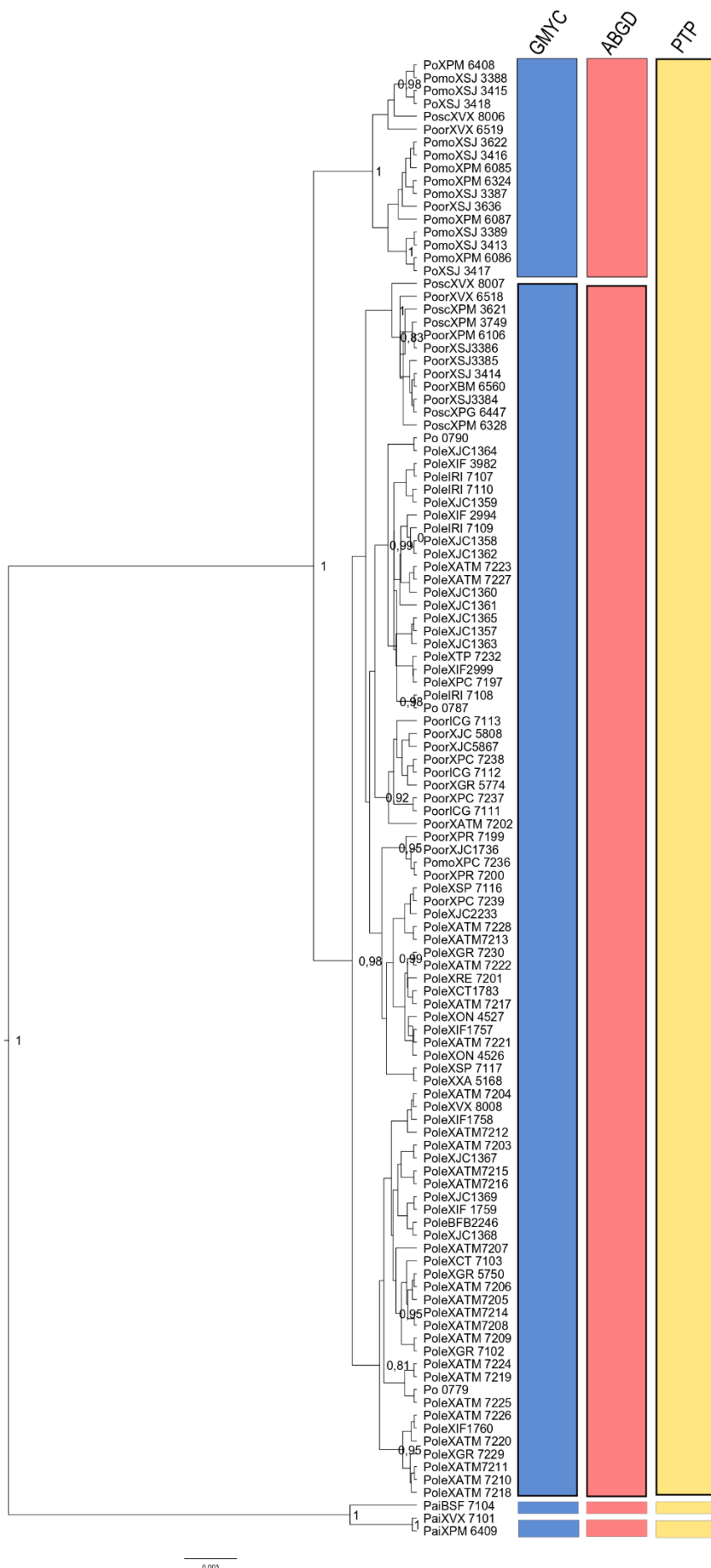


Figura 3: Árvore de gene ultramétrica inferida pelo BEAST baseada no Cyt b com destaque para a delimitação de espécies baseada no gene Cyt b. São mostrados os resultados das análises do ABGD com base nas quatro primeiras partições. São mostrados os resultados para as delimitações do GMYC (baseado no processo de Yule), PTP. Os valores de probabilidades posteriori acima de 0,8 da árvore bayesiana de genes são exibidas acima de cada nó.

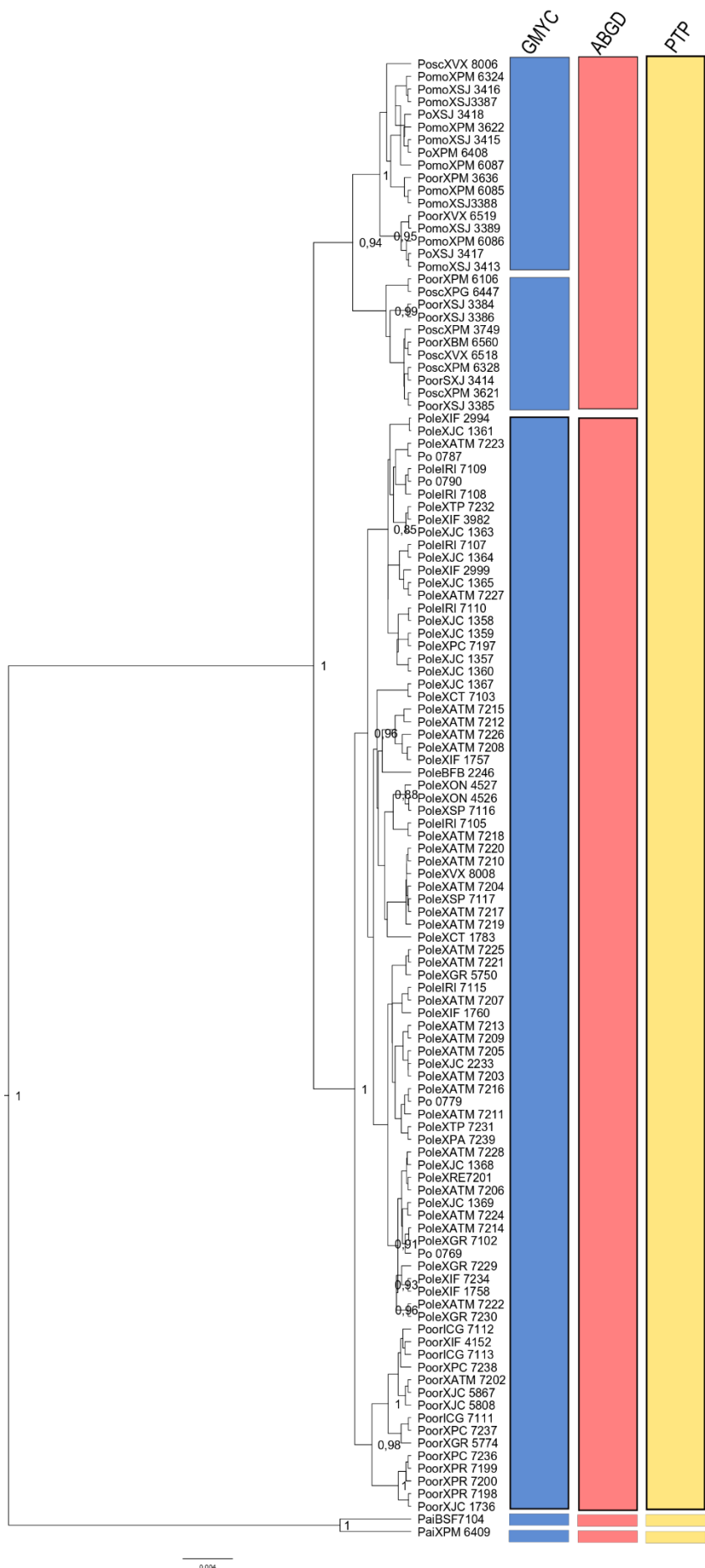


Figura 4: Árvore de gene ultramétrica inferida pelo BEAST baseada no COI com destaque para a delimitação de espécies baseada no gene *Barcode*. São mostrados os resultados das análises do ABGD com base nas quatro primeiras partições. São mostrados os resultados para as delimitações do GMYC (baseado no processo de Yule), PTP. Os valores de probabilidades posteriori acima de 0,8 da árvore bayesiana de genes são exibidas acima de cada nó.

Localidade	Nº de amostras por espécie					
	<i>Potamotrygon leopoldi</i>	<i>Potamotrygon orbignye</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>	<i>Potamotrygon scobina</i>	<i>Paratrygon aiereba</i>	<i>Potamotrygon. sp</i>
1 Porto de Moz (XPM)		2	5	3	1	2
2 Ponta Grande (XPG)				1		
3 Senador J. Porfirio (XSJ)		4	6			2
4 Vitória do Xingu (XVX)	2	1		6		
5 Belo Monte (XBM)		1			1	
6 Pimental/Resgate (XPR)		3				
7 Jericoá (XJC)	14	4				
8 Seca Farinha (BSF)					1	
9 Foz do Bacajá (BFB)	1					
10 Pimental/Canal (XPC)	5	4				
11 Ilha da Fazenda (XIF)	7	1			1	
12 Cotovelo (XCT)	1					
13 Paratição (XPA)	1					
14 Altamira (XATM)	26	1				
15 Gorgulho da Rita (XGR)	9	1				
16 Tapaiuna (XTP)	5					
17 Rio Iriri (IRI)	7					
18 Cachoeira Grande (ICG)		4				
19 Serra do Pardo (XSP)	20					
20 Remansinho (XRE)	1					
21 Xadai (XXA)	1					
22 Onça (XON)	2					
Sem coordenadas						4
TOTAL	102	26	11	10	4	8