



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
FACULDADE DE OCEANOGRAFIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GÊNERO *RHINOPTERA* van HASSELT, 1824
COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Apresentado por:

YASMIM TRINDADE CARNEIRO DA CUNHA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO BRAULLIO DE LUNA SALES (UFPA)

BELÉM - PARÁ

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
FACULDADE DE OCEANOGRAFIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GÊNERO *RHINOPTERA* van HASSELT, 1824
COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Apresentado por:

YASMIM TRINDADE CARNEIRO DA CUNHA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO BRAULLIO DE LUNA SALES (UFPA)

BELÉM - PARÁ

2022

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

- C972r Cunha, Yasmim Trindade Carneiro da.
Relações filogenéticas do gênero *Rhinoptera* Van Hasselt, 1824
com ênfase nas espécies do Atlântico Sul Ocidental / Yasmim
Trindade Carneiro da Cunha. — 2022.
Vii, 20 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. João Braullio de Luna Sales
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Geociências, Faculdade de
Oceanografia, Belém, 2022.
1. Conservação. 2. Sobrepesca. 3. Linhagens crípticas. 4.
Filogenia. 5. Especiação. I. Título.

CDD 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
FACULDADE DE OCEANOGRAFIA

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GÊNERO *RHINOPTERA* van HASSELT, 1824
COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

APRESENTADO POR:

YASMIM TRINDADE CARNEIRO DA CUNHA

Como requisito parcial à obtenção do Grau de Bacharel em Oceanografia

Data de aprovação: **13/07/2022**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Braullio de Luna Sales

(Orientador – UFPA)

Prof. Dr. James Tony Lee

(Membro – UFPA)

Dr. Leandro Araujo Argolo

(ITV – DS)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jacinete Trindade e Pedro Cunha, que sempre me deram todo amor e suporte necessários para minha formação pessoal e profissional e apoiaram minhas decisões. A minha irmã, Ana Luiza Cunha, que esteve ao meu lado, principalmente nesse fim de graduação, em todos os momentos, me acalmando e dando colo quando preciso.

Ao meu orientador João Braullio de Luna Sales pelo apoio, incentivo e compreensão diante todas as dificuldades que surgiram durante esses quatro anos e meio, pela paciência com minhas ansiedades e dificuldades, principalmente nos últimos meses.

Aos colegas de laboratório, pelas palavras de incentivo, pela preocupação comigo e pela ajuda com o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores da Faculdade de Oceanografia pelos incentivos e ensinamentos passados. A minha turma de 2018, pelas histórias vividas, pelo companheirismo durante a graduação e por ter sido uma turma unida que sempre buscou ajudar um ao outro.

Aos amigos que a graduação me proporcionou, especialmente Daniel Sótão, Fabrício Figueredo e Paulo Brígida, que durante todos esses anos foram companheiros e me deram motivação para continuar a jornada acadêmica. A minha dupla Glenda Taborda pela amizade, paciência, suporte e parceria de todas as horas, essencialmente nos últimos meses.

A todos os amigos que a vida me deu, que estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins. Especialmente minha melhor amiga, Maria Fernanda, pelos conselhos, apoio e incentivos durante todos esses anos, sou extremamente grata por ter você na minha vida.

A todos que participaram desse caminho de formação, que me ajudaram de forma direta e indireta durante minha graduação.

Muito Obrigada!

RESUMO

As raias da família Rhinopteridae Bonaparte, 1835 são altamente migratórias e estão distribuídas em águas mornas em mares tropicais e temperados. O litoral brasileiro registra a ocorrência de 2 espécies, *Rhinoptera bonasus* e *Rhinoptera brasiliensis*, as quais, devido ao grande tamanho corpóreo são alvo fácil de captura acidental como fauna acompanhante de pescarias de arrasto, como as de camarão marinho. As relações filogenéticas do gênero ainda não estão elucidadas, havendo suspeitas sobre a validade de algumas espécies, bem como a possível presença de linhagens crípticas ainda não descritas dentro de algumas espécies. O presente estudo tem por objetivos, através da utilização do gene COI elucidar a posição filogenética das espécies de *Rhinoptera* que ocorrem no litoral brasileiro, em relação às outras linhagens válidas do gênero, bem como a verificação da possível presença de linhagens crípticas dentro do gênero. Indivíduos das duas espécies foram coletados ao longo da costa brasileira. Sequências adicionais de outras espécies do gênero foram baixadas no *Genbank* e adicionadas ao banco de dados. Os resultados demonstram a presença de *R. brasiliensis* na Costa Norte brasileira, ampliando sua área de ocorrência no litoral brasileiro. Adicionalmente, 2 linhagens de *R. bonasus* foram recuperadas demonstrando que a espécie é formada por um complexo de espécies. O gênero *Rhinoptera* deve passar por revisões sistemáticas mais apuradas para correta elucidção de quantas espécies compõem o gênero no litoral brasileiro.

Palavras-chave: conservação; sobrepesca; linhagens crípticas; filogenia; especiação.

ABSTRACT

Rays of the family Rhinopteridae Bonaparte, 1835 are highly migratory and are distributed in warm waters in tropical and temperate seas. The Brazilian coast records the occurrence of 2 species, *Rhinoptera bonasus* and *Rhinoptera brasiliensis*, which, due to their large body size, are an easy target for accidental capture as bycatch in trawl fisheries, such as marine shrimp. The phylogenetic relationships of the genus are not yet elucidated, with suspicions about the validity of some species, as well as the possible presence of cryptic lineages not yet described within some species. The present study aims, through the use of the COI gene, to elucidate the phylogenetic position of the species of *Rhinoptera* that occur in the Brazilian coast, in relation to other valid lineages of the genus, as well as to verify the possible presence of cryptic lineages within the genus. Individuals of both species were collected along the Brazilian coast. Additional sequences from other species of the genus were downloaded from *Genbank* and added to the database. The results demonstrate the presence of *R. brasiliensis* in the Brazilian North Coast, expanding its area of occurrence in the Brazilian coast. Additionally, 2 strains of *R. bonasus* were recovered demonstrating that the species is formed by a species complex. The genus *Rhinoptera* must undergo more accurate systematic reviews for the correct elucidation of how many species make up the genus on the Brazilian coast.

Keywords: conservation; overfishing; cryptic lineages; phylogeny; speciation.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 AMEAÇAS A CONSERVAÇÃO DE ELASMOBRÂNQUIOS	1
1.2 RAIAS E O GÊNERO <i>Rhinoptera</i> van Hasselt, 1824.....	1
1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ESTUDOS COM RAIAS	5
2 OBJETIVO	7
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3 MATERIAL E MÉTODO	8
3.1 AMOSTRAGEM E ANÁLISES LABORATORIAIS	8
3.2 ANÁLISE DOS DADOS.....	11
4 RESULTADOS	11
5 DISCUSSÃO	14
REFERÊNCIAS	17

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMEAÇAS A CONSERVAÇÃO DE ELASMOBRÂNQUIOS

A exploração pesqueira constitui-se na maior ameaça a biodiversidade dos elasmobrânquios com o agravante de que a nível mundial o manejo não é aplicado por ausência de informação básica ou em outros casos, má fé (Bonfil 1994). Neste contexto, os elasmobrânquios apresentam características biológicas que os tornam altamente vulneráveis às pressões cada vez mais intensas exercidas pela sobrepesca, como um ciclo de vida longo, crescimento lento, maturidade sexual tardia e baixa fertilidade (Hoenig & Gruber 1990), o que limita o crescimento populacional e a recuperação de ações (Vooren & Klippel 2005). Elasmobrânquios são frequentemente capturados como fauna acompanhante em pescarias que visam espécies mais lucrativas (como, atum e espécies semelhantes ao atum), o que vem causando grandes declínios populacionais de espécies não-alvo (Bonanomi *et al.* 2017). A maioria das espécies de tubarões e raias podem ser classificadas como fortes estrategistas K, isto é, possuem vida longa com taxas de crescimento lentas e maturação sexual tardia. Grande parte das espécies apresenta baixa fecundidade, o que resulta em um potencial reprodutivo pequeno. Além disso, os elasmobrânquios normalmente são os principais predadores em suas comunidades, logo, apresentam uma baixa abundância (Bonfil 1994).

Entretanto, tubarões e raias sofrem pressões distintas. Os dois grupos são afetados pela destruição de habitat, entretanto, os tubarões possuem uma pesca direcionada devido ao comércio de barbatanas (Stevens *et al.* 2000, Simpfendorfer *et al.* 2011, Dulvy *et al.* 2014), sendo o Brasil, um dos maiores exportadores de carne e barbatanas ao mercado asiático, que é o principal importador mundial de carne de tubarão no mundo onde são comercializadas como iguarias (Dulvy *et al.* 2014, Dent & Clarke 2015, Barreto *et al.* 2017). Historicamente, apesar do alto valor de alguns produtos de peixes cartilaginosos (por exemplo, mercado de barbatana de tubarão, atingindo valores de até 1000 dólares por quilo (Fabinyi & Liu 2014), os esforços de conservação e divulgação à sociedade dos dados sobre as ameaças às espécies têm feito com que alguns mercados internacionais iniciem programas de conservação voltados às espécies.

1.2 RAIAS E O GÊNERO *Rhinoptera* van Hasselt, 1824

As raias são o maior subgrupo dos Chondrichthyes e atualmente compreendem 26 famílias e 633 espécies válidas (Last *et al.* 2016). No entanto, especialistas sugerem que existam aproximadamente 50 espécies não reconhecidas ou não descritas (Weigmann 2016). Diferentemente dos tubarões, não existem pescarias direcionadas às espécies de arraias. Entretanto, algumas espécies são alvo de pesca esportiva, ou vítimas de redes de arrasto de fundo para pesca de camarão, sendo considerada fauna acompanhante e descartadas depois de já estarem mortas nas redes (Lessa 1986, Nunes *et al.* 2005). Nesta vertente, algumas espécies de raias marinhas estão criticamente ameaçadas de extinção, como o peixe serra ou espadarte (*Pristis pristis* Linneus, 1758), ao qual ocupa o ranking de umas das espécies de elasmobrânquios mais ameaçadas devido a captura acidental e perda de hábitat, assim como o cação anjo (*Squatina guggenheim* Marini, 1936) espécie que foi muito capturada nos anos 70 e 80 no sul do Brasil (Voorren & Klippel 2005).

O Brasil é responsável pela captura de cerca de 12.000 toneladas anuais de tubarões e 5.000 toneladas de raias (Feitosa *et al.* 2018, Ferrete *et al.* 2019) e, a partir do ano 2000, passou a ser considerado pela IUCN como um dos seis países que mais capturam elasmobrânquios em todo o mundo, sendo incluído na categoria “*Major Shark fishing State*” (Lack & Sant 2006). Posto isto, o desenvolvimento de ações de conservação, através da implementação de um Plano de Ação Nacional para a conservação de Tubarões e Raias Marinhas ameaçadas de extinção (PAN Tubarões), é a perspectiva de reverter a prevalente situação de ameaça que paira sobre as espécies brasileiras de Chondrichthyes pois tem como objetivo geral “Mitigar os impactos sobre os elasmobrânquios marinhos ameaçados de extinção no Brasil e de seus ambientes, para fins de conservação em curto prazo” (Rosa & Gagid 2014).

As raias da família Rhinopterae Bonaparte, 1835 são altamente migratórias e estão distribuídas em águas mornas em mares tropicais e temperados com exceção da região ao redor das ilhas do Pacífico (Mceachran & Fechhelm 1998, Last & Stevens 1994), sendo constituída por indivíduos bentopelágicos, passando parte do tempo na superfície, formando grandes agregações, mas alimentando-se no fundo, principalmente de crustáceos, bivalves e moluscos (Bogorodsky *et al.* 2014). As raias do gênero *Rhinoptera* van Hasselt, 1824 possuem tamanho médio a grande com um disco amplamente romboidal, a pele é lisa ou finamente granulada sem espinhos ou dentículos alargados. A boca dessas espécies é localizada ventralmente e quase tão larga quanto a cabeça, contendo dentes em formato de placa, normalmente dispostos em 7 ou mais fileiras em cada mandíbula. Os animais desse gênero são vivíparos, a maioria das espécies gera apenas um filhote a cada gestação e não possuem conexão placentária entre mãe e filhote (Last *et al.* 2016). Atualmente, o gênero é formado por 8 espécies válidas: *Rhinoptera bonasus*

Mitchill, 1815, *Rhinoptera brasiliensis* Müller, 1836, *Rhinoptera javanica* Müller & Henle, 1841, *Rhinoptera jayakari* Boulenger, 1895, *Rhinoptera marginata* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817, *Rhinoptera peli* Bleeker, 1863, *Rhinoptera neglecta* Ogilby, 1912 e *Rhinoptera steindachneri* Evermann & Jenkins, 1891 (Last *et al.* 2016). Para o continente americano 3 espécies são descritas: *R. bonasus*, *R. brasiliensis* e *R. steindachneri* sendo esta última ocorrendo apenas no Oceano Pacífico (Last *et al.* 2016).

R. bonasus apresenta distribuição desde o sul da Nova Inglaterra, nos Estados Unidos, ao Sul do Brasil, incluindo Golfo do México e Cuba (Bigelow & Schroeder 1953, Mceachran & Carvalho 2002, Palacios-Barreto *et al.* 2017) (Figura 1). Está atualmente classificada como "vulnerável" na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (Carlson *et al.* 2019). Previamente tida como uma espécie com distribuição apenas em águas brasileiras, *R. brasiliensis* está presente desde a região da Flórida, nos Estados Unidos (Weber *et al.* 2020), Golfo do México, Colômbia, Venezuela (Palacios-Barreto *et al.* 2017), ao sul do Brasil, onde sua faixa geográfica é supostamente limitada do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Vooren & Lamónaca 2004, Jones *et al.* 2017) (Figura 2). Está classificada como "vulnerável" pela IUCN (Carlson *et al.* 2019).



Figura 1- *Rhinoptera bonasus*, Mitchill 1815. Fonte: Rosa & Gadig (2014)



Figura 2- *Rhinoptera brasiliensis* Müller, 1836. (*Rhinoptera brasiliensis* 2022).

As duas espécies podem ocorrer de maneira simpátrica e sintópica na costa do Brasil, durante o período neonatal. Essa estratégia aumenta as chances de sobrevivência e sucesso alimentar durante as primeiras semanas/meses de vida (Rangel *et al.* 2017). Adicionalmente, foi proposta área de berçário no sudeste do Brasil, com nascimento no final da primavera e início do verão. O uso repetitivo dessa área por *R. bonasus* e *R. brasiliensis* sugere importância dessa área para a história de vida dessas espécies (Rangel *et al.* 2018).

Até o momento, das revisões filogenéticas feitas dentro do gênero *Rhinoptera*, apenas o trabalho de Palacios-Barretos *et al.* (2017) utilizou indivíduos do sudeste do Brasil e Golfo do México, no qual, expandindo a área de ocorrência de *R. brasiliensis* até a região do Caribe, Recentemente, Souza *et al.* (2021) demonstrou um padrão de agrupamento populacional dentro de amostragem ao longo das quatro regiões costeiras do Brasil, demonstrando alta variação para amostras da Costa norte do Brasil, fato este que poderia estar mascarando a ocorrência de espécies crípticas nessa região. O aumento da utilização de marcadores moleculares tem revelado a presença de espécies crípticas dentro de vários grupos, e a presença de linhagens não descritas de elasmobrânquios já foi registrada no Atlântico Sul Ocidental (Pinhal *et al.* 2012, Silveira 2017).

1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ESTUDOS COM RAIAS

Espécies morfológicamente semelhantes são frequentemente agrupadas em registros de captura, e algumas carcaças podem ser identificadas de forma incorreta se partes do corpo que os caracterizem forem removidas. Técnicas moleculares têm sido utilizadas nas últimas décadas para identificar espécies de tubarões, especialmente quando os métodos taxonômicos tradicionais falham devido a informações morfológicas insuficientes (Holmes *et al.* 2009). Nos últimos anos, o avanço da técnica de identificação a nível molecular das espécies, vêm auxiliando a taxonomia de grupos problemáticos, permitindo a identificação e discriminação de espécies novas de elasmobrânquios (Pinhal *et al.* 2012, Ruocco *et al.*, 2012, Arlyza *et al.* 2013, White *et al.* 2013, Last *et al.* 2016). Ao longo dos anos, a descrição e a identificação das espécies vêm sendo feita com base em traços morfológicos e são restritas a uma pequena parcela de pesquisadores, os taxonomistas, os quais muitas vezes não estão presentes em número suficiente dada a grande diversidade de espécies, assim como em regiões mega-diversas como o Atlântico Sul Ocidental (Palmeira *et al.* 2013). Entretanto, muitas vezes somente a abordagem morfológica não consegue chegar a uma descrição precisa de determinada espécie, há certas limitações que ocultam a real posição sistemática das espécies, basicamente porque alguns grupos de animais conservam características morfológicas muito similares entre si, o que limita a ação dos taxônomos (Hebert *et al.* 2003, Hajibabaei *et al.* 2007). Adicionalmente a esta problemática, as chaves de identificação geralmente não tratam todos os estágios de vida de uma espécie/grupo, tornando o sistema fortemente dependente de especialistas (Hebert *et al.* 2003).

Mais recentemente, os métodos baseados em DNA ganharam popularidade, uma vez que este é relativamente estável, e pode ser acessado de todas as etapas da vida usando pequenas quantidades de tecido, bem como o fato das sequências de DNA serem altamente reproduzíveis (Ward *et al.* 2005). O *DNA barcoding* é um sistema inovador projetado para fornecer identificações de espécies rápidas, precisas e automáticas usando regiões de genes curtas e padronizadas (Hebert & Gregory 2005).

Estudos com a utilização da ferramenta de DNA Barcoding em elasmobrânquios têm demonstrado fortes evidências de que muitas espécies desse grupo de organismos possuem um risco alto de extinção futura (Garcia *et al.* 2008). Pesquisas recentes revelaram que a pescaria de espécies de elasmobrânquios ameaçados de extinção ainda ocorre de forma acentuada (Feitosa *et al.* 2018, Tavares *et al.* 2013, Rodrigues-Filho *et al.* 2009). Também utilizam-se dados moleculares para a identificação de espécies de tubarões e raias comercializados, como em forma de filés (Palmeira *et al.* 2013). Nestes casos, análises de DNA representam uma

ferramenta útil para rastrear e verificar a autenticidade de produtos derivados de elasmobrânquios (carne e barbatanas) comercializados em determinadas regiões ou exportados para outros países e eventualmente identificar espécies ameaçadas (Palmeira *et al.* 2013).

O uso do código de barras de DNA utilizado nos condrictes é um potencial aliado dos sistemátas na elucidação de espécies enigmática, ajudando a resolver a nomenclatura do grupo/espécies em questão (White *et al.* 2013, White & Naylor 2016, Silveira 2017). Bem como na descoberta de novas espécies (Richards *et al.* 2009, Pinhal *et al.* 2012, Roucco *et al.* 2012).

JUSTIFICATIVA

Os elasmobrânquios são um grupo de espécies com alto nível de ameaça de extinção. Mesmo com os estudos crescentes com relação à fauna do Atlântico Sul Ocidental nos últimos anos (Sales *et al.* 2019, Petean *et al.* 2020, Souza *et al.* 2021), a caracterização de alguns grupos ainda permanece não elucidada (Silveira 2017). As espécies do gênero *Rhinoptera*, apresentam morfologia extremamente conservada, fato que pode mascarar a presença de linhagens genéticas distintas (Palacios-Barreto *et al.* 2017). O fato das duas espécies que ocorrem no Litoral Brasileiro estarem classificadas como “vulneráveis” na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (Carlson *et al.* 2019), faz com que estudos moleculares sejam amplamente necessários tanto para uma estimativa dos status de variabilidade das espécies, quanto à presença de possíveis espécies crípticas ocorrendo no Atlântico Sul Ocidental.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo realizar uma inferência filogenética do gênero *Rhinoptera*, com enfoque em espécies que ocorrem no litoral Brasileiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a possível presença de espécies crípticas dentro do gênero *Rhinoptera* no Atlântico Sul Ocidental.

Verificar o posicionamento filogenético das espécies de *Rhinoptera* que ocorrem no Atlântico Sul Ocidental.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 AMOSTRAGEM E ANÁLISES LABORATORIAIS

Amostras de *R. bonasus* e *R. brasiliensis* utilizadas no presente estudo foram coletadas em diferentes pontos ao longo do Atlântico Sul Ocidental e Atlântico Central. (Figura 3 e Tabela 1). De cada indivíduo, foi retirada uma pequena amostra de tecido muscular e acondicionado em tubos eppendorfs de 1.5 microlitros contendo etanol absoluto. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em freezer a -4°C até o momento das extrações de DNA.

O DNA genômico total foi obtido utilizando-se o Kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo *Mouse Tail*. Para as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), as PCR's foram realizadas com um volume final de 25 μl contendo: 0.5 μl de cada primer, 2 μl de MgCl_2 , 4 μl de dNTP (1.25mM), 5.0 μl de 5x buffer, 0.2 μl de Taq polimerase (5U/ μl) e o restante completado com água ultra pura. Inicialmente, o gene COI foi amplificado com o par de marcadores Fish F1 e R1 (Ward *et al.* 2005). As condições de para os PCRs foram os seguintes: Desnaturação inicial a 94°C por 1', 35 ciclos a 94°C por 40'' (desnaturação), 52°C por 40'' (hibridização) e 72°C por 1', e extensão final a 72°C por 10'. Para o sequenciamento dos fragmentos obtidos, as PCR's foram purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (AppliedBiosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

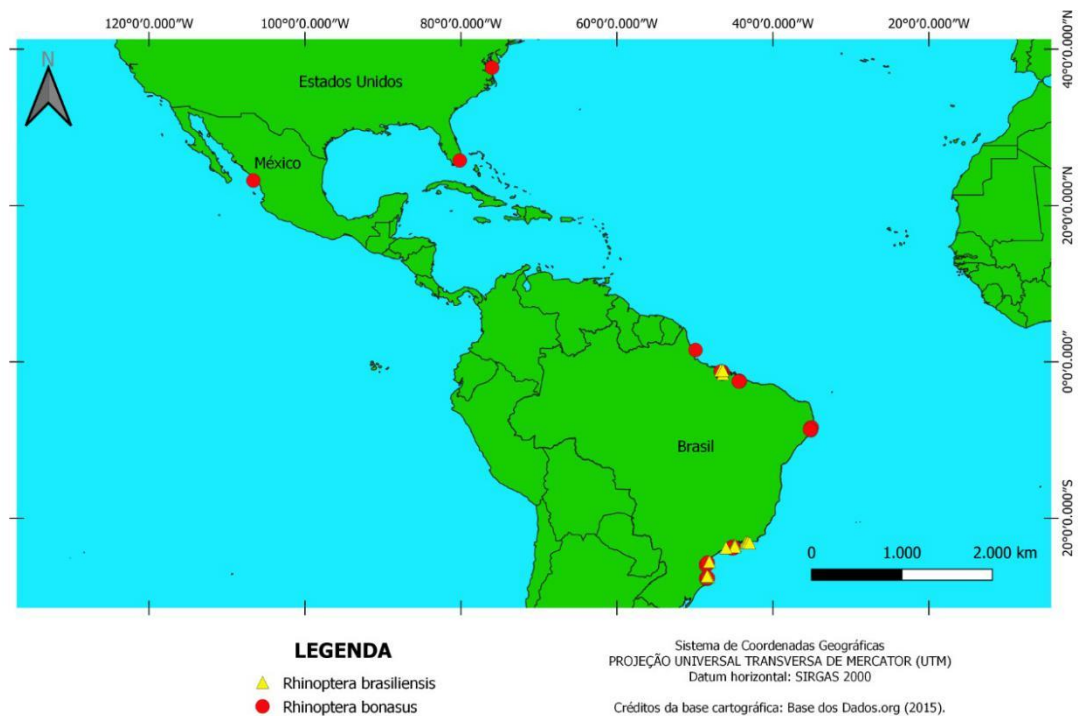


Figura 3- Locais dos pontos de amostragem do presente estudo.

Tabela 1- Listagem das amostras e sequências utilizadas no presente estudo de *Rhinoptera* contendo nome da espécie, código utilizado, local de procedência e sequência de acesso do Genbank, quando retirada do banco de dados do site.

(continua)

Espécie	Codigo	Localidade	GenBank
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Rbona590	Maxatlán, Mexico	Presente estudo
	Rbona881	Cabo Norte, Amapá	Presente estudo
	Rbona910	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbona911	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbona912	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbona913	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbona914	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbona73	Recife, Pernambuco	Presente estudo
	Rbona76	Recife, Pernambuco	Presente estudo
	Rbona79	Recife, Pernambuco	Presente estudo
	Rbona80	Recife, Pernambuco	Presente estudo
	Rbona215	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo
	Rbona218	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo
	Rbona221	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo
	Rbona315	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo
	Rbona70	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo
	Rbona71	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo
	Rbona74	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo

(conclusão)

Espécie	Codigo	Localidade	GenBank
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Rbona776	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo
	RbonaFL	Florida, USA	JX241051
	RbonaCB	Chasepeake Bay, USA	KF245596
	Rbona1	Baia de São Marcos, Maranhão	Presente estudo
	Rbona3	Baia de São Marcos, Maranhão	Presente estudo
	Rbona4	Baia de São Marcos, Maranhão	Presente estudo
	Rbona10	Matinhos, Paraná	Presente estudo
	Rbona20	Matinhos, Paraná	Presente estudo
	Rbona30	Matinhos, Paraná	Presente estudo
	Rbona40	Matinhos, Paraná	Presente estudo
	Rbra82	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbra773	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbra775	Bragança, Pará	Presente estudo
	Rbra674	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	Presente estudo
Rbra681	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	Presente estudo	
Rbra682	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	Presente estudo	
Rbra683	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	Presente estudo	
Rbra306	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo	
Rbra319	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo	
Rbra322	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo	
Rbra323	Toque Pequeno, São Paulo	Presente estudo	
Rbra340	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo	
Rbra352	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo	
Rbra353	Florianópolis, Santa Catarina	Presente estudo	

	Rbra365 Rbra10 Rbra1	Florianópolis, Santa Catarina Paraná Santos, São Paulo	Presente estudo Presente estudo JX124888
<i>Rhinoptera jayakari</i>	RjayaIN RjayaNic RjayaBdsh RjayaSdk RjayaSdk2 RjayaIN2 RjayaIN3	Kochi, India Ilha Nicobar, India Bangladesh Sandakan, Malásia Sandakan, Malásia India India	KF899682 KY574494 MH841982 MG792120 KM073015 KF899680 KF899679
<i>Rhinoptera javanica</i> <i>Rhinoptera javanica</i>	RjavaAus RjavaML RjavaQT2 RjavaQT1	Queensland, Australia Sandakan, Malasia Qatar Qatar	DQ108133 KM073013 GU673400 GU673396
<i>Rhinoptera steindachneri</i> <i>Rhinoptera steindachneri</i> <i>Rhinoptera marginata</i>	RsteiMX RsteiSri RmargTK1 RmargTK2	Baja California, Mexico Sri Lanka Gulf of Iskenderun, Turkey Gulf of Iskenderun, Turkey	JN184076 KM364907 KY176595 KY176594
<i>Manta birostris</i> <i>Aetobatus narinari</i> <i>Myliobatis freminvillei</i>	Mbiro Anari263 Mfrem	Africa do Sul São Sebastião, São Paulo Sao Paulo	JF493866 KY323256 JF018547

3.2 ANÁLISE DOS DADOS

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas através da ferramenta de alinhamento automático CLUSTALW (Thompson *et al.* 1997) implementada no programa BioEdit versão 7.0.4 (Hall 1999). Com o intuito de verificar e comparar as sequências obtidas no presente estudo, sequências de indivíduos do gênero *Rhinoptera* disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram baixadas e implementadas no nosso banco de dados. Sequências de *Myliobatis freminvillei* Lesueur, 1824, *Aetobatus narinari* Euphrasen, 1790 e *Manta birostris* Walbaum, 1792 foram utilizadas como grupo externo para polarizar o direcionamento das espécies do gênero *Rhinoptera* nas análises filogenéticas do presente estudo.

Para o presente estudo, duas metodologias filogenéticas foram empregadas. Inferência bayesiana (IB) a qual foi realizada no programa Mr. Bayes v.3.2 (Ronquist *et al.* 2012) e máxima verossimilhança (ML), utilizando o programa PhyML v.3.0 (Guidon *et al.* 2010). Para estas duas metodologias filogenéticas, os conjuntos de dados foram analisados com um único modelo de substituição (não particionado), e particionado por posição de códon (os modelos de substituição foram selecionados para cada uma das três posições). Os modelos evolutivos mais adequados para cada banco de dados foram estimados no programa jModeltest 2 (Darriba *et al.* 2012). Para as análises de ML, o índice de confiabilidade dos ramos foi estimado através de 1000 pseudo-réplicas de *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein 1985). No caso das Inferências Bayesianas, foram baseadas em amostragens de MCMC em quatro corridas simultâneas, cada uma consistindo de quatro cadeias (uma quente e três aquecidas) com uma corrida total de 10 milhões de gerações. Probabilidades bayesianas foram selecionadas com um consenso de 80%. Conservativamente, 25% das árvores iniciais foram descartadas como *burn-in*. Os scores de log-likelihood foram plotados no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond 2009) para confirmar a validade do período inicial de *burn-in* usado no Mr. Bayes. As amostras *pós burn-in* foram usadas para construir as árvores utilizadas no presente estudo.

4 RESULTADOS

Os modelos evolutivos selecionados para as análises de ML e IB foram TrN+I para ambas as análises. As reconstruções filogenéticas geradas no presente estudo sugerem novas topologias em relação a trabalhos anteriores (Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares 2011), sendo desta forma, o trabalho a utilizar a maior quantidade de espécies do gênero. Foram recuperados no nosso estudo, agrupamentos filogenéticos distintos dentro da filogenia de *Rhinoptera*. No ramo mais derivado da árvore, uma topologia formada por *R. javanica* da Austrália (*R. javaAUS*) formando um clado bem suportado (98% e 1 para Máxima verossimilhança e Inferência Bayesiana respectivamente) com outra sequência da mesma espécie proveniente da Malásia (*R. javaML*) e uma sequência identificada como *R. steindachneri* proveniente do Sri Lanka (*R. steiSri*) (98% e 0.97 para ML e IB) (Figura 4).

O restante das sequências utilizadas de *R. jayakari* formaram outros dois clados bem suportados. O primeiro, contendo sequências provenientes de Kochi na Índia, Ilhas Nicobar, também na Índia além de Sandakan e outra sequência proveniente da Índia onde este agrupamento foi fortemente suportado por ambos os métodos filogenéticos (81% e 0.99). O outro agrupamento, é formado por sequências provenientes do Qatar, Índia e Malásia com suportes elevados (94% e 0.99).

Em ambas as reconstruções filogenéticas, *R. marginata* foi recuperada como linhagem irmã de *R. brasiliensis*, embora apenas para a topologia de ML, o valor de suporte tenha sido significativo (92%) embora os valores de suporte que separem as duas espécies são elevados (Figura 4). Além do agrupamento com *R. javanica*, uma sequência de *R. steindachneri* foi recuperada proximamente ao clado formado por *R. marginata* + *R. brasiliensis*, porém com valor de suporte para as duas inferências filogenéticas não significativas.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a realizar inferência filogenética contendo indivíduos da Costa Norte do Brasil. Entretanto, para as duas espécies presentes no litoral brasileiro, os resultados foram contrastantes; *R. brasiliensis* foi recuperado como um agrupamento monofilético, estando amplamente distribuída desde o litoral sul do Brasil, até a costa norte Brasileira. Este resultado, se soma a estudos anteriores que já demonstravam que a espécie está presente no Golfo do México (Palacios-Barreto *et al.* 2017) bem como possivelmente até a região da Flórida nos Estados Unidos (Weber *et al.* 2020). Entretanto, Weber *et al.* (2020) ao verificarem a presença de *R. brasiliensis* no litoral dos EUA, não utilizaram amostras de outras localidades para confirmação de que *R. brasiliensis* identificadas por eles pertenceriam realmente a linhagem de *R. brasiliensis* distribuída do Brasil ao Golfo do México (Palacios-Barreto *et al.* 2017).

Em nosso estudo, também foi possível verificar a presença de sequências com possíveis identificações de espécies feitas de forma errada, como o caso *R. steindachneri* do Sri Lanka (Rstei_sri, Rstei_MX e Rbona590). *Rhinoptera steidachneri* não ocorre na região do Sri Lanka, sendo uma espécie restrita ao Pacífico Americano (Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares 2011, Last *et al.* 2016). Entretanto uma sequência proveniente da Baja California no México (Rstei_MX) foi recuperada dentro do clado formado por *R. brasiliensis*. Sandoval-Castillo e Rocha-Olivares, (2011), realizando uma inferência filogeográfica com *Rhinoptera steidachneri* nesta região, encontraram duas linhagens desta. Uma interna a região de Baja California e outra linhagem presente na porção externa (Península). Entretanto, os autores não utilizaram sequências de outras espécies do gênero *Rhinoptera* para comparação com o banco de dados gerados por eles. Nos dados, com a sequência proveniente desta região de Baja California, sugere a presença de *R. brasiliensis* no Pacífico. Infelizmente, o gene utilizado por Sandoval-Castillo e Rocha-Olivares (2011), difere do utilizado no presente estudo, inviabilizando (a priori) a comparação do nosso banco de dados com o destes autores. Nossos dados adicionalmente também indicam que a linhagem irmã de *R. brasiliensis* é a espécie *R. marginata*, uma espécie que ocorre no Atlântico Leste, o que sugere um próximo relacionamento evolutivo entre as duas. No caso de outras linhagens de Myliobatiformes com potencial de grandes migrações, Sales *et al.* (2019) demonstrou que para gênero *Aetobatus*, o resfriamento da barreira de Benguela na África foi o evento responsável pela proximidade genética de *A. narinari* com a linhagem de *Aetobatus* que ocorre na região Leste do Atlântico.

Possivelmente o mesmo evento pode ter provocado a especiação entre *R. brasiliensis* e *R. marginata*.

A sequência identificada como *R. bonasus* proveniente do México (Rbona590) veio da cidade de Mazatlán que é banhada pelo Pacífico. Desta forma, após consulta com o pesquisador responsável pela coleta da mesma (Raul Lara-Mendonza), o mesmo relatou que possivelmente seja *Rhinoptera steidachneri* e não *R. bonasus*. Relativo a *R. bonasus*, todas as nossas reconstruções filogenéticas sustentam a presença ao menos duas grandes linhagens da espécie, uma proveniente de espécimes do Atlântico Norte (Flórida e Chesapeake Bay) e outra linhagem amplamente distribuída no Atlântico Sul Ocidental (do Norte ao Sul do Brasil). Curiosamente, a linhagem norte Americana foi recuperada como a mais derivada dentro (agora) complexo de espécies de *R. bonasus*) enquanto a linhagem presente no Brasil, é espécie irmã de *R. steidachneri*. Esta íntima relação entre espécies presentes no Atlântico/Pacífico Americano pode estar associada a uma divergência recente, como a formação do Istmo do Panamá. A datação correta sobre o período exato deste evento tem sido amplamente debatida ao longo dos anos variando de 5 milhões de anos (Bacon *et al.* 2015) ao invés das estimativas mais tradicionais de 3-3.5 milhões de anos (Knowlton *et al.* 1993) ou até mesmo, datações que indicam tempo muito mais recente (2 milhões de anos, Cronin & Dowsett's 1996). Sales *et al.* (2019) recuperaram a separação entre *A. narinari* e *A. laticeps* do Pacífico a aproximadamente 1.41 milhões de anos (com intervalo de confiança de 0.675 a 2.29 milhões de anos). Desta forma, possivelmente o mesmo evento também pode ter sido vicariante para as espécies de *Rhinoptera* inferidas no presente estudo, assim como já foi estimado para outras espécies de elasmobrânquios (Schultz *et al.* 2008, Chabot & Allen 2009; Sales *et al.* 2019).

Nossos dados também indicaram um agrupamento com alto valor de suporte para sequências provenientes do Sul (Paraná, Santa Catarina), Sudeste (São Paulo) e uma sequência proveniente do Nordeste (Rbona80). Souza *et al.* (2021) utilizando microssatélites, demonstrou a presença de pelo menos dois grupos genéticos distintos de *R. bonasus* com amostras vindas da mesma localidade do presente estudo. Possivelmente o alto comportamento filopátrico que as espécies de *Rhinoptera* apresentam pode explicar esta estruturação interna (Ogburn *et al.* 2018). Já se tem registro de várias outras espécies de elasmobrânquios que apresentam este comportamento (Flowers *et al.* 2016). A costa brasileira apresenta pelo menos quatro áreas berçário conhecidas para elasmobrânquios sendo elas uma na costa Norte (Feitosa *et al.* 2017), uma na costa nordeste (Yokota & Lessa 2006) e duas na região Sudeste do Brasil (Silva & Vianna 2018, Rangel *et al.* 2018).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados apoiam a presença de ao menos duas linhagens evolutivas distintas dentro de *R. bonasus* e a presença de uma população adicional dentro da linhagem que ocorre no Brasil, além de indicar uma expansão na área de ocorrência de *R. brasiliensis* do Sul ao Norte do Brasil e possivelmente, levantar suspeitas sobre a sua presença no Pacífico Americano. Adicionalmente, indicamos estruturas internas dentro da *R. jayakari*, indicando que possivelmente uma das duas linhagens recuperadas no nosso trabalho pode ser referente a *Rhinoptera neglecta*, espécie presente apenas na região norte da Austrália. A alta conservação morfológica dentro do gênero *Rhinoptera* reforça a necessidade da implementação de métodos moleculares para correta discriminação das espécies do gênero de forma global. Adicionalmente, todas as espécies do gênero se encontram com status de conservação pela IUCN variando entre vulnerável (VU) (para o caso das duas espécies que ocorrem no Brasil) até Criticamente Ameaçada (CR). O fato do holótipo de *R. bonasus* ser proveniente dos EUA demonstra que a espécie nova ainda não descrita encontrada no presente estudo é a que ocorre no litoral Brasileiro, jogando nova luz a preocupação com relação a conservação das espécies que ocorrem no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Arlyza I. S., Shen K. N., Solihin D. D., Soedharma, D., Berrebi P., Borsa P. 2013. Species boundaries in the *Himantura uarnak* species complex (Myliobatiformes: Dasyatidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **66** (1): 429-435.
- Bacon C. D., Silvestro D., Jaramillo C., Smith B. T., Chakrabarty P., Antonelli A. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(19): 6110-6115.
- Barreto R. R., Bornatowski H., Motta F. S., Santander-Neto J., Vianna G. M. S., Lessa R. 2017. Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil. *Marine Policy*, **85**: 114-122.
- Bigelow H. B. & Schroeder W. C. 1953. *Fishes of the gulf of Maine*. Washington, US Government Printing Office. (Contribution, 592).
- Bogorodsky S. V., Alpermann T. J., Mal A. O., Gabr M. H. 2014. Survey of demersal fishes from southern Saudi Arabia, with five new records for the Red Sea. *Zootaxa*, **3852**(4): 401-437.
- Bonanomi S., Brčić J., Colombelli A., Notti E., Pulcinella J., Sala A. 2017. Fisheries bycatch of chondrichthyes In: Rodrigues-Filho Luis Fernando. (ed.). *Chondrichthyes—multidisciplinary approach*. London, United Kingdom; InTech, **10**: 39–62.
- Bonfil R. 1994. *Overview of world elasmobranch fisheries*. Progreso, Yucatan, México, Food & Agriculture Org. (FAO Fisheries Technical paper, 341).
- Carlson J., Charvet P., Avalos C., Blanco-Parra Mp, Briones Bell-Lloch A., Cardenosa D., Crysler Z., Derrick D., Espinoza E., Morales-Saldaña J.M., Naranjo-Elizondo B., Pacoureau N., Pérez Jiménez J.C., Schneider E.V.C., Dulvy N.K. 2020. *Rhinoptera brasiliensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20203.RLTS.T44595A2997621>. Acesso em: 22 de Junho de 2022.
- Chabot C. L. & Allen L. G. 2009. Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Molecular Ecology*, **18** (3): 545-552.
- Cronin T. M. & Dowsett H. J. 1996. Biotic and oceanographic response to the Pliocene closing of the Central American Isthmus. In: Autores.... *Evolution and environment in Tropical America*. Chicago e London, The university of Chicago Press, 76–104.
- De Sousa Rangel B., Paes Da Cruz V., Rodrigues A., Goes de Araujo M. L., Oliveira C., Foresti F., Guimaraes Moreira R. 2017. Sympatric and syntopic occurrence of cownose rays: Neonatal strategies for survival?. *Journal of Applied Ichthyology*, **33**(3): 542-545.
- Dent F., & Clarke S. 2015. State of the global market for shark products. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper*, **590** (1): 1-159.
- Dulvy N. K., Fowler S. L., Musick J. A., Cavanagh R. D., Kyne P. M., Harrison L. R., White W. T. 2014. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife*, **3** (1): 1-34.
- Fabinyi M. & Liu N. 2014. Seafood banquets in Beijing: consumer perspectives and implications for environmental sustainability. *Conservation and Society*, **12**(2): 218-228.
- Feitosa L. M., Martins A. P. B., Nunes J. L. S. 2017. Sawfish (Pristidae) records along the Eastern Amazon coast. *Endangered Species Research*, **34**: 229-234.

- Flowers K. I., Ajemian M. J., Bassos-Hull K., Feldheim K. A., Hueter R. E., Papastamatiou Y. P., Chapman D. D. 2016. A review of batoid philopatry, with implications for future research and population management. *Marine Ecology Progress Series*, **562**: 251-261.
- Fontenelle J. P., Loboda T. S., Kolmann M., De Carvalho M. R. 2018. Angular cartilage structure and variation in Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with comments on their function and evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **183**(1): 121-142.
- Hajibabaei M., Singer G. A., Hebert P. D., Hickey D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, **23**(4): 167-172.
- Hebert P. D., & Gregory T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, **54**(5): 852-859.
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., DeWaard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: *Biological Sciences*, **270**(1512): 313-321.
- Hoening J. M. 1990. Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries, 1-16.
- Holmes B. H., Steinke D., Ward R. D. 2009. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, **95**(2-3): 280-288.
- Jones C. M., Hoffmayer E. R., Hendon J. M., Quattro J. M., Lewandowski J., Roberts M. A., Marquez-Farias J. F. 2017. Morphological conservation of rays in the genus *Rhinoptera* (Elasmobranchii, *Rhinopteridae*) the occurrence of a large batoid, *Rhinoptera brasiliensis* Müller, in the northern Gulf of Mexico. *Zootaxa*, **4286**(4): 499-514.
- Knowlton N., Weigt L. A., Solorzano L. A., Mills D. K., Bermingham E. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, **260**(5114): 1629-1632.
- Lack M., & Sant G. 2006. *World shark catch, production and trade 1990-2003*. Mawson, Australia: Department of the Environment and Heritage.
- Last P., Naylor G., Séret B., White W., Carvalho M.de, Stehmann M. (eds.). 2016. *Rays of the world*. Local, CSIRO publishing. **1** (1): 1-1577.
- Lessa R. P. 1986. Levantamento faunístico dos elasmobrânquios (Pisces, Chondrichthyes) do litoral ocidental do estado do Maranhão, Brasil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, **7** (1): 27-41.
- McEachran J. D. 2002. Batoid fishes the living marine resources of the Western Central Atlantic. *FAO species identification guide for fishery purposes and American society of ichthyologists and herpetologists*, special publication, 1: 578-585.
- McEachran J., & Fechhelm J. D. 1998. *Fishes of the Gulf of Mexico*, Vol. 1: Myxiniformes to Gasterosteiformes (1). University of Texas Press.
- Nunes J. L. S., Almeida Z. D. S. D., Piorski N. M. 2005. Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil. *Arquivo de Ciências do Mar*. Fortaleza, **38**(1-2): 48-54.
- Ogburn M. B., Bangle C. W., Aguilar R., Fisher R. A., Curran M. C., Webb S. F., Hines A. H. 2018. Migratory connectivity and philopatry of cownose rays *Rhinoptera bonasus* along the Atlantic coast, USA. *Marine Ecology Progress Series*, **602**: 197-211.

Palmeira C. A. M., da Silva Rodrigues-Filho L. F., Sales, J. B. L., Vallinoto M., Schneider H., Sampaio I. 2013. Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. *Food Control*, **34**(1): 249-252.

Petean F. F., Naylor G. J., Lima S. M. 2020. Integrative taxonomy identifies a new stingray species of the genus *Hypanus* Rafinesque, 1818 (Dasyatidae, Myliobatiformes), from the Tropical Southwestern Atlantic. *Journal of Fish Biology*, **97**(4): 1120-1142.

Pinhal D., Shivji M. S., Vallinoto M., Chapman D. D., Gadig O. B. F., Martins C. 2012. Cryptic hammerhead shark lineage occurrence in the western South Atlantic revealed by DNA analysis. *Marine Biology*, **159**(4): 829-836.

Rangel B. S., Rodrigues A., Moreira R. G. 2018. Use of a nursery area by cownose rays (*Rhinoptera*) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **16**.

Richards V. P., Henning M., Witzell W., Shivji M. S. 2009. Species delineation and evolutionary history of the globally distributed spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). *Journal of heredity*, **100**(3): 273-283.

Rhinoptera brasiliensis Müller, 1836. 2022. Disponível em: Arkive (<https://www.arkive.org/brazilian-cownose-ray/rhinoptera-brasiliensis/>). Acesso em: 10 de Junho de 2022

Rosa R. S. & Gadig O. B. F. 2014. Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. *Arquivos de Zoologia*, **45** : 89-104.

Ruocco N. L., Lucifora L. O., Astarloa J. D.de, Mabrugaña E., Delpiani S. M. 2012. Morphology and DNA barcoding reveal a new species of eagle ray from the southwestern Atlantic: *Myliobatis ridens* sp. nov.(Chondrichthyes: Myliobatiformes: Myliobatidae). *Zoological Studies*, **51**(6), 862-873.

Sales J. B. L., Oliveira C. N.de, Santos W. C. R.dos, Rotundo M. M., Ferreira Y., Ready J., da Silva Rodrigues-Filho L. F. 2019. Phylogeography of eagle rays of the genus *Aetobatus*: *Aetobatus narinari* is restricted to the continental western Atlantic Ocean. *Hydrobiologia*, **836**(1), 169-183.

Sandoval-Castillo J. & Rocha-Olivares A. 2011. Deep mitochondrial divergence in Baja California populations of an aquilopelagic elasmobranch: the golden cownose ray. *Journal of Heredity*, **102**(3): 269-274.

Schultz J. K., Feldheim K. A., Gruber S. H., Ashley M. V., McGovern T. M., Bowen B. W. 2008. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*, **17**(24): 5336-5348.

Silva F. G. & Vianna M. 2018. Diet and reproductive aspects of the endangered butterfly ray *Gymnura altavela* raising the discussion of a possible nursery area in a highly impacted environment. *Brazilian Journal of Oceanography*, **66**: 315-324.

Silveira L. S. 2017. *Filogenia mitonuclear do gênero Gymnura Van Hasselt, 1823 revela especiação críptica no Atlântico Sul Ocidental*. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará. 53 p.

Simpfendorfer C. A., Heupel M. R., White W. T., Dulvy N. K. 2011. The importance of research and public opinion to conservation management of sharks and rays: a synthesis. *Marine and Freshwater Research*. **62**: 518–527

- Souza B. C., Cruz V. P., Almeida T. R., Sales J. B. L., Rodrigues-Filho L. F. S., Vianna M., Foresti F. 2021. Genetic diversity assessment for the vulnerable migratory cownose ray *Rhinoptera bonasus* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Neotropical Ichthyology*, **19**.
- Stevens J. D., Bonfil R., Dulvy N. K., Walker P. A. 2000. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, **57**(3): 476-494.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, **25**(24): 4876-4882.
- Vooren C.M. & Lamónaca A.F. 2004. *Rhinoptera brasiliensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/44595/0>. Acesso em: 13 Julho de 2019.
- Vooren C. M. & Klippel S. (eds.). 2005. *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre, Igaré.
- Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R., Hebert P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**(1462): 1847-1857.
- Weber H. K., Jones C. M., Ajemian M. J., McCallister M. P., Winner B. L., Poulakis G. R., Phillips N. M. 2021. Genetic evidence supports a range extension for the Brazilian cownose ray *Rhinoptera brasiliensis* in the western North Atlantic. *Journal of Fish Biology*, **98** (2): 577-582.
- Weigmann S. 2016. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, **88**(3): 837-1037.
- White W. T., Furumitsu K., Yamaguchi A. 2013. A new species of eagle ray *Aetobatus narutobiei* from the Northwest Pacific: an example of the critical role taxonomy plays in fisheries and ecological sciences. *PLoS One*, **8**(12): e83785.
- White W. T. & Naylor G. J. 2016. Resurrection of the family Aetobatidae (Myliobatiformes) for the pelagic eagle rays, genus *Aetobatus*. *Zootaxa*, **4139**(3): 435-438.
- Yokota L. & Lessa R. P. 2006. A nursery area for sharks and rays in Northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, **75** (3): 349-360.
- Yu Y., Blair C., He X. 2020. RASP 4: ancestral state reconstruction tool for multiple genes and characters. *Molecular Biology and Evolution*, **37** (2): 604-606.