

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós- Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos

GESIKA DEVA DE ARAÚJO MATIAS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODE*) DA ICTIOFAUNA MARINHA
DA PROVÍNCIA TROPICAL BRASILEIRA.**

MACEIÓ, ALAGOAS

2015

GESIKA DEVA DE ARAÚJO MATIAS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODE*) DA ICTIOFAUNA MARINHA
DA PROVÍNCIA TROPICAL BRASILEIRA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Tamí Mott

Co-orientadora: Dra. Nídia Noemi Fabré

MACEIÓ, ALAGOAS

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

M433c Matias, Gesika Deva de Araújo.
Identificação molecular (DNA *barcode*) da ictiofauna marinha da
Província Brasileira Tropical / Gesika Deva de Araújo Matias. – 2015.
53 f. : il.

Orientadora: Tamí Mott.

Coorientadora: Nídia Noemi Fabr e.

Disserta o (mestrado em Diversidade Biológica e Conserva o nos
Trópicos) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Gradua o em Diversidade
Biológica e Conserva o nos Trópicos. Maceió, 2015.

Inclui Bibliografia.

Apêndices: f. 49-53.

1. Ictiofauna - Alagoas. 2. Peixes marinhos - Biodiversidade. 3. Pesca.
4. DNA barcode - Peixes. 5. Citocromo Oxidase Sub-unidade 1 (COI).
I. Título.

CDU: 597

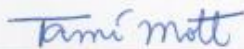
Folha de aprovação

Gesika Deva de Araújo Matias

EFICIÊNCIA DO DNA BARCODE NA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR
DA ICTIOFAUNA MARINHA DE ALAGOAS, NORDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Dissertação aprovada em 27 de fevereiro de 2015.



Prof. Dra. Tamí Mott - UFAL

Orientadora



Prof. Dra. Nidia Noemi Fabré
(Co-orientadora)



Prof. Dr. Uedson Pereira Jacobina/UFPE

(membro titular)



Prof. Dr. Thiony Emanuel Simon/UFPE

(membro titular)



Prof. Dra. Ana Cláudia Mendes Malhado/UFAL
(membro titular)

MACEIÓ - AL

Fevereiro / 2015

À minha família, especialmente ao meu companheiro Hélder e ao meu filho Miguel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu filho Miguel, que desde o seu nascimento tem iluminado minha vida; fez com que eu me tornasse uma pessoa melhor. Depois que me tornei mãe, ganhei um novo sentido, e um motivo a mais para correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais, Laudenice e Gesival, pelo incentivo e apoio desde sempre. Educando-me desde pequena a escolher o caminho mais honesto e a respeitar todos aqueles que me rodeiam. Agradeço ao meu companheiro, Hélder, que nunca mede esforços para me ajudar e que foi de fundamental importância neste momento da minha vida. Aos meus avós, em especial à vó Lia, que tem lutado para viver melhor a cada dia.

Gostaria de expressar toda a minha gratidão à minha orientadora, Prof^a Dr^a Tamí Mott, pela orientação, amizade e por estar sempre acreditando no meu potencial, por ter realmente me ajudado neste e em outros trabalhos. E à Prof^a Dr^a Nídia Noemi Fabré, pela co-orientação e por todas as suas contribuições.

Obrigada à tia Gláucia, por todo carinho e ao meu grande amigo Vinícius. A todo o pessoal do Laboratório de Diversidade Molecular e do Laboratório de Ecologia de Peixes e Pesca, pela amizade e convivência, em especial à Jessika, companheira em todas as etapas do mestrado; à Larissa e Giovana, pela ajuda e contribuição. À toda turma do PPG-DIBICT 2013.

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, principalmente aos professores, Tamí Mott, Nídia Fabré e Cláudio Sampaio, pelo apoio e disponibilidade em ajudar mesmo quando não havia tempo.

À CAPES, por ter disponibilizado este trabalho, me dado recursos por meio da concessão da bolsa de mestrado. À Universidade Federal de Alagoas, ao Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas. E a todos aqueles que estiveram envolvidos em algum momento com este trabalho.

Obrigada!

RESUMO

A maior parte dos estoques de peixes marinhos está completamente sobreexplorada ou alcançou o máximo permitido para a peca. A identificação precisa das espécies é o primeiro passo para prevenir o comércio ilegal e a sobreexploração. O DNA *barcode* é uma abordagem molecular que vem se mostrando eficiente para identificar espécies e pode servir como uma base de referência para prevenir fraudes e a captura ilegal de espécies de peixes. Desse modo, o nosso objetivo geral foi gerar sequências de DNA *barcode* afim de caracterizar a ictiofauna marinha do Nordeste Brasileiro, Província Tropical Brasileira, para avaliar se há ocorrência de diversidade críptica e servir de referência para prevenir fraudes e o comércio ilegal. O fragmento do gene citocromo c oxidase subunidade I, COI, foi amplificado e analisado de acordo com o protocolo do DNA *barcode* para 79 espécies, 64 gêneros, 36 famílias e 13 ordens de peixes. Setenta e oito espécies apresentaram distância intraespecífica menores que 2%, e distâncias interespecíficas maiores que 2% (4.7-39.9%), sugerindo que o COI foi capaz de discriminar corretamente espécies da ictiofauna marinha do Nordeste Brasileiro, Província Tropical Brasileira. Esses resultados reforçam que a identificação morfológica foi concordante com a identificação molecular, exceto pela espécie *Eucinostomus gula* que apresentou divergência de 13.8%. A Inferência Bayesiana sugeriu a necessidade de uma revisão sistemática para o gênero *Eucinostomus* com taxonomia instável. Entre as espécies coletadas, uma é vulnerável (*Lutjanus cyanopterus*) e três são quase ameaçadas (*Albula vulpes*, *Rhinobatos percellens* e *Scarus guacamaia*) e todas elas são geralmente coletadas por apetrechos utilizados pelos pescadores locais. A correta identificação de espécies da ictiofauna marinha na Província Tropical Brasileira é necessária para que um manejo sustentável dos recursos pesqueiros e sua conservação sejam possíveis.

Palavras-chave: Peixes marinhos. Biodiversidade. Pesca. Citocromo c oxidase subunidade I.

ABSTRACT

Most of the world's marine fish stocks are "fully exploited" or reached the maximum permissible. A precise identification of species is the first step to prevent illegal trade and overexploitation. DNA barcode is a molecular approach used to identify species and can be useful as a reference to prevent fraud and illegal trade. Our main goal was to generate DNA barcode sequences to characterize the marine fish fauna in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province to assess whether cryptic diversity occur as well as to serve as a reference to prevent fraud and illegal trade. A fragment of cytochrome c oxidase subunit 1 gene, COI, was amplified and analyzed according to DNA barcode protocol to 79 species, 64 genera, 36 families and 13 orders of fish. Seventy-eight species had intraspecific distances fewer than 2%, and interspecific distances greater than 2% (4.7-39.9%) suggesting that COI was able to correctly discriminate species of marine fish of Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province. These results reinforce that the morphological identification agree with molecular ones exception to *Eucinostomus gula* that showed genetic divergence of 13.8%. Bayesian inference suggested the need for a systematic review on *Eucinostomus* genus with unstable taxonomy. Among the species collected, one is vulnerable (*Lutjanus cyanopterus*) and three are near threatened (*Albula vulpes*, *Rhinobatos percellens* and *Scarus guacamaia*) and all of them are generally catch by local fishermen. The correct identification of marine fish species in Tropical Brazilian Province would certainly help in their conservation and contribute to sustainable management of their fishery resources.

Keywords: Marine fish. Biodiversity. Fishing. Cytochrome c oxidase subunit I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribution of 18 collecting points for marine fish along the coast of the Alagoas State, Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province. Insert map shows Tropical Brazilian Province, included in South America. Figure: Laboratório de Ecologia de Peixes e Pesca, Universidade Federal de Alagoas with modifications.....30

Figura 2. Neighbour-Joining dendrogram of 79 species of marine fish collected in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province, obtained using DNA barcode sequences and Kimura-2-parameters evolutionary model. Numbers in parenthesis represent the number of specimens included of each species.....34

Figura 3. Phylogram obtained by Bayesian Inference. Two individuals of *Eucinostomus argenteus*, and two of *E. gula* were collected in the Alagoas State and are highlighted with red circles. Black circles indicates nodes with posterior probability greater than 0.90. *Diapterus rhombeus* GU702341.1 *Diapterus_rhombeus_SAO_PAULO* is the outgroup.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de estudos com peixes utilizando a abordagem do DNA <i>barcode</i>	11
---	----

Capítulo 1

Table 1. Genetic divergence using Kimura-2-parameters evolutionary model of 78 species of marine fish collected in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province.....	34
--	----

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	1
	REFERÊNCIAS.....	2
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	Taxonomia utilizando dados morfológicos.....	4
2.2	Taxonomia utilizando dados moleculares: a abordagem do DNA <i>barcode</i>	5
2.3	Diversidade de peixes.....	11
2.4	Atividade Pesqueira e o manejo da pesca.....	13
	REFERÊNCIAS.....	16
3	ESTIMATING THE RICHNESS OF MARINE FISHES ON NORTHEASTERN BRAZIL, TROPICAL BRAZILIAN PROVINCE: A BASELINE FOR CONSERVATION.....	25
3.1	Abstract.....	25
3.2	Introduction.....	27
3.3	Material and methods.....	29
3.4	Results.....	33
3.5	Discussion.....	37
3.6	Acknowledgements.....	41
3.7	References.....	41
4	CONCLUSÕES.....	48
	APÊNDICE.....	49

1 APRESENTAÇÃO

A classificação dos seres vivos teve sua origem na Grécia Antiga, mas o sistema binominal utilizado atualmente foi proposto por Linnaeus em 1758 (GODFRAY, 2002). Regras específicas foram criadas para reconhecer, nomear e classificar espécies no intuito de evitar descrições redundantes e o uso do mesmo nome para diferentes espécies (GUERRA-GARCÍA et al., 2008). A crise enfrentada pela taxonomia tradicional devido à falta de prestígio e recursos (GODFRAY, 2002) e a perda da biodiversidade em passos alarmantes reforçaram a necessidade do desenvolvimento de um método rápido para a catalogação da diversidade (HEBERT et al., 2003). Desse modo, o DNA *barcode* é uma abordagem molecular que vem auxiliando os métodos de taxonomia tradicional (HEBERT et al., 2003). Este método utiliza o princípio de que um pequeno trecho do genoma de um organismo, específico para cada espécie, apresenta uma variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente (POWERS, 2004).

A identificação morfológica de grupos megadiversos, como é o caso dos peixes, com mais de 33.000 espécies atuais (ESCHMEYER et al., 2015), pode ser uma tarefa difícil, ainda mais quando consideramos as modificações morfológicas que estes animais sofrem durante seu desenvolvimento e a constante presença de dimorfismo sexual (HUBERT et al., 2008). A diversidade deste grupo taxonômico geralmente é subestimada (KNOWLTON, 2000), porque a diversidade críptica (táxons que não podem ser distinguidos morfológicamente apesar de apresentarem histórias evolutivas distintas) é disfarçada em uma aparente homogeneidade morfológica (VICTOR, 2014). Os ecossistemas costeiros tropicais são bastante diversificados, porém estes ambientes apresentam baixa abundância específica (BATISTA et al., 2014). A pesca nessas regiões inclui uma grande porcentagem de espécies e conseqüentemente, os impactos da atividade pesqueira artesanal nos trópicos pode ser uma realidade, ainda mais quando leva em consideração a grande concentração de comunidades pesqueiras nos litorais (BATISTA et al., 2014). A identificação acurada das espécies é um ponto crítico

para a construção de planos de manejo da pesca e sua conservação (FAO, 1997). Um sistema que discrimine espécies de forma pouco ambígua, assim como o DNA *barcode*, pode auxiliar no reconhecimento de limites taxonômicos e assim determinar as entidades de manejo (MOURA, 2008) e facilitar pesquisas de biodiversidade, tarefa crucial na priorização de esforços de conservação (TAYLOR e HARRYS, 2012).

Na presente dissertação, discute-se a respeito da identificação molecular (DNA *barcode*) da ictiofauna marinha do Nordeste Brasileiro, bem como a eficiência desta metodologia. Assim, a dissertação se inicia com uma revisão de literatura, onde apresentamos bases conceituais sobre taxonomia tradicional, identificação molecular de espécies incluindo o método de DNA *barcode*, diversidade de peixes e atividade pesqueira e o manejo da pesca. A segunda parte da dissertação consiste no manuscrito intitulado: “Estimating the richness of marine fishes on Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province: A baseline for conservation”. O objetivo geral foi utilizar o DNA barcode para caracterizar a ictiofauna marinha no Nordeste Brasileiro situado na Província Tropical Brasileira e verificar se estas morfoespécies apresentam diversidade críptica subestimada.

Assim, esta dissertação fornece informações de extrema importância para o Nordeste Brasileiro que poderão embasar futuros estudos no âmbito da conservação e genética forense.

Referências

BATISTA, V. S., et al. Tropical Artisanal Coastal Fisheries: Challenges and Future Directions. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**. v. 22, n. 1, p. 1-15, 2014.

ESCHMEYER, W. N. (Ed.). **CATALOG OF FISHES**: Genera, species, references. Disponível em:

<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.

Acesso em: 20 abr. 2015.

FAO. 1997. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Review of the state of world fishery resources: marine fisheries**. Fisheries Circular No. 920, Rome. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/003/W4248E/w4248e00.htm> (acessado em 08/2014).

GODFRAY, H. C. J. Challenges for taxonomy- the discipline will have to reinvent itself if it is to survive and flourish. **Nature**. n. 417, p. 17-19, 2002.

GUERRA-GARCÍA, J. M.; ESPINOSA, F.; GARCÍA-GÓMEZ. Trends in taxonomy today: an overview about the main topics in taxonomy. **Zoologica Baetica**. n. 19, p. 15-49, 2008.

HEBERT, P. D. N., et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 270, p. 313-321, 2003.

HUBERT, N., et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**. v. 3, n. 6, p. 2490, 2008.

KNOWLTON, N. Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea. *Marine Genetics*. **Developments on Hydrobiology**. n. 144, p. 73-90, 2000.

MOURA, T., et al. Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation. **Marine and Freshwater Research**. n. 59, p. 214-223, 2008.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**. n. 42, p. 367-83, 2004.

VICTOR, B. C. Three new endemic cryptic species revealed by DNA barcoding of the gobies of the Cayman Islands (Teleostei: Gobiidae). **Journal of the Ocean Science Foundation**. n. 12, p. 25-60, 2014.

TAYLOR, H. R.; HARRYS, W. E. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**. n. 12, p. 377-388, 2012.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia utilizando dados morfológicos

A taxonomia, ciência que se dedica a descobrir, descrever, nomear e identificar espécies e outros táxons (GUERRA-GARCÍA et al., 2008; PIRES e MARINONI, 2010), teve sua origem na Grécia antiga (com a primeira classificação básica de Aristóteles), porém o sistema binominal utilizado atualmente foi proposto por Linnaeus em 1758 (GODFRAY, 2002). Regras utilizadas para classificar os seres vivos foram introduzidas no século XIX e são constantemente monitoradas por comissões internacionais de cientistas (TAUTZ et al., 2003), de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura. Porém, essa classificação não constitui apenas a atribuição de regras de nomenclatura, mas sim a elaboração de uma hipótese, onde um determinado conjunto de caracteres é utilizado para delimitar uma entidade (espécie) com características biológicas próprias e histórias evolutivas independentes de outras entidades biológicas similares (HENRIQUES, 2010). Assim, informações sobre a taxonomia e diversidade dos organismos são resumidas em catálogos, necessários para evitar descrições equivocadas ou ambiguidade na nomenclatura utilizada em estudos biológicos ou de conservação (LÖBL, 2014).

A crise taxonômica, em destaque nos últimos anos é marcada pela falta de popularidade (desinteresse pela formação taxonômica) e de incentivos financeiros (PIRES e MARINONI, 2010). A taxonomia está sofrendo uma grande escassez de recursos (GUERRA-GARCÍA, 2008), sendo que o financiamento para a taxonomia não é suficiente, e muitas vezes, é desviado para estudos filogenéticos (WHEELER, 2004; GUERRA-GARCÍA, 2008).

Historicamente, dados morfológicos foram utilizados para a taxonomia, porém a identificação de espécies com base apenas na morfologia pode apresentar algumas limitações: plasticidade fenotípica pode dificultar a delimitação de espécies; espécies crípticas não podem ser detectadas; chaves de identificação não contemplam todos os estágios de vida das espécies, e muitas delas precisam ser utilizadas por taxonomistas especialistas, entre outros (HEBERT et al., 2003a; KRISHNAMURTHY & FRANCIS,

2012). Em grupos megadiversos, com grande variação ontogenética durante seu desenvolvimento e dimorfismo sexual, como os peixes, a identificação apenas morfológica é um trabalho muito árduo (HUBERT et al., 2008), entretanto, a utilização de uma abordagem molecular nos últimos anos vem auxiliando na taxonomia deste grupo (LIMA et al., 2005; CABALLERO et al., 2012; VICTOR, 2014).

2.2 Taxonomia utilizando dados moleculares: a abordagem do DNA *barcode*

Herbert e colaboradores (2003a) propuseram o protocolo do DNA *barcode* para catalogar a biodiversidade mundial. Este novo sistema foi desenvolvido para fornecer um método de delimitação de espécies rápido e acurado através da utilização de pequenos fragmentos de genes padronizados que serviriam como um código de barras específico para cada espécie. O conceito de DNA *barcoding* tornou-se uma dos mais importantes e significativos métodos da última década, ganhando popularidade em todo o mundo (TRIVEDI et al., 2015). Este sistema baseia-se na informação contida em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), inicialmente proposto como DNA *barcode* para espécies animais (HEBERT et al., 2003a). Assim como outros genes codificadores de proteínas, sua terceira posição de nucleotídeos mostra uma alta incidência de substituições de bases, levando a uma taxa de evolução molecular que é cerca de três vezes maior do que a dos genes mitocondriais estruturais tais como os genes ribossomais 12S e 16S (KNOWLTON e WEIGT, 1998). A diversidade de nucleotídeos do DNA *barcode* mostra-se informativa a nível interespecífico (como por exemplo, para discriminação de espécies filogeneticamente próximas) (HERBERT et al., 2003a), mas também intraespecífico (abordagens filogeográficas, por exemplo) (COX e HERBERT, 2001).

Para garantir um caráter de sistema global e unificado de identificação dos organismos, espécimes testemunhos devem ser obrigatoriamente mantidos em coleções, pois fornecem documentação permanente para investigação da biodiversidade (ALI et al., 2014). Além disso, a padronização do DNA *barcode* deve incluir além das variáveis técnicas (mesmo fragmento de DNA), os mesmos

métodos de análise (HEBERT et al., 2003 a,b; RIBEIRO et al., 2012). Desse modo, para a análise de dados do *barcode* o algoritmo de Neighbour-Joining é utilizado para representar graficamente as distâncias genéticas totais entre os indivíduos ou entre os grupos utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2-Parâmetros (K2P) (HEBERT et al., 2003a; CASIRAGHI, 2010). Este modelo evolutivo distingue dois tipos de substituições: transições (quando uma purina é substituída por outra purina [A <-> G], ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina [T <-> C]); e transversões (quando uma purina é substituída por uma pirimidina, ou vice-versa [A ou G <-> T ou C]) e assume taxas de substituição diferentes entre estes dois tipos de substituições, isto é, para cada transição há duas vezes mais transversões (KIMURA, 1980).

Estudos utilizando o sistema *barcode* têm utilizado uma divergência de 2% como um valor limiar de corte (*threshold*) para a delimitação de espécies (HUBERT et al., 2008; ROSSO et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Este valor de corte é baseado na informação de aproximadamente 226.833 espécies que já foram analisadas quanto sua divergência intraespecífica e que se encontram disponíveis no *Barcode of Life Data System* (BOLD, www.boldsystems.org). Uma dissimilaridade genética menor que 2% entre duas sequências seria indicativo que estes táxons pertencem a mesma espécie. Em contraste, quando uma divergência for maior que 2%, as chances de pertencerem a mesma espécie caem a 1% (WARD, 2009). O *barcoding gap* é a existência de uma média de distância genética interespecífica que seja pelo menos 10x maior que a distância genética intraespecífica (HEBERT et al., 2004). Se detectada, essa diferença pode comprovar que a identificação de espécies através do DNA *barcode* é confiável (HEBERT et al., 2003a; HEBERT et al., 2004)

A partir de 2004, bancos de dados de sequências de DNA *barcode* tais como *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL, <http://www.barcodeoflife.org/>), *Barcode of Life Data System* (BOLD, <http://www.boldsystems.org/>) foram desenvolvidas. Ademais, bancos de dados de sequências de DNA *barcode* para grupos específicos, como o *Fish Barcode of Life* (FishBOL, <http://www.fishbol.org>) e o *Shark Barcode of Life* (SHARK-BOL, <http://www.sharkbol.org>) ou para países

específicos tais como *Canadian Barcode of Life Network* (BOLNET.ca) e o *Brazilian Barcode of Life* (BrBOL) foram também desenvolvidas. Ainda, houve a formação de grupos de pesquisa temáticos, como de saúde humana (HealthBOL) e de biodiversidade polar (PolarBOL) (TRIVEDI et al., 2015). A existência destas bibliotecas genômicas de sequências de DNA *barcode* produzidas a partir de espécimes previamente identificados permite a verificação específica de outros indivíduos a partir de qualquer tecido vivo ou conservado, de forma rápida e precisa, aumentando assim a nossa capacidade de inventariar a diversidade de organismos na natureza (VAN DER BERG, 2005).

Uma descoberta valiosa desta nova abordagem é sua capacidade de detectar diversidade críptica (RUBINOFF et al., 2006; KRISHNAMURTHY e FRANCIS, 2012; VICTOR, 2014; TRIVEDI et al., 2015). Divergências genéticas maiores que 2% entre espécimes pertencentes à mesma espécie geralmente indicam a existência de espécies crípticas (táxons que não podem ser distinguidos morfologicamente apesar de apresentarem histórias evolutivas distintas) (KERR et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). Estudos realizados com DNA *barcode* já revelaram a existência de várias espécies crípticas em crustáceos (BARBER e BOYCE, 2006), peixes (GRIFFITHS et al., 2010; BALDWIN et al., 2011; LANDI et al., 2014; VICTOR, 2014), salamandras (BAEK et al., 2011) e aves (KERR et al., 2007). Assim, o uso do DNA *barcode* pode ser apontado como o primeiro passo para a descoberta de novas espécies, já que aponta a presença de espécies crípticas que quando submetidas a estudos filogenéticos, podem revelar novas espécies (COSTION et al. 2011; KRESS et al., 2015).

Em estudos com peixes, o DNA *barcode* pode ser utilizado na identificação acurada das espécies, um ponto crítico para a construção de planos de conservação e pesca (FAO, 1997). Pela forma como são processados, estes animais podem perder caracteres morfológicos diagnósticos. Isso favorece o comércio ilegal de espécies, pois os peixes podem ser vendidos sob o nome de uma espécie similar cuja pesca é legal (WONG e HANNER, 2008). Filés de peixe são classificados erroneamente para fins comerciais ou para disfarçar captura ilegal (CARVALHO et al., 2011b), mas informações dadas aos consumidores precisam ser claras e acuradas para que estes possam escolher o alimento ideal e pagar um preço justo (WOOLFE e PRIMROSE, 2004).

Assim, este método também é útil na detecção de fraudes alimentares, já que pode elucidar casos em que várias espécies são comercializadas com o nome de uma única espécie (PRIMROSE et al., 2010; CARVALHO et al., 2011b; HANNER et al., 2011). Para a conservação, o DNA *barcode* pode ajudar na identificação, monitoramento e controle de captura de espécies ilegais ou ameaçadas de extinção (WARD et al., 2008b; VARGAS et al., 2009; ALFONSI et al., 2013).

Várias críticas foram feitas à utilização do DNA *barcode*, e algumas limitações deste método têm sido apontadas. Por exemplo, a caracterização imprecisa do que constitui uma espécie causada por padrões localizados ou inesperados de variação de nucleotídeos; o não fornecimento de informações evolutivas sobre táxons, dando apenas um “sim” ou “não” sobre a identificação das espécies, por se basear em similaridade total (MORITZ e CICERO, 2004; RUBINOFF, 2006; KRISHNAMURTHY e FRANCIS, 2012). Ainda, a subestimação do número de espécies devido a um intenso compartilhamento de haplótipos do DNA mitocondrial (WHITWORTH et al., 2007); superestimação do número de espécies pela formação de grupos sem significado biológico (BROWER, 2006). Além disso, os limites entre espécies podem tornar-se confusos sob o ponto de vista apenas do DNA mitocondrial, devido à sua herança matrilineal, a paralogia resultante da transferência de genes mitocondriais para o núcleo e a introgressão após eventos de hibridização (STOECKLE, 2003; MORITZ e CICERO, 2004; RUBINOFF, 2006).

A abordagem do DNA *barcode* utilizando o COI parece não ser eficaz para alguns grupos taxonômicos, e por isso, a utilização de outros genes tem sido utilizados. Como ferramenta para identificação de gramíneas marinhas e fitoplâncton, os genes *rbcl*, *matK*, *ITS1*, *ITS2* vem sendo testados (UCHIMURA et al., 2008; LUCAS et al., 2012; BHATTACHARJEE et al., 2013). Para algas marinhas, além do COI, os genes 16S rRNA e 23S rRNA e o amplicon de plastídeo universal (UPA) já se mostraram eficazes na discriminação das espécies deste grupo (CLARKSTON e SAUNDERS, 2010; AHMAD et al., 2013; XIAOBO et al., 2013). Nematódeos puderam ser corretamente discriminados pela utilização do gene ribossomal 18S (BHADURYL et al., 2006). Para anfíbios, a amplificação do gene mitocondrial ribossomal 16S mostrou

maior eficiência do que o COI, pois enquanto o 16S rRNA apresenta um sucesso de amplificação de 100%, o COI apresenta taxas de sucesso de 50-70% (VENCES et al., 2005). Taxas de evolução de sequências de DNA mitocondrial em outros eucariontes, como fungos e plantas, são mais lentas (KRESS e ERICKSON, 2012). Os genes ribossomais nucleares ITS e LSU D1/D2 tem sido mais amplamente utilizados para a identificação de fungos dos mais diversos ambientes (KRESS e ERICKSON, 2012). Em plantas, outras regiões do genoma plastidial, como *rbcL*, *matK*, e ainda *trnH-psbA* foram estabelecidas como regiões mais promissoras para serem utilizadas como o DNA *barcode* (NEWMASTER et al., 2006; KRESS et al., 2009; KRESS e ERICKSON, 2012).

Apesar do COI não ser eficiente para os grupos supracitados, o método de *DNA barcode* como originalmente descrito, por outro lado, tem se mostrado eficiente para discriminar espécies de diversos grupos taxonômicos, contribuindo desse modo para as pesquisas de taxonomia e biodiversidade. Este sistema já foi eficiente em revelar grande diversidade de microorganismos dinoflagelados marinhos (STERN et al., 2010). Para zooplânctons marinhos, um estudo realizado com quatro genes (COI, 12S, 28S e o nuclear ITS) demonstrou que todos foram eficazes na discriminação do grupo, mas apenas o COI concordou com os grupos definidos morfologicamente (MACHIDA et al., 2010). Invertebrados, tais como equinodermas (WARD et al., 2008a), esponjas (VARGAS et al., 2012), aranhas (PRENDINI, 2005), camarões (BARBER e BOYCE, 2006), mosquitos (KUMAR et al., 2007), borboletas (DINCĂ et al., 2011) e libélulas (KARTHIKA et al., 2012), foram analisados quanto ao COI e ao método e estes foram informativos e eficazes. A discriminação de espécies de ascídias e a descoberta de uma nova espécie neste grupo puderam ser realizadas pela utilização do COI (HIROSE e HIROSE, 2009; SMITH et al., 2012). Estudos realizados com répteis marinhos demonstraram que, além da correta discriminação de espécies, o COI como DNA *barcode* é útil para pesquisas de biodiversidade, genética forense e de conservação (NARO-MACIEL et al., 2010; NAGY et al., 2012). Também para aves este sistema tem se mostrado eficaz, já tendo sido disponibilizadas sequências *barcode* para 40.326 espécimes, de acordo com o BOLD. Em relação a mamíferos, esforços para construir bibliotecas genômicas resultaram em mais de 67 mil sequências de COI disponíveis no BOLD.

Para a biodiversidade marinha, o DNA *barcode* tem recebido muita atenção. O COI e sua análise analítica podem efetivamente associar estágios larvais de espécies de diversos grupos marinhos, possibilitando resolver o ciclo de vida de várias espécies, o que em muitos casos é impossível com a utilização de taxonomia tradicional (MOLNAR et al., 2008). Para peixes, o DNA *barcode* é útil na identificação de larvas, ovos, barbatanas e filés de pescados (TRIVEDI et al., 2015), já havendo sequências *barcode* disponíveis para 14.541 espécies de peixes no BOLD, o que representa quase 50% das mais de 33.000 espécies de peixes conhecidas atualmente (ESCHMEYER, 2015). E a identificação acurada de espécies é o primeiro passo para o desenvolvimento de um manejo sustentável da pesca e para a autenticação de produtos alimentares (TRIVEDI et al., 2015).

Muitos estudos corroboram a efetividade do *barcode* para discriminar espécies, tanto em ambiente de água doce como marinho (tanto no oceano Atlântico, quanto no Índico e Pacífico, Tabela 1). A Província Tropical Brasileira se estende desde a foz do rio Amazonas ao sul do Estado de Santa Catarina, no Brasil e é delimitada com base na distribuição e endemismo de espécies de peixes (BRIGGS e BOWEN, 2012). No Brasil, a abordagem do DNA *barcode* foi somente testada em ambiente marinho no Estado de São Paulo (RIBEIRO et al., 2012), o qual pôde contemplar 135 espécies. Considerando as 79 espécies que puderam ser analisadas neste trabalho, 45 delas também estão presentes no trabalho realizado no sudeste do Brasil (RIBEIRO et al., 2012), sendo que 57% dessas espécies ainda não foram estudadas na costa brasileira.

Tabela 1. Exemplos de estudos com peixes utilizando a abordagem do DNA *barcode*

Ambiente	Localidade	Espécies inclusas	Eficácia na discriminação	Amplitude geográfica	Referência
Água doce	México	31	79,2%	510 km	MEJIA et al., 2012
Água doce	Austrália	190	95%		HUBERT et al., 2008
Marinho	Filipinas	23	100%	25 km	AQUILINO et al., 2011
Marinho	Argentina	125	95,2%	2.077 km	MABRAGAÑA et al., 2011
Marinho	China	95	89,5%	1.428 km	WANG et al., 2012
Marinho	Canadá	391	98%	202.000 km	STEINKE et al., 2009
Marinho	Austrália	207	100%	25.760 km	WARD et al., 2005
Água doce	Brasil	58	100%	90 km	PEREIRA et al., 2011
Água doce	Brasil	252	99,2%	1.070 km	PEREIRA et al., 2013
Água doce	Brasil	97	96%	3.941 km	CARVALHO et al., 2011a
Marinho	Brasil	135	97%	400 km	RIBEIRO et al., 2012

Fonte: Matias, 2015

Mesmo podendo não ser capaz de identificar toda a diversidade global (como nenhum outro método é), o DNA *barcode* é pouco ambíguo, sendo assim eficiente na correta discriminação de espécies. Para peixes, um grupo tão diverso e com grande modificação morfológica durante seu desenvolvimento (HUBERT et al., 2008), esta abordagem tem sido útil na detecção de espécies crípticas (KRISHNAMURTHY e FRANCIS, 2012; VICTOR, 2014) e prevenção de fraudes comerciais, contribuindo para a construção de políticas públicas (CARVALHO et al., 2011b), e, à medida que mais sequências são adicionadas aos bancos de dados de sequências *barcode*, a realização de estudos em diversos âmbitos, tais como evolução e conservação, se tornarão mais comuns.

2.3 Diversidade de peixes

Peixes representam 50% da diversidade atual de vertebrados (MIRANDA, 2012). Já foram feitas descrições de aproximadamente 27.977 espécies de peixes comparadas a 26.734 tetrápodes (NELSON, 2006). Números mais atuais estimam

aproximadamente 33.433 espécies marinhas e de água doce (ESCHMEYER, 2015). Estes animais vivem em praticamente todos os ambientes aquáticos, podendo sobreviver em ambientes de baixa ou alta profundidade, em lagos com alto nível de radiação, em áreas subterrâneas, ambientes com escassez de água e de temperaturas extremas (lagos com temperatura acima de 42°C ou em camadas de gelo com menos de -2°C). Além disso, podem habitar uma grande faixa de salinidade, oxigenação e disponibilidade de alimento (LOWE-MCCONNEL, 1999; NELSON, 2006; GONZALÉZ-ORTEGÓN et al., 2015).

A gama de informações que se conhece a respeito deste grupo é vasta e inclui diversos ramos da biologia. Devido à sua grande diversidade morfológica, quanto ao tamanho e forma do corpo, padrões de coloração, formato de escamas e nadadeiras somadas a grande diversidade de representantes, sua classificação pode se tornar difícil (NELSON, 2006; TAYLOR e HARRYS, 2012). Durante a história da ictiologia numerosas classificações foram propostas (NELSON, 2006), e vários guias e chaves de identificação foram elaborados para os diferentes grupos de peixes (MENEZES e FIGUEIREDO, 1985; CERVIGÓN, 1993; CARPENTER, 2002 a, b, entre outros), no intuito de facilitar as identificações. Ainda, duas iniciativas internacionais vem facilitando o compartilhamento de informações sobre os peixes, o Catalog of Fishes (ESCHMEYER, 2015), com origem na década de 1980, que inclui informações sobre a taxonomia de peixes e outros dados (como evolutivos e ecológicos) e o FishBase (<http://www.fishbase.org>), um banco de dados que inclui informações sobre peixes em todas as áreas da biologia (ESCHMEYER et al., 2010; FROESE e PAULY, 2014).

Abordagens moleculares podem ser utilizadas para acelerar a catalogação da biodiversidade, servir de base para revisões acerca do status taxonômico das espécies, e ainda, revelar fraudes alimentares (KNOWLTON, 2000). Adicionalmente, muitos táxons têm sido descritos e validados a partir da utilização de dados moleculares (LIMA et al., 2005; RANDALL et al., 2007; CABALLERO et al., 2012; JACOBINA et al., 2013; VICTOR, 2014). Por exemplo, foi detectada diversidade críptica em uma espécie de gobídeo filtrador utilizando aloenzimas e citocromo b, e em uma espécie de raia criticamente ameaçada pela utilização de microssatélites e da região controle (LIMA et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2010). A filogenia molecular de garoupas da subfamília

Epinephelinae (Serranidae) foi reconstruída utilizando os genes nucleares Tmo-4C4 e Histona H3 e os genes mitocondriais 16S e 12S e os resultados não sustentaram o monofiletismo de Serranidae (CRAIG e HASTINGS, 2007) desafiando assim a taxonomia do grupo. Além disso, através da filogenia molecular, foi possível elucidar as relações taxonômicas entre membros da família Chaetodontidae, utilizando os fragmentos mitocondriais subunidade ribossomal (rrnS) e citocromo b, e evidenciando quais destes agrupamentos já propostos constituem grupos monofiléticos (LITTLEWOOD et al., 2004), entre outros.

Os ecossistemas costeiros tropicais apresentam comunidades de peixes megadiversas caracterizadas por baixa abundância, alto endemismo e elevados níveis de especialização (BATISTA et al., 2014), se comparados à ambientes temperados. Ainda falta muito para termos inventários suficientes de muitas espécies marinhas, e os censos são especialmente deficientes para os sistemas tropicais (MORA et al., 2008). A Região Tropical Atlântica Ocidental apresenta quatro províncias: Carolina, Caribenha, Brasileira e Argentina (BRIGGS e BOWEN, 2012). Dentre estas, a Província Caribenha é considerada o maior *hotspot* de espécies, com 33% de espécies de peixes recifais endêmicas (FLOETER et al., 2008). A Província Tropical Brasileira, apesar de não ser um *hotspot*, apresenta baixa abundância e alta endemidade de peixes quando comparada com as outras províncias tropicais, tornando-a extremamente vulnerável (BATISTA et al., 2014). Somado a isso, as áreas costeiras brasileiras passaram por um forte processo de urbanização após a expansão industrial em meados da década de 1950. Assim, grandes áreas costeiras têm mostrado sinais do impacto e da degradação, especialmente devido ao acúmulo de resíduos domésticos e industriais, ao turismo e à pesca (DIEGUES, 1999; ILARRI et al., 2008; BATISTA et al., 2014).

2.4 Atividade Pesqueira e o manejo da pesca

O aumento do comércio global de peixes tem gerado mais renda do que nunca, estima-se que a produção pesqueira mundial tenha atingido um novo recorde em 2013, com 160 milhões de toneladas (FAO, 2014). Aproximadamente 52% dos recursos pesqueiros marinhos do mundo estão totalmente explorados, ou atingiram o máximo

admissível para a pesca, enquanto que outros 28% dos estoques são sobrepescados, esgotados ou em via de recuperação (FAO, 2007). Tal fato é extremamente preocupante quando consideramos que durante as últimas três décadas o número de pescadores e de piscicultores progrediu mais rapidamente que a população mundial (FAO, 2007). Somado a isso, nas últimas décadas, a captura de espécies que não são alvo da pesca, conhecidas como fauna acompanhante se tornou uma questão importante na gestão e conservação da pesca global, com especial preocupação para a captura de espécies vulneráveis, a exemplo de espécies de tubarões (FERNANDEZ-CARVALHO, 2015).

A pesca excessiva é um fenômeno global que pode levar os estoques a níveis preocupantes (FAO, 2009). Com a crescente demanda e captura dos recursos pesqueiros, sua comercialização tem sido alvo de medidas que buscam regulamentar, fiscalizar e identificar corretamente as espécies de peixes de interesse comercial (WOOLFE e PRIMROSE, 2004). A regulamentação é necessária para controlar a exploração de peixes e prevenir a diminuição dos estoques (PAULY et al., 2002). A caracterização da pesca comercial é etapa preliminar para viabilizar uma gestão factível e sustentável dos recursos pesqueiros (SOUZA, 2012). Pela forma como os peixes são processados, acabam perdendo caracteres morfológicos diagnósticos, o que dificulta sua identificação, geralmente baseada em caracteres morfológicos. Desse modo o comércio ilegal de espécies é favorecido, já que podem ser vendidas com o nome de uma espécie similar que não esteja na mesma categoria de restrição de coleta (WONG e HANNER, 2008). Portanto, a identificação acurada das espécies é um ponto extremamente crítico para a construção de planos de conservação e pesca (FAO, 1997).

A pesca artesanal implica um grau de simplicidade ou tradição nos métodos de pesca escolhidos (por exemplo, armadilhas, venenos, arpões, iscas, linhas e redes de mão) (BATISTA et al., 2014). Esta prática de pesca é reconhecida em todo o mundo, sendo especialmente importante na região costeira tropical devido a alta densidade populacional nestas áreas e a dependência destes recursos naturais como forma de renda e alimentação para muitas comunidades (ALLISON e ELLIS, 2001). Na costa do

Nordeste Brasileiro, Província Tropical Brasileira (BRIGGS e BOWEN, 2012), a pesca é essencialmente artesanal, já tendo representado 28,8% da produção nacional (CASTELLO, 2010). Como a pesca representa um papel cultural muito forte nessas comunidades costeiras, a população a torna parte de sua identidade cultural, isso dificulta a sua gestão, uma vez que políticas e mecanismos de controle para esta gestão precisam ser sensíveis aos fatores locais (BATISTA et al., 2014). Adicionalmente, avaliar os impactos desta pesca é extremamente difícil pela alta diversidade de estratégias de exploração (multi-arte), baixa taxa de descarte, gerando exploração de uma alta gama de espécies de baixa abundância (BATISTA et al., 2014).

O projeto *Subsídios para o desenvolvimento de indicadores do estado de pesca artesanal* (SINPESCA) com atuação no Estado de Alagoas, Nordeste Brasileiro, foi desenvolvido visando, entre outras coisas, compreender e modelar a disponibilidade de recursos pesqueiros, viabilizando a regularidade do fornecimento do pescado. Para embasar o rastreamento do pescado e a identificação de estoques, o emprego da metodologia do DNA *barcode* foi sugerida uma vez que das 180 espécies de peixes marinhos, pertencentes a 67 famílias já catalogadas para esta região (RANGELY et al., 2010; TIBURTINO, 2011; GRANDE, 2012; SOUZA, 2012), 123 espécies de 49 famílias representam espécies alvo para pesca ou vem sendo capturadas como fauna acompanhante (RANGELY et al., 2010; TIBURTINO, 2011; SOUZA, 2012). Desse modo, o presente estudo utiliza o método do DNA *barcode* para dimensionar a diversidade de peixes do Nordeste Brasileiro da Província Tropical Brasileira. Os dois aparelhos utilizados para a coleta de peixes para este estudo foram os mesmos empregados pelos pescadores locais e assim, a maioria dos peixes caracterizados com o DNA *barcode* são aqueles capturados pela pesca artesanal. Como o método de DNA *barcode* tem sido muito eficaz na discriminação de espécies de peixes em outras partes do mundo, espera-se que estes dados aqui gerados possam 1) dimensionar a diversidade de peixes utilizando dados moleculares (verificar se existe espécies crípticas por exemplo) 2) servir como referência para evitar fraudes e a captura ilegal de espécies 3) fornecer base que possa auxiliar no manejo sustentável dos estoques pesqueiros.

Referências

- AHMAD, I.; FATMA, Z.; YAZDANI, S. S. DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel. **Algal Research**. n. 2, p. 10-15, 2013.
- ALFONSI, E.; MÉHEUST, E.; FUCHS, S. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. **Zookeys**. n. 365, p. 5-24, 2013.
- ALI, M.A.; GYULAI, G.; HIDVEGI, N. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. **Saudi Journal of Biological Sciences**. n. 21, p. 204–231, 2014.
- ALLISON, E. H.; ELLIS, F. The livelihood approach and management of small-scale fisheries. **Marine Policy**. n. 25, p. 377–388, 2001.
- AQUILINO, S. V. L., et al. DNA barcoding of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. **Molecular Ecology Resources**. n. 11, p. 612–619, 2011.
- BAEK, H. J., et al. Species identification of a new candidate taxon HC2 (Caudata: Hynobiidae) using mitochondrial CO1 gene. **Korean Journal of Herpetology**. n. 3, p. 25-32, 2011.
- BALDWIN, C.C., et al. Seven new species within western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (Teleostei, Labrisomidae), with comments on congruence of DNA barcodes and species. **ZooKeys**. n. 79, p. 21–72, 2011.
- BARBER, P.; BOYCE, S. L. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 273, p. 2053-2061, 2006.
- BATISTA, V. S., et al. Tropical Artisanal Coastal Fisheries: Challenges and Future Directions. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**. v. 22, n. 1, p. 1-15, 2014.
- BHADURYL, P., et al. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. **Marine Ecology Progress Series**. n. 320, p. 1–9, 2006.
- BHATTACHARJEE, D.; SAMANTA, B.; DANDA, A. A. Temporal Succession of Phytoplankton Assemblages in a Tidal Creek System of the Sundarbans Mangroves: An Integrated Approach. **International Journal of Biodiversity**. n. 2013, p. 1-15, 2013.
- BRIGGS, J. C.; BOWEN, B. W. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. **Journal of Biogeography**. n. 39, p. 12-30, 2012.
- BROWER, A. V. Z. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). **Systematics and Biodiversity**. v. 4, n. 2, p. 127-132, 2006.

- CABALLERO, S., et al. Application of multiplex PCR approaches for shark molecular identification: feasibility and applications for fisheries management and conservation in the Eastern Tropical Pacific. **Molecular Ecology Resources**. n. 12, p. 233-237, 2012.
- CARPENTER, K. E. **The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae)**. FAO, Rome, 2002a.
- CARPENTER, K. E. **The living marine resources of the Eastern Central Atlantic. Volume 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), Sea turtles and marine mammals**. FAO, Rome, 2002b.
- CARVALHO, D. C., et al. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**. v. 22, n. S1, p. 80–86, 2011a.
- CARVALHO, D. C., et al. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. **Mitochondrial DNA**. v. 22, n. S1, p. 97-105, 2011b.
- CASIRAGHI, M., et al. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. **Briefings in Bioinformatics**. v. 11, n. 4, p. 440-53, 2010.
- CASTELLO, J.P. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: a pesca costeira. **Ciência e Cultura**. São Paulo. v. 62, n. 3, 2010.
- CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. 2ª. Ed. Caracas: Fundación Científica Los Roques, 1993.
- CLARKSTON, B. E., SAUNDERS, G. W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthoratimburtonii* sp. **Botany**. n. 88, p. 119-131, 2010.
- COSTION, C., et al. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. **PloS ONE**. n. 6, p. 26841, 2011.
- COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Molecular Ecology**. n. 10, p. 371-386, 2001.
- CRAIG, M. T.; HASTINGS, P. A. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. **Ichthyological Research**. n. 54, p. 1-17, 2007.
- DIEGUES, A. C. Human populations and coastal wetlands: conservation and management in Brazil. **Ocean & Coastal Management**. n. 42, p. 187-201, 1999.

DINCÃ, V., et al. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 278, p. 347-355, 2011.

ESCHMEYER, W. N., et al. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**. n. 2525, p. 19-50, 2010.

ESCHMEYER, W. N. (Ed.). **CATALOG OF FISHES: Genera, species, references**. Disponível em:

<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

FAO. **Climate change implications for fisheries and aquaculture. Overview of current scientific knowledge**. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Roma. Press. p. 221, 2009.

FAO. **Review of the state of world fishery resources: marine fisheries**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries Circular No. 920, Rome. 1997. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/W4248E/w4248e00.htm>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

FAO. **Pesca e Aquicultura**. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Roma, Itália. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2015.

FAO. **Comércio global de peixes atinge níveis recordes**. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Roma, Itália, 2014. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>>. Acesso em: 03 abr. 2015.

FERNANDEZ-CARVALHO, J., et al. Effects of hook and bait in a tropical northeast Atlantic pelagic longline fishery: Part II- Target, bycatch and discard fishes. **Fisheries Research**. n. 164, p. 312-321, 2015.

FERREIRA, B. P.; MAIDA, M.; CAVA, F. Características e perspectivas para o manejo da pesca na APA marinha Costa dos Corais. **Anais do II Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação**. Campo Grande, MS. p. 50-58, 2001.

FLOETER, S.R., et al. Atlantic reef fish biogeography and evolution. **Journal of Biogeography**. n. 35, p. 22-47, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). **FishBase. World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: 11 nov. 2014.

GODFRAY, H. C. J. Challenges for taxonomy- the discipline will have to reinvent itself if it is to survive and flourish. **Nature**. n. 417, p. 17-19, 2002.

GONZÁLEZ-ORTEGÓN, E., et al. Freshwater scarcity effects on the aquatic macrofauna of a European Mediterranean- climate estuary. **Science of the Total Environment**. n. 503, p. 213-221, 2015.

GRANDE, H. **A influência de variáveis ambientais na distribuição espacial local em comunidade de peixes de recife costeiros do nordeste do Brasil**. Dissertação (mestrado)– Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

GRIFFITHS, A. M., et al. Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturusbatis*). **Proceedings of the Royal Society**. n. 277, p. 1497-1503, 2010.

GUERRA-GARCÍA, J. M.; ESPINOSA, F.; GARCÍA-GÓMEZ. Trends in taxonomy today: an overview about the main topics in taxonomy. **Zoologica Baetica**. n. 19, p. 15-49, 2008.

HANNER, R.; BECKER, S.; IVANOVA, V. N. FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. **Mitochondrial DNA**. v. 22, n. S1, p. 106–122, 2011.

HEBERT, P. D. N., et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 270, p. S96-S99, 2003b.

HEBERT, P. D. N., et al. Identification of birds through DNA barcodes. **Plos Biology**. n. 2, p. 1657–1663, 2004.

HENRIQUES, J. F. **Identificação molecular (DNA barcode) dos peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo**. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.

HIROSE, M.; HIROSE, E. DNA Barcoding in Photosymbiotic Species of *Diplosoma* (Ascidiacea Didemnidae), with the Description of a New Species from the Southern Ryukyus. **Japanese Zoological Sciences**. v. 26, n. 8, p. 564-568, 2009.

HUBERT, N., et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**. v. 3, n. 6, p. e2490, 2008.

ILARRI, M. I., et al. Effects of tourist visitation and supplementary feeding on fish assemblage composition on a tropical reef in the Southwestern Atlantic. **Neotropical Ichthyology**. v. 6, n. 4, p. 651- 656, 2008.

JACOBINA, U. P., et al. Atlantic moonfishes: independent pathways of karyotypic and morphological differentiation. **Helgoland Marine Research**. n. 67, p. 499-506, 2013.

KARTHIKA, P., et al. DNA barcoding of selected dragonfly species (Libellulidae and Aeshnidae) for species authentication with phylogenetic assessment. **European Journal of Experimental Biology**. v. 2, n. 6, p. 2158-2165, 2012.

KERR, K. C. R., et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**. n. 7, p. 535-543, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. n. 16, p. 111-120, 1980.

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 265, p. 2257-2263, 1998.

KNOWLTON, N. Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea. Marine Genetics. **Developments on Hydrobiology**. n. 144, p. 73-90, 2000.

KRESS, W. J., et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **PNAS**. v. 106, n. 48, p. 18621-18626, 2009.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes, methods and protocols. Methods in molecular biology. **Humana Press**. London, UK. p. 470, 2012.

KRESS, W. J., et al. DNA barcode for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 30, n. 1, p. 25-35, 2015.

KRISHNAMURTHY, K.; FRANCIS, R. A. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. **Biodiversity Conservation**. n. 21, p. 1901-1919, 2012.

KUMAR, N. P., et al. DNA barcodes can distinguish species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 44, n. 1, p. 1-7, 2007.

LANDI, M., et al. DNA barcoding for species assignment: the case of mediterranean marine fishes. **Plos One**. v. 9, n. 9, p. 1-9, 2014.

LIMA, D., et al. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. p. 1-13, 2005.

LITTLEWOOD, D. T., et al. Molecular phylogenetics of *Chaetodon* and the Chaetodontidae (Teleostei: Perciformes) with reference to morphology. **Zootaxa**. n. 779, p.1-20, 2004.

LÖBL, I. Overestimation of molecular and modelling methods and underestimation of traditional taxonomy leads to real problems in assessing and handling of the world's biodiversity. **Zootaxa**. v. 3768, n. 4, p. 497-500, 2014.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes neotropicais**. Base 3. São Paulo: EDUSP, 1999.

- LUCAS, C.; THANGARADJOU, T.; PAPENBROCK, J. Development of a DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but Not Simple. **PLoS ONE**. v. 7, n. 1, p. 29987, 2012.
- MABRAGAÑA, E., et al. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. **PLoS ONE**. n. 6, p. 28655, 2011.
- MACHIDA, R.J.; TSUDA, A. Dissimilarity of Species and Forms of Planktonic *Neocalanus* Copepods Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. **PLoS ONE**. v. 5, n. 4, p. 10278, 2010.
- MEJÍA, O.; LEÓN-ROMERO, Y.; SOTO-GALERA, E. DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. **Mitochondrial DNA**. n. 23, p. 471–476, 2012.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil V**. Teleostei (4). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, Brazil. p.105, 1985.
- MIRANDA, J. C. Ameaça aos peixes de riachos de Mata Atlântica. **Natureza on line**. v. 10, n. 3, p. 136-139, 2012.
- MORA, C., TITTENSOR, D.P., MYERS, R.A. The completeness of taxonomic inventories for describing the global diversity and distribution of marine fishes. **Proceedings of the Royal Society B**. n. 275, p. 149–155, 2008.
- MORA, C., et al. How many species are there on Earth and in the Ocean? **PLoS Biology**. v. 9, n. 8, p. 1027, 2011.
- MOLNAR, J.L.; GAMBOA, R.L.; REVENGA, C. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. **Frontiers in Ecology and Environment**. n. 6, p. 485-492, 2008.
- MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLoS Biology**. v. 2, n. 10, p. 1529-1531, 2004.
- NAGY, Z. T.; SONET, G.; GLAW, F. First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, Based on Newly Designed COI Primers. **PLoS ONE**. v. 7, n. 3, p. 34506, 2012.
- NARO-MACIEL, E.; REID, B.; FITZSIMMONS, N. N. DNA barcodes for globally threatened marine turtles: a registry approach to documenting biodiversity. **Molecular Ecology Resources**. n. 10, p. 252-263, 2010.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.

NEWMMASTER, S. G.; FAZEKAS, A. J.; RAGUPATHY, S. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. **Canadian Journal of Botany**. n. 84, p. 335-341, 2006.

PAULY, D., et al. Towards sustainability in world fisheries. **Nature**. n. 418, p. 689-695, 2002.

PEREIRA, L. H. G., et al. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**. v. 22, n. 1, p. 87–96, 2011.

PEREIRA, L. H. G., et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BioMed Central Genetics**. v. 14, n. 20, p. 1-14, 2013.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**. v. 10, n. 2, p. 339-346, 2010.

PRENDINI, L. Comment on: "Identifying spiders through DNA barcodes". **Canadian Journal of Zoology**. n. 83, p. 498-504, 2005.

PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**. n. 21, p. 582-590, 2010.

RANDALL, J. E.; WILLIAMS, J. T.; ROCHA, L. A. The Indo-Pacific tetraodontid fish *Canthigaster coronata*, a complex of three species. **Smithiana Bulletin**. n. 9, p. 3-13, 2007.

RANGELY, J., et al. Estratégias de pesca artesanal no litoral marinho alagoano (Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 36, n. 4, p. 263-275, 2010.

RIBEIRO, A. O., et al. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. **Molecular Ecology Resources**. v. 12, n. 6, p. 1012-1020, 2012.

ROSSO, J. J., et al. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**. v. 12, n. 6, p. 999-1011, 2012.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**. v. 20, n. 4, p. 1-8, 2006.

SMITH, K. F.; THIA, J.; GEMMILL, C. E. C. Barcoding of the cytochrome oxidase I (COI) indicates a recent introduction of *Cionasavignyi* into New Zealand and provides a rapid method for *Ciona* species discrimination. **Aquatic Invasions**. v. 7, n. 3, p. 305–313, 2012.

- SOUZA, C.D. **Efeitos de fatores ambientais na pesca costeira nos trópicos com rede de emalhe**. Dissertação (mestrado)– Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.
- STEINKE, D.; ZEMPLAK, T. S.; HEBERT, P. D. N. Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. **Plos One**. v. 4, n. 7, p. 1-5, 2009.
- STERN, R.F.; HORAK, A.; ANDREW, R.L. Environmental Barcoding Reveals Massive Dinoflagellate Diversity in Marine Environments. **PLoS ONE**. v. 5, n. 11, p. 13991, 2010.
- STOECKLE, M. Taxonomy, DNA and the barcode of life. **BioScience**. v. 53, n. 9, p. 2-3, 2003.
- TAUTZ, D., et al. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003.
- TAYLOR, H. R.; HARRYS, W. E. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**. n. 12, p. 377-388, 2012.
- TIBURTINO, C. **Atividade reprodutiva da ictiofauna acompanhante explorada pela pesca de emalhe no litoral central de Alagoas**. Dissertação (mestrado)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.
- TRIVEDI, S., et al. Role of DNA Barcoding in Marine Biodiversity Assessment and Conservation: An update. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.
- UCHIMURA, M., et al. A reassessment of Halophila species (Hydrocharitaceae) diversity with special reference to Japanese representatives. **Botanica Marina**. n. 51, p. 258–268, 2008.
- VAN DER BERG, C. 2005. **Bancos de DNA de plantas: notas técnicas**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1744>. Acesso em: 03 dez. 2014.
- VARGAS, S. M.; ARAÚJO, F .C.F.; SANTOS, F.R. DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, n. 3, p. 608-612, 2009.
- VARGAS, S.; SCHUSTER, A.; SACHER, K. Barcoding Sponges: An Overview Based on Comprehensive Sampling. **PLoS One**. v. 7, n. 7, p. 39345, 2012.
- VENCES, M., et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in the DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**. v. 2, n. 5, p. 1-12, 2005.
- VICTOR, B. C. Three new endemic cryptic species revealed by DNA barcoding of the gobies of the Cayman Islands (Teleostei: Gobiidae). **Journal of the Ocean Science Foundation**. n. 12, p. 25-60, 2014.

- WANG, Z. D., et al. DNA barcoding South China Sea fishes. **Mitochondrial DNA**. v. 23, n.5, p. 405–410, 2012.
- WARD, R. D., et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. n. 360, p. 1847-1857, 2005.
- WARD, R.D., HOLMES, B.H., O'HARA, T.D. DNA barcoding discriminates echinoderm species. **Molecular Ecology Resources**. n. 8, p. 1202-1211, 2008a.
- WARD, R. D., et al. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. **Marine and Freshwater Research**. n. 59, p. 57-71, 2008b.
- WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, n.4, p. 1077-1085, 2009.
- WHEELER, Q.D. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. n. 359, p. 571-583, 2004.
- WHITWORTH, T. L., et al. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). **Proceedings of the Royal Society B**. n. 274, p. 1731-1739, 2007.
- WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**. n. 22, p. 222-226, 2004.
- WONG, E.; HANNER, R. DNA *barcoding* detects market substitution in North American seafood. **Food Research International**. v. 41, n. 8, p. 828-837, 2008.
- XIAOBO, Z.; SHAOJUN, P.; TIFENG, S. Applications of Three DNA Barcodes in Assorting Intertidal Red Macroalgal Flora in Qingdao, China. **Journal of Ocean University of China**. v. 12, n. 1, p. 139-145, 2013.

**3 ESTIMATING THE RICHNESS OF MARINE FISHES ON NORTHEASTERN BRAZIL,
TROPICAL BRAZILIAN PROVINCE: A BASELINE FOR CONSERVATION.**

MATIAS, GDA^{*}, FABRÉ, NN⁺, TORRES, RA[#], MOTT, T^{*}

SUBMITTED TO: MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

^{*} Laboratório de Diversidade Molecular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brasil, ⁺Setor de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brasil, [#] Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding author: Gesika Deva de Araújo Matias, e-mail: gesikaamatias@hotmail.com

Abstract

Most of the world's marine fish stocks are "fully exploited" or reached the maximum permissible. A precise identification of species is the first step to prevent illegal trade and overexploitation. DNA barcode is a molecular approach used to identify species and can be useful as a reference to prevent fraud and illegal trade. Our main goal was to generate DNA barcode sequences to characterize the marine fish fauna in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province to assess whether cryptic diversity occur as well as to serve as a reference to prevent fraud and illegal trade. A fragment of cytochrome c oxidase subunit 1 gene, COI, was amplified and analyzed according to DNA barcode protocol to 79 species, 64 genera, 36 families and 13 orders of fish. Seventy-eight species had intraspecific distances fewer than 2%, and interspecific distances greater

than 2% (4.7-39.9%) suggesting that COI was able to correctly discriminate species of marine fish of Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province. These results reinforce that the morphological identification agree with molecular ones exception to *Eucinostomus gula* that showed genetic divergence of 13.8%. Bayesian inference suggested the need for a systematic review on *Eucinostomus* genus with unstable taxonomy. Among the species collected, one is vulnerable (*Lutjanus cyanopterus*) and three are near threatened (*Albula vulpes*, *Rhinobatos percellens* and *Scarus guacamaia*) and all of them are generally catch by local fishermen. The correct identification of marine fish species in Tropical Brazilian Province would certainly help in their conservation and contribute to sustainable management of their fishery resources.

Keywords: fish, biodiversity, cytochrome c oxidase subunit I, COI, cryptic diversity.

Running Title: DNA *barcode* of marine fishes from Northeastern Brazil.

Introduction

The increase of global trade of fishes has reached a new production record in 2013 with 160 million tons (FAO, 2014). Nevertheless, approximately 52% of the world's marine fish stocks are "fully exploited", or reached the maximum permissible, while another 28% of stocks are "overfished", depleted or recovered. This fact is extremely worrying when we consider that over the past three decades the number of fishermen and fish farmers progressed faster than the world population (FAO, 2007). Added to this, in recent decades, the catch of species that are not targeted by fishing, known as "bycatch" has become an important issue in the management and conservation of global fishery, with special concern for the capture of vulnerable species, such as shark species (Fernandez-Carvalho, 2015).

With the increasing demand and capture of fisheries resources, marketing has been the subject of legal action to regulate, monitor and correctly identify the species of fish of commercial interest (Woolfe & Primrose, 2004). Regulation is necessary to control the exploitation of fish (Pauly *et al.* 2002). Morphological identification of fish is complicated when these animals are processed because they lose diagnostic morphological characters and consequently, illegal trade may occur (Wong & Hanner, 2008). In fact, forensic studies detected that the Caribbean and the Brazilian sharpnose sharks (*Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus*) can easily be misidentified and replaced (Lima *et al.* 2000) and *Hemiramphus brasiliensis* and *H. balao* (Hemiramphidae) were commercialized for over 50 years in Northeastern Brazil and molecular data revealed that this stock represent a single species overexploited (Torres *et al.* 2015). A precise identification of a species is the first step to prevent illegal trade

and overexploitation and the elimination of uncertainties is important for successful conservation and management practices (Frankham *et al.* 2004).

DNA barcode (Hebert *et al.* 2003b) has used the information on 650 bp fragment of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) to identify and reveal new species belonging to different taxonomic groups and has reached popularity worldwide in the last decade (Hebert *et al.* 2003a, Kerr *et al.* 2009, Taylor & Harrys 2012, Trivedi *et al.* 2015). It can serve as a reference to prevent fraud and illegal trade, and provides the basis for biodiversity research that aims to understand and measure biodiversity rates (Carvalho *et al.* 2011b, Taylor & Harrys 2012, Trivedi *et al.* 2015). DNA barcode protocol should include, beyond technical variables (same DNA fragment), the same analysis methods (similarity-based analysis using Neighbour-Joining and the Kimura-2-parameters evolutionary model). Researchers have used a divergence of 2% as the threshold for species delimitation (Hubert *et al.* 2008, Rosso *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013), but this value should be used only as a starting point to investigate differences between specimens and its evolutionary history should be taken into consideration (Pereira *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2013). Although DNA barcode remains controversial in some aspects (Moritz & Cicero 2004, Rubinoff 2006, Krishnamurthy & Francis 2012, Taylor & Harris 2012, Velzen *et al.* 2012), for fish species discrimination this system has shown robust (Ward *et al.* 2005, Ribeiro *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013, Torres *et al.* 2013), and nowadays, barcode sequences are available in Barcode of Life Data System (BOLD) for 14.541 fish species (almost 50% of current richness of this taxonomic group).

Tropical coastal ecosystems have more diverse fish communities than temperate environments, but these megadiverse communities such as the Tropical Brazilian

Province have low abundance (Batista *et al.* 2014), and censuses are especially deficient for tropical systems (Mora *et al.* 2008). Our main goal was to use the DNA barcode approach to assess the richness of fish in the Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province.

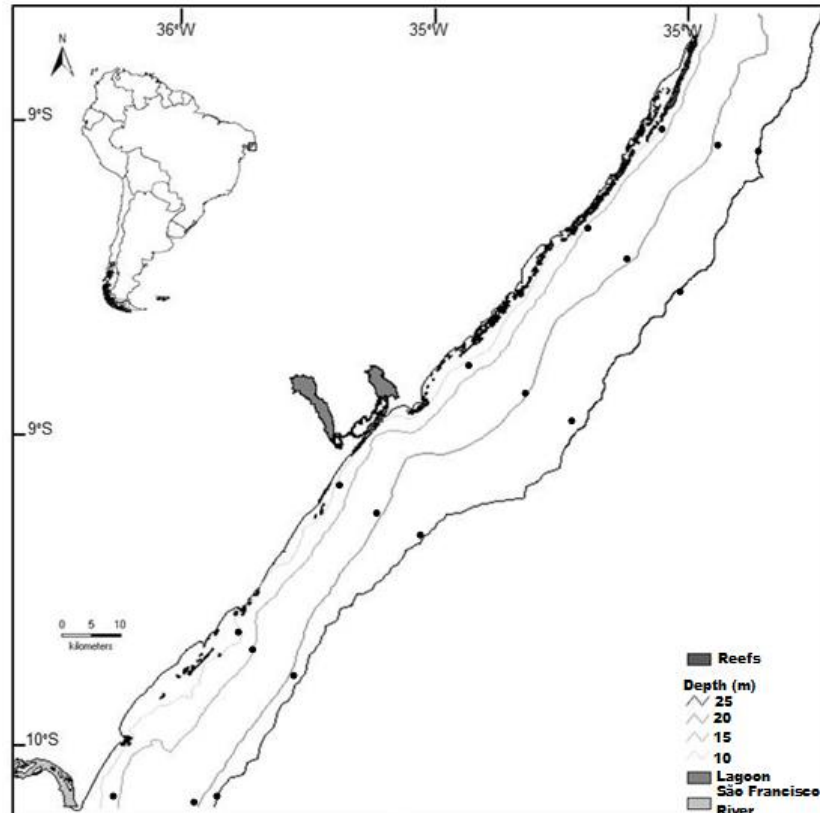
Material and methods

Samples

Species of demersal fish were collected using series of gillnets (with sizes ranging from 20-80 opposite internodes), known locally as *caceia* and highly used by local fisheries. For catching benthonic species, bottom trawling (trynet), a tool used for shrimp fishing and that catches fishes as by-catch, was employed (Rangely *et al.* 2010). Sampling occurred from February to July 2013 along the coast of the Alagoas state, (9°0'S, 34°59'W-10°21'S, 36°9'W between isobaths 10 to 30 m and 230 km of extension) in Northeastern Brazil (Fig. 1). Collected individuals were taken into chilled boxes to the *Laboratório de Ecologia de Peixes e Pesca (Universidade Federal de Alagoas)*. Muscle tissue of each individual was taken and kept in alcohol 92% and after, each specimen was fixed in 20% formaldehyde, stored in 70% ethanol and incorporated in the *Coleção Zoológica do Museu de História Natural of Universidade Federal de Alagoas* (Appendix 1). All collected specimens were identified with the help of experts taxonomists based on their morphological characteristics and specific references (Figueiredo & Menezes 1977, 1978, 1980, Menezes & Figueiredo 1985, Cervigón 1993, Agüero 2001, Carpenter 2002 a, b, Marceniuk 2005, Marceniuk & Menezes 2007) and

validated their specific status with sequences from BOLD and GenBank genome datasets using a similarity-based approach (Velzen *et al.* 2012).

Fig. 1 Distribution of 18 collecting points for marine fish along the coast of the Alagoas State, Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province. Insert map shows Tropical Brazilian Province, included in South America. Figure: Laboratório de Ecologia de Peixes e Pesca, Universidade Federal de Alagoas with modifications.



Extraction, PCR amplification and DNA sequencing

To assess intraspecific variation, up to five individuals, when possible, of each species were included in the analysis following the DNA barcode protocol (Steinke & Hanner 2010). Individuals were chosen among those collected based on their sampling location (as far as possible) in an attempt to accommodate a greater genetic variability for each species throughout the extension of the collecting points.

Total genomic DNA was extracted using the protocol of phenol/chloroform (Sambrook *et al.* 1989). A fragment of COI gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using two sets of primers: FishF1, FishR2 (Ward *et al.* 2005) and Fish-BCL, Fish-BCH (Baldwin *et al.* 2009) and optimized protocols. For a final volume of 25 μ l of PCR, 12.5 μ l of PCR Mastermix Promega, 1 μ l of each primer (10mM), 8 μ l of ultrapure water, 0.5 μ l U of Taq polymerase and 2 μ l of DNA (16-137 ng/ μ l) were used following an initial denaturation of 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C (30 s), annealing in 52-54°C (45 s) and extension at 72°C (1 min), and finally 10 min of final extension. For the species whose amplifications did not work, we investigated the reason (which included, for example, low concentrations and contamination) and several procedures were carried out as new extractions, new PCR's (using different DNA concentrations, different amounts of Taq polymerase and primers, different annealing temperatures), but still some samples remained without work. Amplification was confirmed by electrophoresis in agarose gel 1% stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light in a transilluminator. PCR products were purified with isopropanol, and then, sent for unidirectional sequencing in sequencer Genetic Analyzer 3500 from ABI after PCR reaction with kit BigDye® terminator V3.1.

State of conservation of fishery resources

Data on the conservation status of each species were collected in the Red List of the International Union for Conservation of Nature (www.iucnredlist.org).

Molecular analyses

Sequences were edited and aligned with BioEdit v7.0.5.3 (Hall 1999). They were compared to GenBank database through Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Later, they were translated into amino acids to verify the occurrence of stop codons (which could indicate the amplification of NUMTs) using MEGA v6.0 (Tamura *et al.* 2013).

Genetic distances within and between species were calculated using the evolutionary model Kimura-2-parameters (K2P; Kimura 1980) and a Neighbour-Joining dendrogram (NJ) with 1,000 replicates of bootstrap were ran in MEGA v6.0 (Tamura *et al.* 2013). Both the K2P and NJ have received much criticism for their use in the DNA barcode protocol (Farris *et al.* 1996, Srivathsan & Meier 2012). Nevertheless, we remained with this methodology as a way to compare our results with many others already obtained, since two-thirds of published data used K2P to calculate the genetic distances, e.g. (Srivathsan & Meier 2012). For species with intraspecific variation greater than the 2% we conducted a phylogenetic approach. For a Bayesian inference (BI), the best evolutionary model of nucleotide substitution for our data set were chosen using Akaike Information Criteria (AIC) in jModelTest v2.1.7 (Darriba *et al.* 2012). The BI was run in MrBayes v3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) started with random topologies and the number of generations was set to 2,500,000, whereas the topologies and parameters were sampled every 1,000 generations. The standard deviation values, as recommended by the authors, should have themselves less than 0.01. By observing these values, we assumed a value of burn-in of 0.25, discarding 25% of the initial data. A majority consensus tree was performed to generate the final topology and the branch support was obtained through posterior probabilities. The consensus topology was seen and edited in FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Results

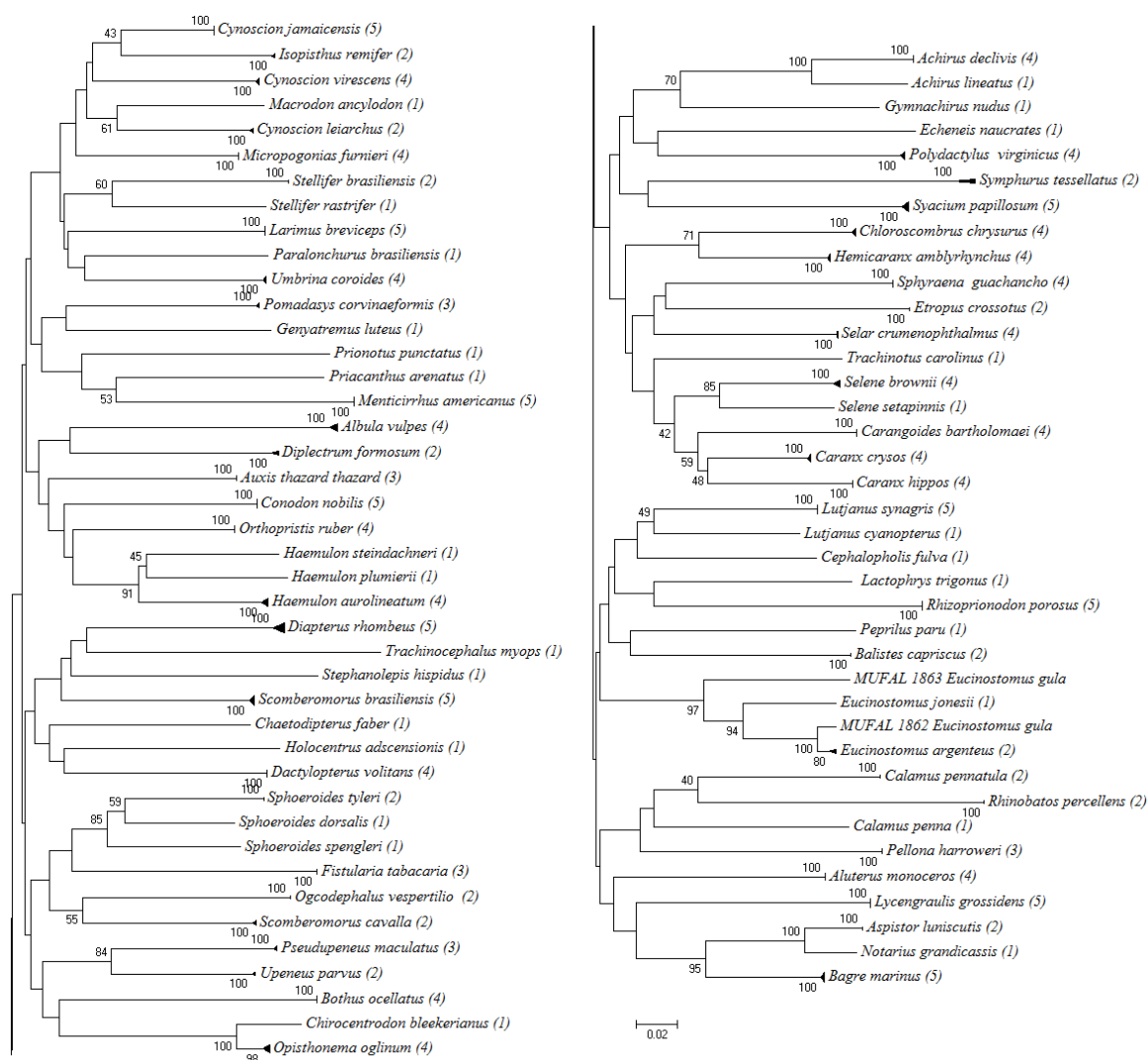
A total of 1,357 individuals of fish were collected, representing 95 species, 71 genera, 38 families and 13 orders. Among 261 selected individuals representing all species, primers amplified the target region of DNA barcode for 209 specimens belonging to 79 species, 64 genera, 36 families and 13 orders (Appendix 1). Fifty-two samples representing 16 species, nine families and five orders (Appendix 1) could not be amplified by these sets of primers. Sixty-eight species were represented by one to four specimens, and for 11 species, five individuals were included in the analyses. All sequences were blasted in Blastn tool and were properly authenticated, considering a similarity of 99%. After, these sequences were aligned to those from BOLD and GenBank. No stop codon was detected. The total average nucleotide frequency was G (18%), C (29.9%), A (23.2%), T (28.9%).

Seventy-eight species (98.7% of the total successfully sequenced) of marine fishes from the Northeastern Brazil were discriminated using the protocol of DNA barcode. The average K2P distance within these species was 0.1% (min: 0%; max: 1.9%), about 255 times smaller than average of interspecific genetic distance (25.5%). The average genetic divergence between families and orders was 27.2% and 28.3%, respectively (Table 1). The Neighbour-Joining dendrogram (Fig. 2) showed that individuals of the same species were nested together, with the exception of specimens of *Eucinostomus gula*, which did not remain in the same cluster.

Table 1 Genetic divergence using Kimura-2-parameters evolutionary model of 78 species of marine fish collected in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province.

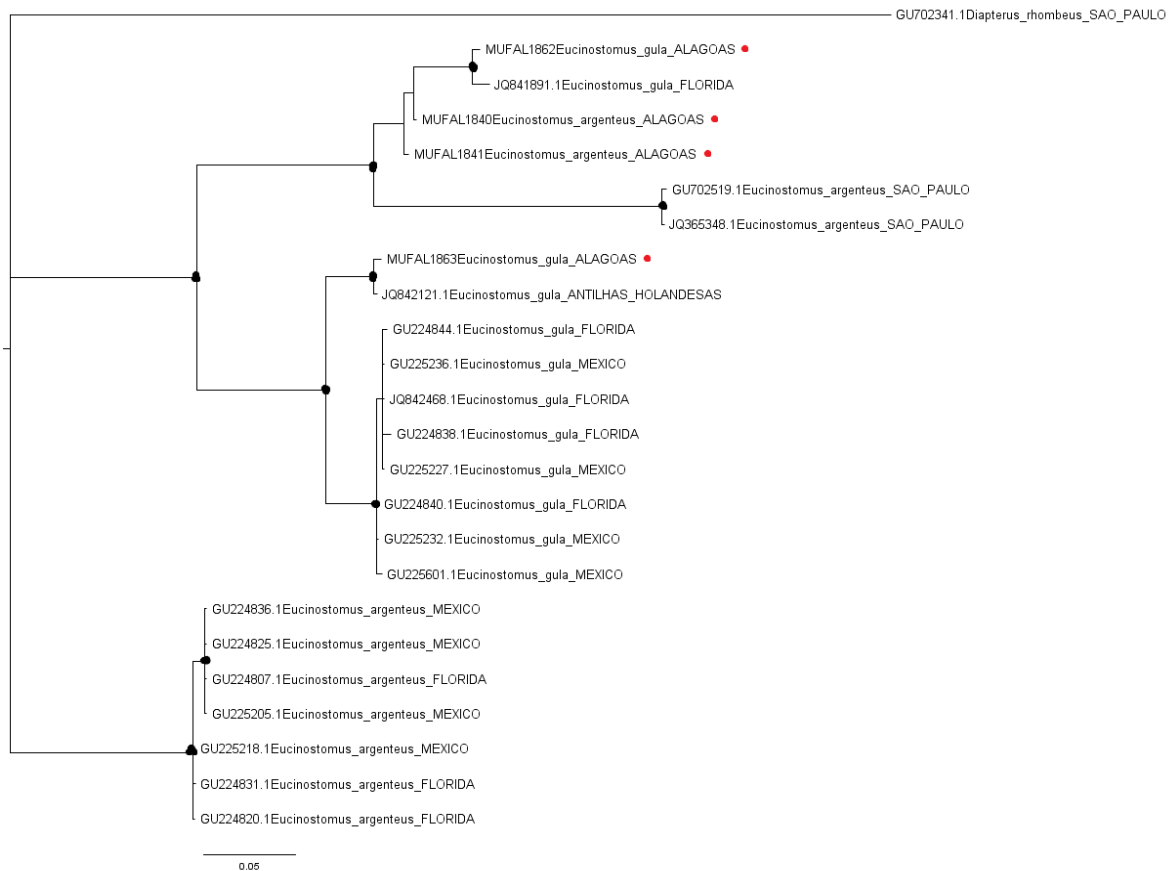
Genetic Divergence K2P (%)						
	Taxa	Comparisons	Minimum	Mean	Maximum	SE
Species	78	261	0	0.1	1.9	0.002
Genus	64	3,081	4.7	25.7	39.9	0.037
Families	36	630	18.8	27.2	39.3	0.034
Orders	13	78	21.3	28.3	38	0.035

Fig. 2 Neighbour-Joining dendrogram of 79 species of marine fish collected in Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province, obtained using DNA barcode sequences and Kimura-2-parameters evolutionary model. Numbers in parenthesis represent the number of specimens included of each species



One species (*Eucinostomus gula*, Perciformes, Gerreidae) showed 13.8% of intraspecific divergence (between individuals MUFAL 1862 and MUFAL 1863), being recovered in two different groups (Fig. 2). Voucher specimens were re-examined and the identification of these species was confirmed based on the following characters: scale-less pit at posterior end of premaxillary groove, the number of lateral-line scales and standard length of the last dorsal-fin spine (Cervigón 1993, Agüero 2001, Carpenter 2002a). A BI including nine DNA barcode sequences of *E. argenteus* from São Paulo (Brazil), Mexico and Florida (United States), (accession numbers: GU224807, GU224820, GU224825, GU224831, GU224836, GU225205, GU225218, GU702519, JQ365348) and 10 sequences of *E. gula* from Mexico, Florida and Netherlands Antilles (accession numbers: JQ841891, JQ842121, JQ842468, GU224838, GU224840, GU224844, GU225236, GU225227, GU225232, GU225601) was run using the model TPM2uf+G, which was chosen to be the best evolutionary model by jModelTest. The tree was rooted with *Diapterus rhombeus* from São Paulo (accession number: GU702341). All these sequences were downloaded from Genbank and selected because they have vouchers specimens. The analysis recovered MUFAL 1862 clustered with *E. gula* from Florida and *E. argenteus* from Alagoas and from São Paulo. MUFAL 1863 was grouped with other specimens of *E. gula* from other localities (Fig. 3).

Fig. 3 Phylogram obtained by Bayesian Inference. Two individuals of *Eucinostomus argenteus*, and two of *E. gula* were collected in the Alagoas State and are highlighted with red circles. Black circles indicates nodes with posterior probability greater than 0.90. *Diapterus rhombeus* GU702341.1/Diapterus_rhombeus_SAO_PAULO is the outgroup.



Regarding interspecific genetic distance, all species had values higher than 2% (min: 4.7%; max: 39.9%) (Table 1). Sequences of two species (*Achirus declivis*, Pleuronectiformes, Achiridae and *Chirocentron bleekermanus*, Clupeiformes, Pristigasteridae) were available neither in BOLD nor GenBank, and thus could not be compared with individuals from other locations. Only *A. declivis* had more than one specimen (four) included in our analysis, and all specimens had identical haplotypes.

When we consider the conservation status of the species, 72 of them have not yet been evaluated, 17 are least concern, three are near threatened, two are data deficient and one is vulnerable. The vulnerable species, *Lutjanus cyanopterus*

(Lutjanidae, Perciformes) is considered a "by-catch" species and had only one specimen collected. Among the near threatened species are: *Albula vulpes* (Albulidae, Albuliformes), which had 38 specimens collected in this study and is also a species usually collected as a "by-catch"; *Rhinobatos percellens* (Rhinobatidae, Rajiformes), species of commercial interest and only had two collected specimens; *Scarus guacamaia* (Scaridae, Perciformes), is a minor commercial species with only one specimen collected. Among the least concern species is *Rhizoprionodon porosus* (Carcharhinidae, Carcharhiniformes), a commercial species known popularly as "caribbean sharpnose shark" that had 21 specimens collected.

Discussion

The use of genetic techniques developed rapidly and molecular information have become accessible and are useful for conservation and fisheries management issues (FAO 1999, 2000). This research has shown that DNA barcode can identify quickly and accurately fish species from the Tropical Brazilian Province.

A taxonomic system is robust when it identifies species accurately (Hebert *et al.* 2003a). Ninety-eight percent of 79 marine fish collected in Northeastern Brazil were properly discriminated by the DNA barcode approach. It represents almost half (43.8%) of the 123 commercial and "by-catch" marine species recorded in the Alagoas coast (Rangely *et al.* 2010, Tiburtino 2011, Souza *et al.* 2012) and up to 20% of those that occur in the Northeastern Brazilian coast (Haimovici & Klippel 1999). This degree of exactness corroborates the efficiency of this technique to identify fish species and certainly it would be useful to prevent illegal trades (Wong & Hanner 2008, Carvalho *et al.* 2011b) and to trace the origin of food products (Galimberti *et al.* 2013). Many species

of marine fishes can be mislabeling in the market. In fact, forensic studies detected that the freshwater catfish *surubim* (*Pseudoplatystoma* spp.) is commonly replaced by other species of lower commercial value (Carvalho *et al.* 2011b). Some fish species that occur in Northeastern Brazil, such as *Albula nemoptera* and *A. vulpes*, *Apistor lunicutis* and *Notarius grandicassis*, *E. argenteus* and *E. gula* and *Macrodon ancylodon* and *Cynoscion microlepidotus* have some similarities in morphological characters and may be misidentified. This misidentification may result in overexploitation, because species can be substituted by morphologically similar species when commercialized as whole fish, and in some cases (e.g. fillets) substituted by quite dissimilar species (Carvalho *et al.* 2011b). A system that discriminates species unambiguously could still facilitate the recognition of taxonomic entities that could constitute management entities (Moura 2008). In this way, DNA barcode has been the baseline information for many conservation studies, as it serves as the framework for forensic genetics, revealing fraud detection and commercialization of prohibited species (Wong & Hanner 2008, Carvalho *et al.* 2011b, Krishnamurthy & Francis 2012, Taylor & Harrys 2012).

The average of K2P genetic distance found in marine fish from Northeastern Brazil (0.1%) was smaller than those found in other studies (Ward *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2008, Steinke *et al.* 2009, Valdez-Moreno *et al.* 2009, Aquilino *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2011a, Mabragaña *et al.* 2011, Mejía *et al.* 2012, Ribeiro *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013). The average value of K2P distances observed here is about half of the smaller magnitude already observed in fishes (Pereira *et al.* 2013), which can be attributed to the effects of geographical scale, whereas the collects occurred over 230 km long.

On the other hand, average of interspecific genetic distance (25.5%) of marine fish from Northeastern Brazil was much higher than other studies (Ward *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2008, Valdez-Moreno *et al.* 2009, Aquilino *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2011a, Mabragaña *et al.* 2011, Ribeiro *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012). This high value of K2P distance average observed here, may be the result of low diversity of genera (only 11 genera from 65 included had more than one species), thereby, generating high rates of divergence between species of different genera.

One species of fish from 79 collected could not be discriminated by the DNA barcode approach. Two juvenile individuals of *Eucinostomus gula* (Perciformes, Gerreidae) included in this study had 13.8% of variation. Inter-specific variation between *E. gula* and the other two congeneric species was 7.1% (with *E. argenteus*) and 11.5% (with *E. jonesii*), values even smaller than the intra-specific variation. *Eucinostomus argenteus* and *E. gula* are co-distributed along the Western Atlantic (Froese & Pauly 2014) and *E. argenteus* was already considered (based on morphological data) a species complex, with four distinct morphotypes: *E. argenteus*, *E. gula*, *E. jonesii* and *E. harengulus* (Matheson & McEachran 1984). Taxonomy of the Gerreidae family has been instable when considered taxonomy categories and total number of valid species (Eschmeyer 1998, Agüero 2001). Agüero (2001) analyzed osteology and external morphological characters from 21 species of Gerreidae, and concluded that only eight of these were valid, including *E. gula*. The Bayesian analyses recovered a polytomic pattern including *E. argenteus* and *E. gula*. Three clades were recovered: one composed by *E. gula* (MUFAL 1862), a specimen of *E. gula* from Florida and *E. argenteus* from Alagoas and São Paulo, one composed by *E. gula* (MUFAL 1863), *E. gula* from Florida, Mexico and Caribbean and finally one clade was composed

exclusively by *E. argenteus* from Mexico and Florida. A systematic revision of these pair of species including a more comprehensive sample size is needed to clarify the taxonomic status of them. DNA barcode has become increasingly used as the first step to point candidates of species that needs taxonomic revision and phylogenetic approach (Ward *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2013). For molecular authentication of snappers, for example, the COI gene was shown a reliable bio-identifier, being able to identify species that could not be identified from morphological characters. Moreover, the interspecific differences were reliably enough to permit the identification of species (Veneza *et al.* 2014). Mat Jaafar *et al.* (2012) also shown that the COI gene is able to discriminate species of highly similar morphology, like Carangidae that are sometimes misidentified. This accurate identification of species is important for fisheries management and authentication of food (Trivedi *et al.* 2015).

Among 79 fish species collected, only one is vulnerable (*Lutjanus cyanopterus*) and three near threatened species (*Albula vulpes*, *Rhinobatos percellens*, *Scarus guacamaia*) according to the Red List of the International Union for Conservation of Nature (www.iucnredlist.org); none of them has restricted distribution to the Tropical Brazilian Province (Froese & Pauly 2014) and only *Rhinobatos percellens* is of commercial interest.

Our data support the accuracy of DNA barcode in discriminating the marine fish fauna from Northeastern Brazil. Our results help not only to increment the databases of barcode sequences, expanding our knowledge about an poorly-known region, but also makes available unpublished sequences for two species of marine fish. In the monitoring of fish and illegal fishing, the DNA barcode can be very effective, so must become an indispensable tool for discriminating between legal fisheries and food from

fish species sold illegally. There are few studies that address fraud in processed fish products, then it is necessary to intensify these studies to serve as a basis for forensic genetics, assisting in the detection of fraud or marketing of prohibited species. The correct identification of marine fish species in ecosystems such as the Tropical Brazilian Province would certainly help in their conservation and contribute to sustainable management of their fishery resources, being extremely important the regulation and supervision by local fishing.

Acknowledgements

We thank members of *Laboratório de Ecologia de Peixes e Pesca* for collecting all fish; Selma Torquato for incorporating all specimens in MUFAL collection; Jessika, Larissa, Giovana and João, members of *Laboratório de Diversidade Molecular* for their help in all phases of this research; Cláudio Sampaio, Alexandre Marceniuk, Leonardo Calado and Robson Ramos for taxonomic identification; Cláudio Sampaio, Vandick Batista, Sérgio Lima, Uedson Jacobina, Thiony Simon and Ana Malhado for contributions in the preparation of this manuscript. R.A.T. is especially grateful to CNPq for the research fellowship provided (Grant numbers 306099/2011-0 and 301208/2012-3). G.D.A.M. thanks CAPES for the scholarship and SINPESCA for the financial aid.

References

Agüero JDLC (2001) *Sistemática y biogeografía de las especies del género Eucinostomus (Teleostei: Gerreidae)*. Doctoral disertación. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Aquilino SVL, Tango JM, Fontanilla IKC, Pagulayan RC, Basiao ZU, Ong OS, Quilang JP (2011) DNA barcoding of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 612–619.

Baldwin CC, Mounts JH, Smith DG, Weigt LA (2009) Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon*

(Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa*, 1-22.

Batista VS, Fabr e NN, Malhado ACM, Ladle RJ (2014) Tropical Artisanal Coastal Fisheries: Challenges and Future Directions. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, **22**, 1, 1-15.

Carpenter KE (2002a) *The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae)*. FAO, Rome.

Carpenter KE (2002b) *The living marine resources of the Eastern Central Atlantic. Volume 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), Sea turtles and marine mammals*. FAO, Rome.

Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C, Hanner R (2011a) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, **22**(S1), 80–86.

Carvalho DC, Neto DA, Brasil BS, Oliveira DA (2011b) DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, **22**(S1), 97-105.

Cervigón F (1993) *Los peces marinos de Venezuela. 2^a. Ed.* Caracas: Fundación Científica Los Roques.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**(8), 772.

Eschmeyer WN (1998) *Catalog of fishes: Species of fishes MZ*. Vol. 2. California Academy of Sciences, **I-III**, 1-2905.

FAO (1999) *International Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

FAO (2000) *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

FAO (2007) *Pesca e Aquicultura*. Organiza o das Na es Unidas para a Alimenta o e a Agricultura. Roma, Itália. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf> (acessado em 04/2015).

FAO (2014) *Comércio global de peixes atinge níveis recordes*. Organiza o das Na es Unidas para a Alimenta o e a Agricultura. Roma, Itália. Disponível em <https://www.fao.org.br/cgpanr.asp> (acessado em 04/2015).

Farris JS, Albert VA, K llersj  M, Lipscomb D, Kluge AG (1996) Parsimony jackknifing outperforms neighbour-joining. *Cladistics*, **12**: 99–124.

Fernandez-Carvalho J, Coelho R, Santos MN, Amorim S (2015) Effects of hook and bait in a tropical northeast Atlantic pelagic longline fishery: Part II- Target, bycatch and discard fishes. *Fisheries Research*, **164**: 312-321.

Figueiredo JL, Menezes NA (1977) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I Teleostei*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, Brasil.

Figueiredo JL, Menezes NA (1978) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (1)*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, Brasil.

Figueiredo JL, Menezes NA (1980) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3)*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, Brazil.

Frankham R, Ballou J, Briscoe D, McInnes K (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

Froese R, Pauly D Editors (2014) *FishBase: world wide web electronic publication*. Disponível em <https://www.fishbase.org> (acessado em 11/2014).

Galimberti A, Mattia De F, Losa A (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International Journal*, **50**, 55–63.

Haimovici M, Klippel S (1999) *Diagnóstico da biodiversidade dos peixes teleósteos demersais marinhos e estuarinos do Brasil*. Rio Grande: Fundação Universidade Federal de Rio Grande.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, S96-S99.

Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrige M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*, **3**(6), e2490.

Kerr KCR, Lijtmaer DA, Barreira AS, Hebert PDN, Tubaro PL (2009) Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. *PLoS ONE*, **4**(2), e4379.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.

Krishnamurthy K, Francis RA (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity Conservation*, **21**, 1901-1919.

Lima GHL, Darros FA, Mazzoleni R, Hostim-Silva M (2000) Aspectos da alimentação natural do cação-frango *Rhizoprionodon lalandii* (Valenciennes, 1841) (Elasmobranchii, Carcharhinidae) no município de Barra Velha, Santa Catarina. *Notas Técnicas Facimar*, **4**, 91-96.

Marceniuk AP (2005) Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. *Boletim do Instituto de Pesca*, **31**(2), 89-101.

Marceniuk AP, Menezes, NA (2007) Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. *Zootaxa*, **1416**, 126p.

Mabragaña E, Astarloa JMD, Hanner R, Zhang J, Castro MG (2011) DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS One*, **6**, e28655.

Mat Jaafar TNA, Taylor MI, Mohd Nor SA, de Bruyn M, Carvalho GR (2012) DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity within Commercially Exploited Indo-Malay Carangidae (Teleostei: Perciformes). *PLoS ONE*, **7**(11), e49623.

Matheson RE, McEachran JD (1984) Taxonomic studies of the *Eucinostomus argenteus* complex (Pisces: Gerreidae): preliminary studies of external morphology. *Copeia*, **3**, 893-902.

Mejía O, León-Romero Y, Soto-Galera E (2012) DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. *Mitochondrial DNA*, **23**, 471–476.

Menezes NA, Figueiredo JL (1985) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V Teleostei (4)*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, Brasil. 105 p.

Mora C, Tittensor DP, Myers RA (2008) The completeness of taxonomic inventories for describing the global diversity and distribution of marine fishes. *Proceedings of the Royal Society B*, **275**, 149–155.

Moritz C, Cicero C (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*, **2**(10), 1529-1531.

Moura T, Silva MC, Figueiredo I, Neves A, Muñoz PD, Coelho MM, Gordo LS (2008) Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation. *Marine and Freshwater Research*, **59**, 214-223.

Pauly D, Christensen V, Guenette S, Pitcher T (2002) Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, **418**, 689-695.

Pereira LHG, Pazian MF, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2011) DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*, **22**(Suppl 1), 87–96.

Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, **14**(20), 1-14.

Rambaut A (2009) *FigTree, ver 1.3.1* [Online]. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (Acessado em 12/2014).

Rangely J, Fabr e NN, Tiburtino C, Batista VS (2010) Estratégias de pesca artesanal no litoral marinho alagoano (Brasil). *Boletim do Instituto de Pesca*, **36**(4), 263-275.

Ribeiro AO, Caires RA, Mariguela TC, Pereira LHG, Hanner, R, Oliveira C (2012) DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Molecular Ecology Resources*, **12**(6), 1012-1020.

Ronquist F, Huelsenbeck J, Teslenko M (2012) MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology*, **61**(3), 539-542.

Rosso JJ, Mabrag a E, Castro MC, Astarloa JMD (2012) DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, **12**(6), 999-1011.

Rubinoff D (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, **20**(4), 1-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2**(3), 253 p.

Souza CD, Batista VS, Fabr e NN (2012) Caracteriza o da pesca no extremo sul da área de prote o ambiental Costa dos Corais, Alagoas, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, **38**(2), 155-169.

Srivathsan & Meier (2012) On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, **28**, 190–194.

Steinke D, Zemlak TS, Hebert, PDN (2009) Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *Plos One*, **4**(7), 1-5.

Steinke D, Hanner R (2010) The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial DNA*, **22**(Suppl. 1), 10–14.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Taylor HR, Harrys WE (2012) An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 377-388.
- Tiburtino C (2011) *Atividade reprodutiva da ictiofauna acompanhante explorada pela pesca de emalhe no litoral central de Alagoas*. Dissertação (mestrado)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.
- Torres RA, Feitosa RB, Carvalho DC, Freitas MO, Hostim-Silva M, Ferreira BP (2013) DNA barcoding approaches for fishing authentication of exploited grouper species including the endangered and legally protected goliath grouper *Epinephelus itajara*. *Scientia Marina*, **77**(3), 409-418.
- Torres RA, Santos FA, Andrade F, Gondolo GF, Lessa RPT (2015) Disentangling the controversial identity of the halfbeak stock (*Hemiramphus brasiliensis* and *H. balao*) from northeastern Brazil by multilocus DNA markers. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. DOI: 10.1007/s11160-015-9381-2.
- Trivedi S, Aloufi AA, Ansari AA, Ghosh SK (2015) Role of DNA Barcoding in Marine Biodiversity Assessment and Conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Valdez-Moreno M, Ivanova NV, Elías-Gutiérrez M, Contera-Balderas S, Hebert PDN (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, **74**, 377–402.
- Velzen RV, Weitschek E, Felici G, Bakker FT (2012) DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *Plos One*, **7**(1): 1-12.
- Veneza I, Felipe B, Oliveira J, Silva R, Sampaio I, Scheneider H, Gomes G (2014) A barcode for the authentication of the snappers (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? *Food Control*, **38**, 116-123.
- Wang ZD, Guo YS, Liu XM, Fan UB, Liu CW (2012) DNA barcoding South China Sea fishes. *Mitochondrial DNA*, **23**(5), 405–410.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1847-1857.
- Ward RD, Holmes BH, White WT, Last PR (2008) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research*, **59**, 57-71.

Woolfe M, Primrose S (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, **22**: 222-226.

Wong E, Hanner R (2008) DNA *barcoding* detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, **41**(8), 828-837.

4 CONCLUSÕES

Setenta e oito espécies de peixes marinhos que ocorrem na costa alagoana puderam ser corretamente discriminadas pelo método do DNA *barcode*.

Dois indivíduos de *Eucinostomus gula* do Nordeste Brasileiro apresentaram divergência genética de 13.8%. Através do método de distância e da análise bayesiana esta espécie revelou necessitar de uma revisão sistemática.

Duas espécies de peixes marinhos (*Achirus declivis*, Pleuronectiformes, Achiridae and *Chirocentron bleekermanus*, Clupeiformes, Pristigasteridae) que ocorrem no Nordeste Brasileiro apresentam sequências de DNA *barcode* inéditas e serão disponibilizadas no BOLD.

A correta identificação das espécies de peixes marinhos certamente ajudará na sua conservação e contribuirá para a gestão sustentável dos seus recursos pesqueiros, sendo de extrema importância a regulamentação e fiscalização da pesca local.

APÊNDICE

Appendix 1 Species of marine fishes from Northeastern Brazil, Tropical Brazilian Province, collected between February-July of 2013. Number of individuals of each species (N) that was sequenced; number of species that were included in the analysis (Analyzed); sequences from GenBank (GenBank); Voucher numbers (MUFAL). *: species with DNA barcode sequences unavailable in databases. +: species that do not amplify with primers used. S.URD: species unavailable in the GenBank database.

Orders	Families	Species	N	(MUFAL)	Analyzed	GenBank
Rajiformes						
	Rhinobatidae	<i>Rhinobatos percellens</i> (Walbaum, 1792)	2	1971, 1972	2	5
Carcharhiniformes						
	Carcharhinidae	<i>Rhizoprionodon porosus</i> (Poey, 1861)	5	1966-1970	5	5
Albuliformes						
	Albulidae	<i>Albula nemoptera</i> (Fowler, 1911)+	4		-	-
		<i>Albula vulpes</i> (Linnaeus, 1758)	5	1684, 1873, 1912, 1913	4	5
Aulopiformes						
	Synodontidae	<i>Synodus foetens</i> (Linnaeus, 1766)+	2		-	-
		<i>Synodus intermedius</i> (Spix & Agassiz, 1829)+	1		-	-
		<i>Trachinocephalus myops</i> (Forster, 1801)	3	1883	1	5
Beryciformes						
	Holocentridae	<i>Holocentrus adscensionis</i> (Osbeck, 1765)	1	1745	1	5
Clupeiformes						
	Clupeidae	<i>Opisthonema oglinum</i> (Lesueur, 1818)	5	1833, 1834, 1900, 1931	4	5
	Engraulidae	* <i>Cetengraulis edentulus</i> (Cuvier, 1829)+	2		-	-
		<i>Lycengraulis grossidens</i> (Spix & Agassiz, 1829)	5	1780, 1835, 1894, 1903, 1906	5	3
	Pristigasteridae	* <i>Chirocentrodon bleekermanus</i> (Poey, 1867)	3	1807	1	S.URD
		<i>Pellona harroweri</i> (Fowler, 1917)	5	1659, 1929, 1939	3	5
Lophiiformes						
	Ogcocephalidae	<i>Ogcodephalus vespertilio</i> (Linnaeus, 1758)	3	1739, 1740	2	5
Perciformes						

Acanthuridae	<i>Acanthurus bahianus</i> Castelnau, 1855+	2		-	-
Carangidae	<i>Carangoides bartholomaei</i> (Cuvier, 1833)	5	1693, 1719, 1771, 1914	4	5
	<i>Caranx crysos</i> (Mitchill, 1815)	5	1695, 1821, 1882, 1899	4	5
	<i>Caranx hippos</i> (Linnaeus, 1766)	4	1736, 1836, 1800, 1802	4	5
	<i>Caranx latus</i> Agassiz, 1831+	2		-	-
	<i>Chloroscombrus chrysurus</i> (Linnaeus, 1766)	5	1827, 1830, 1901, 1902	4	5
	<i>Hemicaranx amblyrhynchus</i> (Cuvier, 1833)	4	1724, 1733, 1837, 1965	4	1
	<i>Oligoplites saurus</i> (Bloch & Schneider, 1801)+	2		-	-
	<i>Selar crumenophthalmus</i> (Bloch, 1793)	4	1761, 1843-1845	4	5
	<i>Selene brownii</i> (Cuvier, 1816)	4	1789, 1847, 1875, 1957	4	-
	<i>Selene setapinnis</i> (Mitchill, 1815)	1	1764	1	5
Echeneidae	<i>Trachinotus carolinus</i> (Linnaeus, 1766)	1	1770	1	5
	<i>Echeneis naucrates</i> Linnaeus, 1758	2	1683	1	5
Ephippidae	<i>Chaetodipterus faber</i> (Broussonet, 1782)	2	1722	1	5
Gerreidae	<i>Diapterus rhombeus</i> (Cuvier, 1829)	5	1828, 1917, 1918, 1943, 1961	5	5
	<i>Eucinostomus gula</i> (Quoy & Gaimard, 1824)	4	1862, 1863	2	5
	<i>Eucinostomus jonesii</i> (Günther, 1879)	1	1803	1	5
	<i>Eucinostomus argenteus</i> Baird & Girard, 1855	2	1840, 1841	2	5
	* <i>Eucinostomus lefroyi</i> (Goode, 1874)+	1		-	-
Haemulidae	<i>Conodon nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	5	1868, 1869, 1936, 1937, 1942	5	5
	<i>Genyatremus luteus</i> (Bloch, 1790)	1	1665	1	2
	<i>Haemulon aurolineatum</i> Cuvier, 1830	5	1714, 1715, 1749, 1750	4	5
	<i>Haemulon plumierii</i> (Lacepède, 1801)	1	1785	1	5
	<i>Haemulon steindachneri</i> (Jordan & Gilbert, 1882)	3	1710	1	5

	<i>Orthopristis ruber</i> (Cuvier, 1830)	5	1698-1701	4	5
	<i>Pomadasys corvinaeformis</i> (Steindachner, 1868)	5	1838, 1892, 1953	3	5
Lutjanidae	<i>Lutjanus cyanopterus</i> (Cuvier, 1828)	1	1864	1	5
	<i>Lutjanus synagris</i> (Linnaeus, 1758)	5	1678, 1829, 1858-1860	5	5
Mullidae	<i>Pseudupeneus maculatus</i> (Bloch, 1793)	4	1656, 1746, 1885	3	5
	<i>Upeneus parvus</i> Poey, 1852	2	1870, 1940	2	5
Polynemidae	<i>Polydactylus virginicus</i> (Linnaeus, 1758)	5	1806, 1855, 1874, 1964	4	5
Priacanthidae	<i>Priacanthus arenatus</i> (Lacepède, 1801)	1	1776	1	5
Scaridae	<i>Scarus guacamaia</i> Cuvier, 1829+	1		-	-
	<i>Sparisoma radians</i> (Valenciennes, 1840)+	1		-	-
Sciaenidae	<i>Cynoscion jamaicensis</i> (Vaillant & Bocourt, 1883)	5	1660, 1662, 1797-1799	5	4
	<i>Cynoscion leiarchus</i> (Cuvier, 1830)	2	1793, 1963	2	2
	<i>Cynoscion microlepidotus</i> (Cuvier, 1830)+	1		-	-
	<i>Cynoscion virescens</i> (Cuvier, 1830)	4	1786, 1790, 1946, 1947	4	4
	<i>Isopisthus parvipinnis</i> (Cuvier, 1830)+	3		-	-
	<i>Isopisthus remifer</i> Jordan & Gilbert, 1882	2	1926, 1927	2	5
	<i>Larimus breviceps</i> Cuvier, 1830	5	1794, 1795, 1804, 1825, 1826	5	5
	<i>Macrodon ancylodon</i> (Bloch & Schneider, 1801)	2	1664	1	4
	<i>Menticirrhus americanus</i> (Linnaeus, 1758)	5	1919, 1932-1935	5	5
	<i>Menticirrhus litoralis</i> (Holbrook, 1847)+	1		-	-
	<i>Micropogonias furnieri</i> (Desmarest, 1823)	5	1852, 1853, 1915, 1916	4	4
	<i>Paralonchurus brasiliensis</i> (Steindachner, 1875)	1	1921	1	5
	<i>Stellifer brasiliensis</i> (Schultz, 1945)	5	1820, 1923	2	5
	<i>Stellifer rastrifer</i> (Jordan, 1889)	4	1723	1	5
	<i>Umbrina coroides</i> Cuvier, 1830	5	1796, 1866, 1867, 1960	4	1

	Scombridae	<i>Scomberomorus brasiliensis</i> Collette, Russo & Zavala-Camin, 1978	5	1848, 1849, 1876, 1877, 1950	5	5
		<i>Scomberomorus cavalla</i> (Cuvier, 1829)	3	1911, 1951	2	5
		<i>Auxis thazard thazard</i> (Lacepède, 1800)	5	1682, 1878,1879	3	5
	Serranidae	<i>Cephalopholis fulva</i> (Linnaeus, 1758)	1	1738	1	5
		<i>Diplectrum formosum</i> (Linnaeus, 1766)	2	1679, 1888	2	S.URD
	Sparidae	<i>Calamus penna</i> (Valenciennes, 1830)	1	1712	1	1
		<i>Calamus pennatula</i> Guichenot, 1868	3	1692, 1694	2	S.URD
	Sphyracidae	<i>Sphyracna guachancho</i> Cuvier, 1829	5	1668, 1702, 1726, 1958	4	3
	Stromateidae	<i>Peprilus paru</i> (Linnaeus, 1758)	1	1920	1	5
Pleuronectiformes						
	Achiridae	<i>Achirus lineatus</i> (Linnaeus, 1758)	2	1685	1	5
		* <i>Achirus declivis</i> Chabanaud, 1940	1	1686	1	S.URD
		<i>Gymnachirus nudus</i> Kaup, 1858	1	1742	1	S.URD
		* <i>Trinectes paulistanus</i> (Miranda Ribeiro, 1915)	4	1810- 1812	3	S.URD
	Bothidae	<i>Bothus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	4	1680, 1681, 1708, 1758	4	5
	Cynoglossidae	<i>Symphurus diomedianus</i> (Goode & Bean, 1885)	1	1813	1	1
		<i>Symphurus jenynsi</i> Evermann & Kendall, 1906+	4		-	-
		* <i>Symphurus kyaropterygium</i> Menezes & Benvegnú, 1976+	2		-	-
		<i>Symphurus tessellatus</i> (Quoy & Gaimard, 1824)	3	1721	1	1
		<i>Symphurus trewavasae</i> Chabanaud, 1948+	1		-	-
	Paralichthyidae	<i>Etropus crossotus</i> Jordan & Gilbert, 1882	2	1781, 1782	2	5
		<i>Syacium papillosum</i> (Linnaeus, 1758)	5	1703, 1705, 1784, 1831, 1832	5	5
Scorpaeniformes						
	Dactylopteridae	<i>Dactylopterus volitans</i> (Linnaeus, 1758)	4	1673, 1706, 1707, 1717	4	5
	Triglidae	<i>Prionotus punctatus</i> (Bloch, 1793)	5	1851	1	5
Siluriformes						
	Ariidae	<i>Bagre marinus</i> (Mitchill, 1815)	5	1766, 1768, 1777, 1805,	5	4

				1824		
		<i>Aspistor luniscutis</i> (Valenciennes, 1840)	2	1792, 1823	2	3
		<i>Notarius grandicassis</i> (Valenciennes, 1840)	1	1822	1	5
Syngnathiformes						
	Fistulariidae	<i>Fistularia tabacaria</i> Linnaeus, 1758	5	1674, 1691, 1880	3	2
Tetraodontiformes						
	Balistidae	<i>Balistes capriscus</i> Gmelin, 1789	3	1884, 1886	2	5
	Monocanthidae	<i>Aluterus monoceros</i> (Linnaeus, 1758)	5	1727, 1751, 1753, 1897	4	4
		<i>Stephanolepis hispidus</i> (Linnaeus, 1766)	3	1743	1	5
	Ostraciidae	<i>Lactophrys trigonus</i> (Linnaeus, 1758)	1	1676	1	5
	Tetraodontidae	<i>Sphoeroides dorsalis</i> Longley, 1934	1	1744	1	2
		<i>Sphoeroides spengleri</i> (Bloch, 1785)	1	1658	1	5
		<i>Sphoeroides tyleri</i> Shipp, 1972	2	1688, 1861	2	3

