



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL E DOS RECURSOS HÍDRICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E RECURSOS AQUÁTICOS TROPICAIS**

JESSICA DOS SANTOS LIMA PANTOJA

**DNA BARCODE COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DE
LARVAS DE PEIXES DA PLATAFORMA CONTINENTAL
AMAZÔNICA**

**BELÉM
2024**

JESSICA DOS SANTOS LIMA PANTOJA

**DNA BARCODE COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DE
LARVAS DE PEIXES DA PLATAFORMA CONTINENTAL
AMAZÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentado à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Aquicultura

Orientador: Igor Guerreiro Hamoy

Co-orientadora: Paula Nepomuceno Campos

**BELÉM
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P198d Pantoja, Jéssica
DNA BARCODE COMO FERRAMENTA NE IDENTIFICAÇÃO DE LARVAS DE PEIXES DA
PLATAFORMA CONTINENTAL AMAZÔNICA / Jéssica Pantoja. - 2024.
45 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Aquicultura e Recursos Aquáticos
Tropicais (PPGARAT), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia,
Belém, 2024.
Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy
Coorientador: Profa. Dra. Paula Nepomuceno Campos.
1. Ecologia Aquática. 2. Larvas de Peixes. 3. DNA Barcode. 4. Amazônia. I. Guerreiro Hamoy, Igor,
orient. II. Título
-

574.52636072081

CDD

JÉSSICA DOS SANTOS LIMA PANTOJA

DNA BARCODE COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DE LARVAS DE PEIXES DA PLATAFORMA CONTINENTAL AMAZÔNICA

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre.

Data da aprovação: 24 de maio de 2024

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy (Orientador)

Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA



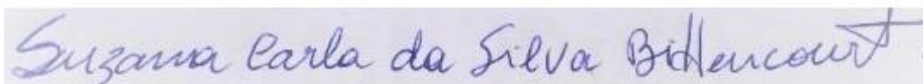
Prof. Dra. Paula Nepomuceno Campos (Co-orientadora)

Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA



Prof. Dra. Ana Cristina Teixeira Bonecker

Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ



Prof. Dra. Suzana Carla da Silva Bittencourt

Universidade Federal do Pará-UFPA

Documento assinado digitalmente
gov.br NUNO FILIPE ALVES CORREIA DE MELO
Data: 31/07/2024 11:01:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Nuno Filipe Alves Correia de Melo

Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido concluir mais um ciclo em minha vida, concedendo-me forças, sabedoria e saúde.

Expresso profunda gratidão aos meus orientadores Paula Campos e Igor Hamoy, pelo apoio, orientação e confiança em meu trabalho.

Agradeço à minha família pelo apoio constante e por sempre vibrarem com as minhas conquistas!

Sou grata ao meu compaheiro Mateus Barbosa por seu apoio contínuo, tornando a jornada menos árdua.

Agradeço às minhas grandes amigas e também mestre e mestrandas, Joane Almeida e Marcela Cardoso. Desde a graduação, transformaram os momentos difíceis em risadas.

Expresso minha gratidão ao Laboratório de Genética Aplicada (LGA) e sua equipe super comprometida, incluindo o Dr. André Luiz, pela assistência na genética e pela amizade calorosa. Um agradecimento especial também à Sayumi, pelo apoio no laboratório e pela amizade! Meus agradecimentos à todos os alunos de iniciação científica por toda ajuda!

Agradeço a professora Xiomara Garcia, que sempre se empenhou para que este trabalho se concretizasse, fornecendo todo o suporte necessário. És uma grande cientista.

Por fim, agradeço a todos do projeto Amazomix, por sua constante ajuda em cada reunião e por custerem grande parte da pesquisa.

EPÍGRAFE

**“Mais sábio é aquele que sabe que não sabe”
- O mundo de Sofia**

RESUMO

A fase larval da vida dos peixes é caracterizada como o estágio de maior vulnerabilidade e nessa fase ocorre a maior taxa de mortalidade. Estudos relacionados a esse estágio ainda são escassos, no entanto estudar essa fase de vida desses organismos é de grande importância, pois fornece informações sobre a biologia e taxonomia das espécies, assim como, ajuda na identificação das áreas de desova e no monitoramento dos estoques pesqueiros. O método morfológico, com auxílio de guias de identificação, é o método mais utilizado para a identificação das larvas de peixes, no entanto, essa metodologia ainda é um obstáculo, pois há uma grande carência desses guias e grande parte deles é local ou regional e não contempla a costa norte brasileira. A identificação incerta das larvas de peixes pode trazer problemas relacionados a estratégias de manejo de espécies de importância comercial e, conseqüentemente, as atividades pesqueiras. Com isso, muitos pesquisadores internacionais passaram a testar e utilizar a análise molecular, em alguns grupos. Atualmente, a técnica mais utilizada é a técnica do DNA Barcode, através do sequenciamento do gene da subunidade I citocromo c oxidase mitocondrial (COI), sendo o marcador molecular mais utilizado para peixes e que permite a identificação e a diferenciação entre as espécies, de forma mais precisa. No Brasil, o uso dessa técnica para identificar as larvas de peixes marinhos ainda é raro e na costa norte brasileira o uso dessa técnica para larvas de peixes ainda não foi realizado. Este trabalho possui como objetivo testar a eficácia da técnica do DNA Barcode e avaliar a precisão da identificação morfológica para as larvas de peixes coletadas na plataforma continental amazônica. A área de estudo se concentrou na plataforma continental amazônica e foram analisadas 12 estações de coletas. As larvas foram coletadas entre setembro e outubro de 2021 e fazem parte do projeto de cooperação franco-brasileira Amazon shelf mixing and its impacts in the ecosystems – AMAZOMIX. As amostras foram coletadas a bordo do navio de pesquisa francês Antares, utilizando um amostrador múltiplo do tipo Multinet Midi (5 redes de 300 µm), coletando em diferentes profundidades na coluna d'água. Após coletadas, as amostras foram fixadas em etanol a 90% e refrigeradas. Foram identificadas 343 larvas de peixes utilizando o método morfológico, classificadas em 10 ordens, 30 famílias, 29 gêneros e 17 espécies. Para análise de DNA Barcode, foram selecionados 76 indivíduos de cada nível taxonômico. Um fragmento de aproximadamente 600pb de 54 larvas, abrangendo 8 ordens, 31 famílias, 16 gêneros e 34 espécies, foi submetido à análise de DNA Barcode. Houve uma discordância de 27% entre os resultados do DNA Barcode e a identificação morfológica. Estes resultados indicam que o DNA Barcode, combinado com a identificação morfológica, pode ser uma ferramenta valiosa para uma identificação precisa das larvas de peixes da plataforma continental amazônica.

PALAVRAS-CHAVE: Análise molecular. Amazônia. Costa Norte Brasil. Ictioplâncton.

ABSTRACT

The larval stage of fish life is characterized as the period of greatest vulnerability, during which the highest mortality rate occurs. Studies related to this stage are still very scarce; however, studying this life stage of these organisms is of great importance as it provides information about the biology and taxonomy of species, as well as helping in the identification of spawning areas and the monitoring of fish stocks. The morphological method, with the aid of identification guides, is the most commonly used method for identifying fish larvae. However, this methodology remains a challenge because there is a significant shortage of these guides, and most of them are local or regional and do not cover the northern coast of Brazil. Uncertain identification of fish larvae can lead to problems related to management strategies for commercially important species and, consequently, fishing activities. Therefore, many international researchers have started testing and using molecular analysis in some groups. Currently, the most widely used technique is DNA Barcoding, through the sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, which is the most commonly used molecular marker for fish and allows for more precise identification and differentiation between species. In Brazil, the use of this technique to identify marine fish larvae is still rare, and on the northern coast of Brazil, this technique has not yet been applied to fish larvae. This study aims to test the efficacy of the DNA Barcoding technique and evaluate the accuracy of morphological identification for fish larvae collected on the Amazon continental shelf. The study area focused on the Amazon continental shelf, and 12 sampling stations were analyzed. The larvae were collected between September and October 2021 and are part of the French-Brazilian cooperation project Amazon shelf mixing and its impacts in the ecosystems – AMAZOMIX. The samples were collected aboard the French research vessel Antares, using a Multinet Midi sampler (5 nets of 300 μm), collecting at different depths in the water column. After collection, the samples were fixed in 90% ethanol and refrigerated. A total of 343 fish larvae were identified using the morphological method, classified into 10 orders, 30 families, 29 genera, and 17 species. For DNA Barcoding analysis, 76 individuals from each taxonomic level were selected. A fragment of approximately 600bp from 54 larvae, encompassing 8 orders, 31 families, 16 genera, and 34 species, was subjected to DNA Barcoding analysis. There was a 27% discrepancy between the DNA Barcoding results and the morphological identification. These results indicate that DNA Barcoding, combined with morphological identification, can be a valuable tool for precise identification of fish larvae on the Amazon continental shelf.

KEYWORDS: Molecular analysis. Amazon. Northern coast of Brazil. Ichthyoplankton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo dos estágios de desenvolvimento dos peixes.....	13
Figura 2 - Mapa de localização da área de estudo. Plataforma continental amazônica.....	22
Figura 3 - Mapa da área de estudo com as estações de coleta na plataforma continental amazônica.....	23
Figura 4 - Exemplo do amostrador Multnet Mind.....	23
Figura 5 - Navio Francês Antares.....	24
Figura 6 - Árvore do vizinho mais próximo ilustrando as relações entre as larvas de peixes da Plataforma continental amazônica com base em sequências do DNA Barcode.....	32
Figura 7 - Mapa representando valores de densidade das larvas em cada estação na plataforma continental amazônica. Com representação das famílias mais abundantes em cada estação.....	33
Figura 8 - Larvas identificadas pelo método morfológico e DNA Barcode na plataforma continental amazônica. (A) <i>Pontinus sp</i> ; (B) <i>Diaphus sp</i> ; (C) <i>Bothus ocellatus</i> ; (D) <i>Xyrichthys sp</i> ; (E) <i>Pterois volitans</i> ; (F) <i>Serranus Baldwin</i> ; (G) <i>Prognichthys occidentalis</i> ; (H) <i>Lampanyctus nobilis</i> ; (I) <i>Microphis brachyurus</i> ; (J) <i>Auxis thazard</i> ; (K) <i>Symphurus sp</i> ; (L) <i>Scombrobrax heterolepis</i>	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 JUSTIFICATIVA	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 Estágio inicial da vida dos peixes	5
norte	6
3.2 Identificação morfológica do estágio inicial da vida dos peixes na região.....	6
3.2 Uso do DNA Barcorde no estágio inicial da vida dos peixes	7
3.3Uso do DNA Barcode no estágio inicial da vida dos peixes no Brasil	13
4 OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo geral.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5 MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1. Área de estudo	15
5.2 Coleta do material biológico.....	15
5.3 Identificação morfológica do material biológico	17
5.2Análise da biologia molecular	17
5.3Análise dos dados	18
5.4Densidade dos organismos	19
6 RESULTADOS	20
7 DISCUSSÃO	37
7.1Erros do método morfológico.....	Error! Bookmark not defined.
7.2Eficácia do DNA Barcode	Error! Bookmark not defined.
7.3 Incongruência dos bancos de dados.....	37
7.4 Biodiversidade.....	38
8 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A plataforma continental amazônica possui grande importância quanto aos recursos pesqueiros como fonte de proteína e renda para seus habitantes, no entanto, há uma carência de estudos sobre a ecologia e reprodução das principais espécies de interesse comercial e potencial econômico (Siqueira e Aprile, 2012). Assim como estudos referentes ao estágio inicial da vida dos peixes na região que ainda são escassos (Ferreira et al, 2014). O estágio larval dos peixes é definido como o estágio de vida antes de se desenvolverem por completo os elementos de raios das nadadeiras e das escamas (Xing et al., 2022). As larvas juntamente com ovos de peixes são caracterizadas como o ictioplâncton, o qual evidencia uma conduta planctônica, comprovada pela grande presença dessas fases de desenvolvimento nas amostras de plânctons, haja vista, que a maior parte dos peixes teleósteos marinhos de importância comercial, possuem estágios iniciais planctônicos (Bonecker et al., 2014).

Segundo Zacardi (2015) o estudo de larvas de peixes no ambiente é importante para determinar a ação do local enquanto sítio de desova e área de berçário, além de se obter informações sobre a definição de épocas e locais de reprodução das espécies. Com isso, pode-se avaliar a importância dos ambientes para as espécies de peixes com valor ecológico e interesse econômico significativos para a pesca.

O estudo do estágio inicial da vida dos peixes também ajuda em informações importantes para o conhecimento da biologia e ecologia das espécies, e conhecimento essencial para a biologia pesqueira (Correia et al., 2012). Tal como fornece informações para a ictiologia, para o inventário ambiental e para o monitoramento dos estoques e manejo de pesca (Nakatani et al, 2001). De acordo com Valdez-Moreno et al (2010) estudos ecológicos sobre a biodiversidade e distribuição larval dos peixes marinhos, requerem uma identificação taxonômica precisa. No entanto, há dificuldades em identificar as larvas de peixes a nível de espécie, pois o método mais utilizado é baseado nas características morfológicas com ajuda de guias de identificação. Atualmente são poucos os guias de identificação existentes e grande parte deles apresentam as descrições morfológicas baseadas em larvas de peixes adultos (Pegg et al., 2006). O grande problema é que as larvas de peixes possuem vários estágios em seu desenvolvimento inicial, e nas primeiras etapas as larvas são bastante semelhantes o que dificulta a identificação desses organismos (Frantine-Silva et al., 2015).

Desse modo, técnicas baseadas em DNA passaram a ser utilizadas na identificação de larvas de peixes. Uns dos métodos utilizado é o DNA Barcode, baseado na baixa variação intraespecífica e na alta variação interespecífica de um pequeno fragmento de 648 pb na extremidade 5' do gene citocromo c oxidase da subunidade I (COI), facilitando a

discriminação e identificação de espécies de animais (Hebert et al., 2003).

Devido a sua rapidez e confiabilidade, a ferramenta passou a ser bastante utilizada para identificar larvas de peixes marinhos no Brasil, ainda com baixa frequência, e no mundo. (Rodrigues et al., 2017; Valdez-Moreno et al 2010; Ko et al 2013 e Ardura et al 2016). Além de permitir uma identificação mais precisa, a ferramenta se mostra promissora por auxiliar os taxonomistas ao revelar diversidades negligenciadas e agilizar a descrição de novas espécies (Gregory, 2005).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo identificar as larvas de peixes, utilizando o método morfológico e comparar com a técnica de identificação do DNA Barconde, visando comparar os táxons identificados e avaliar a precisão da identificação morfológica do material coletado na plataforma continental amazônica.

2 JUSTIFICATIVA

Historicamente a identificação de larvas de peixes sempre utilizou a identificação com base nos caracteres morfológicos como formato do corpo, pigmentação, número de miômeros, espinhos e raios. No entanto, esses caracteres não são suficientes para identificar todas as espécies, principalmente aquelas espécies raras. A escassez dos guias de identificação e a limitação das descrições morfológicas de muitas espécies de larvas de peixes também é um obstáculo para a identificação desses organismos. Por essa razão, muitos trabalhos com larvas de peixes são limitados à identificação apenas a nível de família, devido à grande dificuldade de se chegar ao nível de espécie.

Atrelado a isso, no Brasil os trabalhos produzidos sobre os estágios iniciais da vida dos peixes são desiguais pois maior parte dos estudos realizados ocorrem na região sul e sudeste do país, enquanto a região norte ainda é uma das regiões escassas de trabalhos referentes a comunidade ictioplanctônica.

A identificação morfológica não é uma metodologia livre de erros e uma identificação equivocada dos estágios iniciais das espécies de peixes, poderão acarretar problemas nos monitoramentos e nos manejos da pesca. Por esse motivo, muitos pesquisadores se voltaram para a análise molecular, como uma forma de garantir rapidez e segurança na identificação desse grupo. Com isso, a análise molecular, método do DNA Barcode, será testado nas larvas de peixes coletadas no presente estudo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Estágio inicial da vida dos peixes

O estágio inicial da vida dos peixes é constituído pela fase de ovo e fase larval e o autor Ré (1999) os caracteriza como ictioplâncton. O ictioplâncton pertencem ao um grupo maior que é o plâncton, este é definido pelo mesmo autor como organismos que não conseguem vencer as correntezas e que geralmente são microscópicos.

Os ovos de peixes, em grande parte são pelágicos e transparentes e sua forma geralmente é esférica (Ré, 1999). O autor cita que os ovos apresentam uma camada exterior com pequenos orifícios em quantidade variável. Dentro de uma mesma espécie, as propriedades dos ovos, como tamanho, quantidade e tamanho das gotas de óleos, coloração, forma e desenvolvimento do embrião, mostram pouca variação.

O autor ainda ressalta que a duração do processo de desenvolvimento embrionário varia consideravelmente, sendo específica para cada espécie e principalmente influenciada pela temperatura.

Já a fase larval da vida dos peixes é dividida em três estágio de desenvolvimento (fase larval, larva em estágio de transformação e o estágio juvenil) (Figura 1) com base nos estudos de Moser (1996).

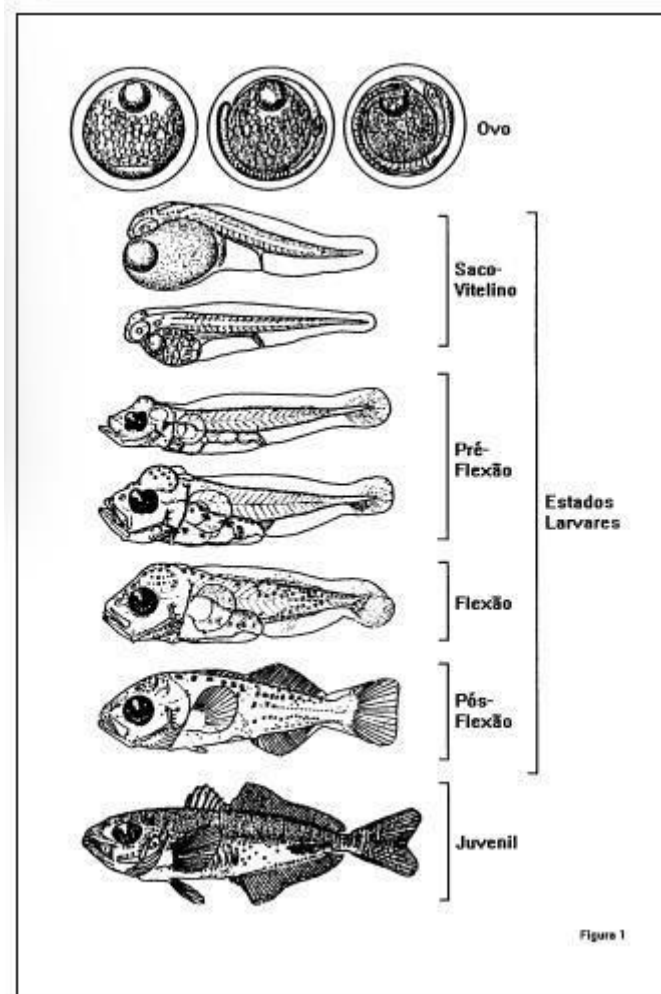
Larva – essa etapa pode ser dividida em três subestágios com base no grau de flexão da notocorda durante a formação da nadadeira caudal:

- Pré-flexão – a partir do final da absorção do saco vitelino até o início da flexão da notocorda;
- Flexão – desde o início da flexão da notocorda até a formação dos ossos hipurais;
- Pós-flexão – após a completa flexão da notocorda.

Larva em estágio de transformação – Durante esse período, ocorrem transformações na forma geral e estrutural, à medida que os indivíduos adquirem características semelhantes aos adultos e deixam de apresentar características de larvas. Há mudanças nas proporções corporais, como migração das nadadeiras, aumento da pigmentação, altura do corpo, comprimento da cabeça, entre outros aspectos.

Estágio juvenil – é aquele em que a transformação se completa e os espécimes é morfológicamente similar ao adulto com nadadeiras e escamação completamente formados.

Figura 1 – Exemplo dos estágios de desenvolvimento dos peixes



Fonte: (Moser, 1996)

De acordo com Ré (1999) a maioria dos peixes teleósteos marinhos emitem ovos planctônicos, principalmente as espécies de importância comercial. O autor também fala que essa é a fase de maior vulnerabilidade, devido a maior taxa de mortalidade, doenças e transportes, que podem ocorrer para áreas desfavoráveis. Logo é uma fase que requer toda atenção, pois os estoques de peixes adultos dependem dessa fase (Correia et al, 2012).

3. 2 Identificação morfológica do estágio inicial da vida dos peixes na região norte

Comparada com as demais regiões do Brasil, a região norte ainda é escassa em trabalhos sobre os estágios iniciais da vida dos peixes. Grande parte dos trabalhos desenvolvidos na região norte utilizaram apenas o método morfológico para a

identificação das larvas de peixes e tendo como objetivo caracterizar a composição e distribuição de forma espacial ou temporal dos ovos e larvas de peixes correlacionando com os fatores ambientais na região. A seguir alguns exemplos de estudos que foram realizados na região:

Campos (2002) caracterizou ovos e larvas de peixes em uma prospecção na costa do estado do Amapá. Enquanto, Silveira (2003) durante o Programa de Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva (REVIZZE NORTE) estudou os estágios iniciais da vida dos peixes na costa do estado do Maranhão.

Bittencourt (2004) caracterizou a composição e distribuição e abundância de ovos e larvas de peixes na costa do estado do Amapá, durante a expedição do REVIZZE NORTE III. Campos (2005) caracterizou os ovos e larvas de peixes na costa do estado do Amapá e na Foz do rio Amazonas.

Zacardi et al (2008) determinou a composição e distribuição de ovos e larvas de peixes na costa do estado do Pará, durante o programa REVIZZE. Mangas (2014) caracterizou a composição e distribuição de ovos e larvas de peixes na Plataforma Continental Norte Brasileira, em frente à costa do estado do Pará. O trabalho de Ferreira et al (2014) caracterizou a diversidade e a distribuição espacial de ovos e larvas de peixes na Plataforma Continental Norte Brasileira.

Zarcadi (2015) determinou a diversidade das famílias de larvas de peixes na costa do estado do Amapá. Costa (2017) estudou a composição e distribuição de ovos e larvas de peixes na costa do Maranhão. Bonecker e Castro (2018) determinaram a assembleia de larvas de peixes na Bacia da Foz do rio Amazonas.

3.2 Uso do DNA Barcorde no estágio inicial da vida dos peixes

Em 2003 Hebert e colaboradores pela primeira vez propuseram uma abordagem que tinha como objetivo distinguir e depois identificar espécies com base em exemplares validamente identificados. Essa abordagem foi denominada de “DNA Barcode”, fazendo alusão aos códigos de barras padrão utilizados em produtos comerciais (Frantine-Silva et al 2015). Os autores ainda ressaltam que com essa proposta, cada espécie catalogada teria uma sequência única ou um conjunto reduzido de sequências encontradas exclusivamente entre seus semelhantes.

De acordo com Moritz e Cicero (2004) e Savolainen et al (2005) a definição da sequência padrão é de grande importância para o correto funcionamento desta metodologia. Além das características como uma baixa distância intraespecífica e alta

distância interespecífica. Os autores Hebert et al (2003) citam que a região do genoma a ser usada como “Sequência Barcode” também deve incluir regiões conservadoras adjacentes para a criação de primers que possam ser utilizados em diferentes táxons em níveis mais altos, como entre famílias ou até mesmo ordens distintas.

Com isso, a aplicação do DNA Barcode passou a utilizar o gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade I (COI), em vez de gene nuclear, pois eles possuem vantagens de não possuir íntrons, modo de herança haploides, ampla seleção de primers e um maior número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) presente em cada célula, aumentando significativamente a sensibilidade da análise (Branicki et al, 2003).

Assim, o gene citocromo c oxidase I (COI) foi selecionado para o papel de “códigos de barras universal”, devido sua taxa relativamente alta de evolução molecular e baixo número de mutações por inserção ou deleção, quando comparado às sequências ribossômicas de 16S (Hebert et al, 2003). De acordo com Ward et al (2005), o gene COI também se mostrou uma ferramenta sensível para ajudar a discriminar identidades de animais.

Com isso, a técnica do DNA Barcode foi utilizada pela primeira vez em peixes marinhos pelo autor Ward (2005) para identificar as espécies de peixes presentes na Austrália. Enquanto Pegg et al (2006) introduziu o uso da técnica para identificar larvas de peixes presentes na Grande Barreira de Corais da Austrália.

A partir disso muitos trabalhos utilizando a técnica do DNA Barcode passou a ser empregada para identificar ovos e larvas de peixes. Como o trabalho de Paine et al (2008) que fez uso da técnica para identificar larvas e juvenis de (*Lutjanus cyanopterus*) no Arquipélago de San Blas no Panamá. Enquanto Valdez-Moreno et al (2010) por meio do DNA Barcode conseguiu conectar estágios iniciais de peixes marinhos aos estágios adultos da Península de Yucatán no México.

Hebert et al (2010) identificou por meio da técnica larvas de peixes das famílias Holocentridae e Acanthuridae no Arquipélago de Tetiadora, localizado na França.

Baldwin et al (2011) estabeleceram conexões, com DNA Barcode, entre os estágios de larva, juvenil e fase adulta das espécies de peixes pertencentes ao gênero *Apogon*, em áreas de Caribe do Atlântico Central Oriental. Os autores Matarese et al (2011) identificaram larvas de peixes da família Cottidae (*Zesticelus profundorum*) no Golfo do Alasca com a técnica do Barcode.

O estudo de Ko et al (2013) realizado na Plataforma Continental de Taiwan, utilizou o DNA Barcode para avaliar a precisão da identificação morfológica de larvas de peixes, em que, a ferramenta mostrou uma precisão da identificação morfológica de apenas 13% a nível de espécie, sendo a maior precisão obtida a nível de família, de 74,8%.

Chen et al (2013) utilizou a técnica para identificar larvas de peixes da ilha de Dondsha, localizada no Mar da China Meridional, conseguindo identificar 26 espécies de peixes. Um estudo realizado pelos autores Hubert et al (2014) em um recife de coral na Austrália, identificaram a comunidade ictioplanctônica por meio do DNA Barcode e conseguiram obter eficiência de 75% na identificação

Díaz-Viloria et al (2014) usou a ferramenta para confirmar a identificação de larvas de peixes da espécie *Engraulis mordax* no Golfo da Califórnia e 90% das sequências foram identificadas e confirmaram a determinada espécie. Baldwin e Johnson (2014) empregaram o método morfológico em conjunto com a técnica do DNA Barcode para estabelecer uma ligação entre a fase larval de peixes da espécie *Liopromoma olneyi* e sua fase adulta no ambiente marinho do Caribe.

Burghart et al. (2014) empregaram a técnica de DNA Barcode para a identificação de ovos e larvas de peixes na Reserva Aquática Terra Ceia, localizada na Flórida, com o propósito de comparar a comunidade de ovos com a comunidade larval de peixes.

O trabalho dos autores Pappalardo et al (2015), realizado no Canal da Sicília, Mar Mediterrâneo, teve como objetivo confirmar a identificação morfológica por meio do DNA Barcode as larvas de peixes-lanterna, da família Myctophidae. Os autores identificaram 5 espécies diferentes.

O trabalho de Harada et al (2015) mostra o uso da técnica do DNA Barcode para identificar ovos de peixes e monitorar a atividade de desova. Os autores obtiveram uma eficiência de 100% da ferramenta conseguindo a identificação de 39 espécies de peixes pertencentes à uma reserva marinha em San-Diego, Califórnia

Pucher et al (2015) utilizou a técnica para identificar larvas de peixes da família Scombridae, coletados em três sítios de desova do Mar Mediterrâneo. No estudo de Thiumaraiselvi et al (2015) realizado no estuário Vellar, na Índia, os autores utilizaram a técnica para identificar larvas de peixes e conseguindo a identificação ao menor nível taxonômico.

O trabalho de García-Davila et al (2015) utilizaram o DNA Barcode para estudar a reprodução das espécies de peixes da família Pimelodidae, conhecidos popularmente como os bagres amazônicos. Os autores identificaram as larvas, coletadas nos rios Napo, Marañon e Ucayali, localizados na Amazônia Peruana.

Lewis et al (2016) fez uso da técnica para identificar ovos com objetivo de monitorar a atividade de desova das espécies da Plataforma Continental do Nordeste dos Estados Unidos. Os autores obtiveram 100% da eficiência da ferramenta identificando 50 espécies de peixes. O trabalho dos autores Ardura et al (2016) teve como objetivo estudar a diversidade das larvas de peixes em um gradiente longitudinal no Oceano Atlântico Oriental, estimado através do DNA Barcode. Os autores conseguiram identificar 44 espécies (51,1%) de 237 larvas.

Anibaldi et al (2016) utilizando a técnica os autores fizeram identificações de larvas de leptocéfalos, pertencentes à ordem dos peixes Albuliformes, coletadas no Sul do Mar Adriático. Esses peixes são conhecidos como leptocéfalos durante a fase larval, sendo notoriamente desafiadores de identificar. Camacho-Gastélum et al (2016) empregaram a identificação morfológica e o DNA Barcode para determinar as espécies de peixes pertencentes à família Sciaenidae. Coletadas no Golfo da Califórnia. Eles identificaram quatro espécies por meios das técnicas.

Levy-Cruz et al (2016) aplicaram a técnica para identificar ovos de peixes coletados na Península de Yucantan, México. Resultando na identificação de 33 espécies distintas. Ayala, Riemann e Munk (2016) empregaram igualmente ambos os métodos para a identificação de larvas de peixes na zona de convergência subtropical no Mar de Sargasso, localizado no Atlântico Norte, visando descrever a diversidade presente na região de pesquisa.

Azmir et al. (2017) empregaram ambos os métodos na identificação de larvas de peixes coletadas em regiões de mangue na Península da Malásia. O estudo revela que o DNA Barcode se destacou como a ferramenta mais eficaz para a identificação.

Isari et al (2017) empregaram ambas as técnicas para identificar larvas de peixes no centro do Mar Vermelho. Os autores McKenzie e Bremer (2017) fizeram uso do DNA Barcode para identificar larvas de peixes da família Istiophoridae no Golfo do México, resultando na identificação de quatro espécies distintas. Nuryanto et al (2017) empregou

a técnica do DNA Barcoding para identificar larvas de peixes no Leste de Plawangan, na Indonésia.

Burrows et al (2018) empregaram a técnica para identificar ovos e larvas de peixes do Golfo do México, com o objetivo de estabelecer as áreas de desova das espécies de peixes costeiros e oceânicos. Collet et al (2018) aplicaram a técnica para identificar larvas de peixes na Ilha da Reunião, localizado no Oceano Índico.

Wibowo et al (2018) utilizaram o DNA Barcoding para identificar larvas de peixes em águas costeiras próximas a Jacarta e no Mar de Banda, localizados na Indonésia. Jonh et al (2018) empregaram a técnica para amostras de larvas, ovos e juvenis de peixes no rio tropical Kuantan, localizado na Malásia, conseguindo a identificação de 28 espécies. Shin et al (2018) fizeram uso das duas técnicas para identificar larvas de peixes da espécie *Porocottus leptosomus*, em Busan na Coreia do Sul.

Chu et al (2019) empregaram ambos os métodos para identificar larvas de peixes que habitam os estuários no estreito da Malaca, localizado na Malásia, resultando na identificação de 32 espécies. Os autores Uriarte et al (2019) empregaram a técnica do DNA Barcoding para realizar a identificação dos componentes alimentares de origem animal presentes nas larvas de peixes das espécies *Thunnus thynnus*, no Mar das Baleares, encontrado no Mar Mediterrâneo.

No estudo de Hou et al (2020) foram empregados métodos de identificação morfológica e a técnica do DNA Barcode para determinar as espécies de peixes do gênero *Decapterus* presentes nos ovos coletados na região sul do Mar da China. Como resultado, foram identificadas quatro espécies distintas. No estudo conduzido por Kerr et al (2020), a técnica do DNA Barcode foi aplicada para a identificação de ovos de peixes coletados na região noroeste de Cuba e do Estreito da Flórida. Utilizando essa abordagem, os pesquisadores conseguiram identificar um total de 89 espécies pertencentes à 30 famílias diferentes.

No estudo conduzido por Hou et al (2021) a técnica do DNA Barcode foi utilizada para identificar larvas de peixes encontradas na região sul do Mar da China. Por meio dessa técnica, os pesquisadores obtiveram sucesso na identificação de um total de 101 espécies distintas.

No estudo conduzido por Rathnasurya et al (2021) foi empregado tanto a técnica do DNA Barcode quanto a identificação morfológica para determinar a composição e distribuição de larvas de peixes nas águas do Sri Lanka, localizado no centro-norte do oceano Índico. Os pesquisadores identificaram um total de 80 espécies pertencentes a 69 famílias diferentes. Um estudo foi conduzido por Xing et al (2021) nas águas do Havaí, utilizando a técnica do DNA Barcoding para detecção de larvas de peixes. Os resultados dessa pesquisa revelaram a presença de 20 espécies distintas.

Um estudo realizado pelos autores Dulčić et al (2022) nas águas do mar Adriático, adjacente ao mar Mediterrâneo, utilizou a abordagem do DNA Barcode para reconhecer larvas de espécies de peixes. Durante as pesquisas, os pesquisadores encontraram uma espécie rara, *Buenia massutii*, pertencente à família Gobiidae. Um estudo realizado por Huang et al (2022) utilizou a técnica do DNA Barcoding para identificar larvas de peixes nas águas do mar da China. Durante a pesquisa, foram registradas 31 espécies diferentes.

Xu et al (2023) também empregaram ambos os métodos para identificar larvas de peixes da família Myctophidae, da região de extensão do Kuroshio, localizado no Japão. Os autores identificaram 6 espécies e 2 gêneros de 110 indivíduos.

Morales-Pulido et al (2023) fizeram uso do DNA Barcode para diferenciar as espécies de peixes, *Bothus ocellatus* e *Bothus robinsi* da família Bothidae do Golfo do México. Apenas o método morfológico não é suficiente para distinguir essas duas espécies, pois são muito similares. No entanto, os autores mostram a precisão e eficiência da ferramenta ao conseguir distinguir essas espécies. Jiang et al (2023) compararam os dois métodos de identificação para larvas e ovos de peixes no oeste do Mar da China. O método morfológico identificou 15 espécies, enquanto, o DNA Barcode identificou 30 espécies de peixes.

Mahala et al (2024) utilizaram a ferramenta DNA Barcode para avaliar a diversidade de larvas de peixes marinhas da costa de Moçambique. Resultando na identificação de 143 espécies distintas.

3.3 Uso do DNA Barcode no estágio inicial da vida dos peixes no Brasil

No Brasil, as pesquisas que empregaram essa técnica para a identificação dos estágios iniciais da vida dos peixes concentraram-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste, com um foco principal em ecossistemas de água doce (Frantine-Silva, 2015).

As pesquisas efetuadas se direcionaram predominantemente para o rio Parapanema, devido à presença de numerosas usinas hidrelétricas, que provocam perturbações no ambiente e, por conseguinte, afetam a vida aquática. Frantine-Silva (2014) introduziu a técnica do DNA Barcode, pela primeira vez no Brasil, para identificar ovos e larvas de peixes da bacia do médio-baixo rio Parapanema. Além dele os autores (Frantine-Silva et al, 2015; Lima, 2016; Almeida et al, 2017; Lima et al, 2020) utilizaram a técnica para identificar ovos e larvas de peixes no rio Parapanema.

Dos trabalhos realizados em ambientes marinhos ou estuarinos no Brasil, podemos citar o de Rodrigues et al (2017) que empregou o método do DNA Barcode para identificar larvas de peixes das famílias Xiphiidae e Istiophoridae coletadas na Plataforma Sudeste do Brasil. Enquanto, Julio et al (2022) fizeram uso da identificação morfológica e do DNA Barcode para identificar larvas de peixes da família Engraulidae em quatro estuários do Rio de Janeiro.

Na região Norte do Brasil, Morales (2023) empregou a técnica do DNA Barcode para a identificação de ovos, larvas e adultos de peixes no baixo rio Purus, na Amazônia, enquanto Lutz et al. (2023) utilizou essa abordagem para a caracterização de juvenis de peixes no estuário do rio Caeté.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a eficácia da técnica do DNA Barcode visando avaliar a precisão da identificação morfológica em larvas de peixes, coletadas na plataforma continental amazônica.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar as larvas de peixes presentes na área de estudo ao menor nível taxonômico por meio do método morfológico, a partir de caracteres morfométricos e merísticos.
- ✓ Identificar as larvas de peixes presentes na área de estudo, ao menor nível taxonômico, com uso do DNA Barcode.
- ✓ Comparar os dois métodos de identificação e avaliar a precisão da identificação morfológica e a eficácia do DNA Barcode.

5 MATERIAL E MÉTODOS

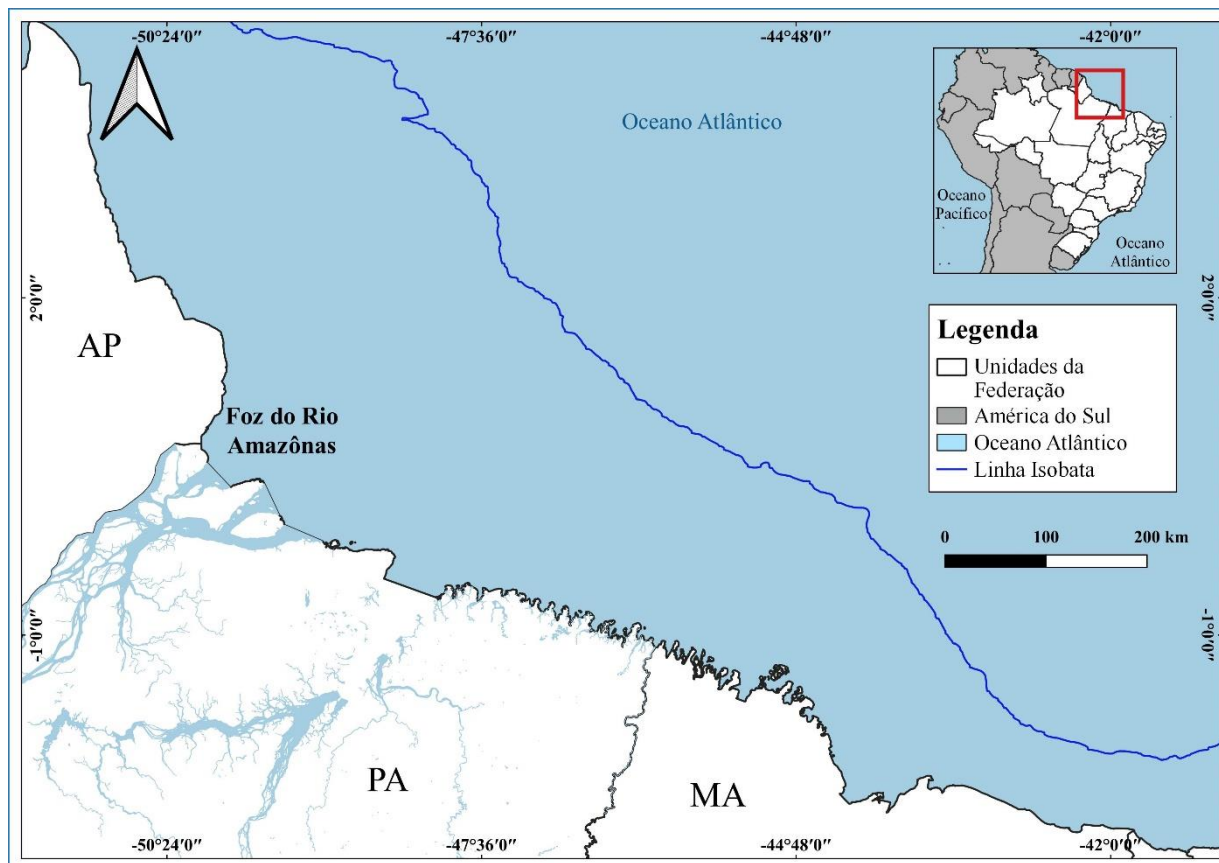
5.1. Área de estudo

A plataforma continental amazônica brasileira estende-se desde a foz do rio Oiapoque (5°N , 51°W), na fronteira entre o Brasil e a Guiana Francesa, até a Baía de São Marcos (2°S , 44°W), no Maranhão. Esta região é marcada por um relevo fisiográfico suave, uma vasta faixa costeira, uma grande quantidade de rios que deságuam e um processo ativo de erosão e sedimentação. Referência!

É reconhecida por abrigar a maior extensão contínua de manguezais do mundo, cobrindo uma área total de 7.591 km^2 , desde a Baía de Marajó (PA) até a ponta do Tubarão, na Baía de São José (MA), além de aproximadamente 1.800 km^2 ao longo da costa do Amapá (Souza Filho, 2005).

A zona costeira está diretamente influenciada pelo ciclo hidrológico da região, predominantemente pela descarga do rio Amazonas (Figura 2), que apresenta dois períodos distintos: a "seca", entre outubro e novembro, e as "cheias", entre maio e junho (Filizola et al., 2006).

Figura 2 – Mapa de localização da área de estudo. Plataforma continental amazônica



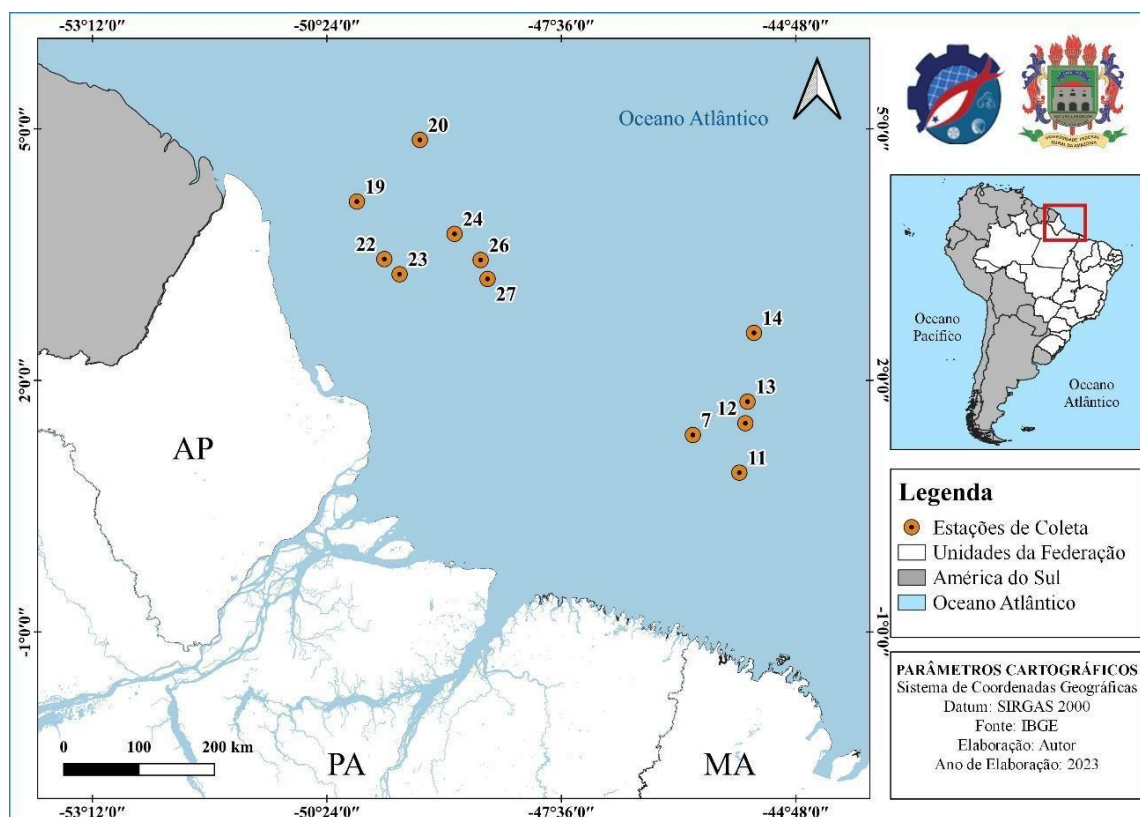
Fonte: Arquivo pessoal

5.2 Coleta do material biológico

As amostras foram coletadas entre setembro e outubro de 2021 e fazem parte do projeto de cooperação franco-brasileira Amazon shelf mixing and its impacts in the ecosystems – AMAZOMIX. O projeto tem como principal objetivo avaliar a eficácia da análise molecular na comunidade do icteoplâncton.

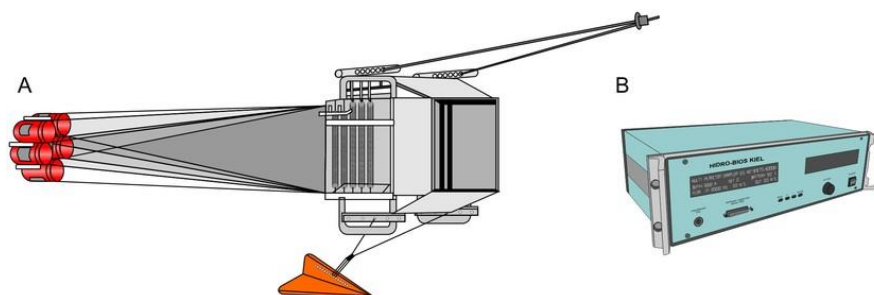
As amostras foram coletadas em 12 estações, destinadas a biologia molecular (Figura 3). Para a coleta dos organismos foi utilizado um amostrador múltiplo do tipo Multinet Midi (5 redes de 300 μm) (Figura 4) a qual permite mostrar as camadas de água específicas em diferentes profundidades, na coluna de água compreendida entre 0 e 200 m. A coleta aconteceu a bordo do navio de pesquisa francês Antares (Figura 5). As amostras que foram coletadas para a análise molecular foram fixadas com etanol a 90% Refrigeradas.

Figura 3 – Mapa da área de estudo com as estações de coleta na plataforma continental amazônica



Fonte: A autora (2024)

Figura 4 – Exemplo do amostrador Multinet Mind



Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-918-Multinet-A-amostrador-e-B-unidade-de-comando->

Figura 5 – Navio Francês Antares



Fonte: Arquivo Pessoal

5.3 Identificação morfológica do material biológico

Em uma sala localizada no prédio de docência da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) campus Belém, as amostras foram analisadas, com intuito de evitar a contaminação, onde as larvas de peixes foram separadas dos demais organismos planctônicos, com auxílio de um microscópio estereoscópio (Lupa) da marca motic e placas de petri.

As larvas de peixes foram quantificadas e identificadas ao menor nível taxonômico com auxílio de bibliografias especializadas como Bonecker et al (2014), Richard (2006) entre outras. Posteriormente foram armazenadas em frascos de vidros de 5 ml com etanol a 90%, e devidamente etiquetadas. Algumas famílias e gêneros identificados foram categorizados em morfotipos.

5.2 Análise da biologia molecular

O processamento das análises de biologia molecular foi realizado no Laboratório de Genética Aplicada da Universidade Federal Rural da Amazônia – LGA/UFRA. A extração de DNA das larvas de peixes foi realizada com kit de extração da marca PureLinK- INVITROGEN.

Larvas menores que 4 mm de comprimento foram maceradas, enquanto larvas maiores que 4 mm foram parcialmente utilizadas, em que, parte do pedúnculo caudal é cortado, evitando a região intestinal, possível região de contaminação. O processo de extração é realizado de acordo com o protocolo disponível no kit. O DNA

obtido e quantificado por espectrofotometria no *Biodrop Duo spectrophotometer* (Bio drop).

Para a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) foi feita uma solução de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 10,5 µl de água ultrapura; 12,5 µl de Mastermix; 0,5 µl de cada primer e 1 µl de molde de DNA. Os primers utilizados foram Fish F1(5'TCAACCAACCACAAAGACATTGG-CAC3') e Fish R1(5'TAGACTTCTGGGTGGC-CAAAGAATCA3'), que produzem produtos de tamanhos de aproximadamente 600pb, descritos por Ward (2005).

As condições da ciclagem térmica consistem em etapa inicial de desnaturação de 4 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94°C 40s); anelamento (51°C 1 min) e extensão (72°C 1 min 30 s), com uma extensão final a 72°C 10 min. A PCR é feita em um termociclador da marca AB 2720 (Applied Biosystems). Uma amostra de controle negativo sem molde de DNA é utilizada para indicar ausência de contaminação. O resultado da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e em seguida observado em um fotodocumentador da marca Locusbiotecnologia (L-PIX).

A purificação foi realizada a partir da mistura de 2,5 µl PCR e 1 µl da enzima *ExoSAP-IT*® PCR Product Cleanup Kit (GE Life sciences). Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento com o kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, EUA) de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes e sequenciados em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). As sequências são alinhadas no software BioEdit (HALL, 1999).

5.3 Análise dos dados

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa BioEdit. As sequências finais foram alinhadas usando o clustalW, implementando no GENEIOUS 9.0.5. todas as sequências geradas foram comparadas usando o mecanismo de busca BLAST da National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o banco de dados Barcode of Life Data Systems (BOLD).

Para a identificação das espécies foi utilizado o critério de classificação com base no nível de similaridade de (Ko et al, 2013): > 99% espécie, > 92% e < 99% gênero e < 92% família.

Após análises das sequências, parâmetros como presença de códon de parada, comprimento da sequência e distâncias intra/interespecífica dentro das famílias, gêneros, espécies e distâncias mínimas para o vizinho mais próximo foram calculados usando

ferramentas do banco de dados do BOLD, utilizando o modelo de Kimura-2 com replicações 1000 bootstrap. A construção da árvore filogenética foi realizada no software MEGA X v10.0.5 utilizando o método do Neighbor-Joining baseado no modelo Kimura-2 com replicações de 1000 bootstrap.

5.4 Densidade de organismos

O número de larvas dos táxons identificados e os ovos encontrados em cada estação foi convertido para densidade de larvas por 100m³, sendo necessário estimar antes o volume de água filtrado (Nakatani et al., 2001).

$$V = a \cdot n \cdot c$$

Onde: **V** = Volume de água filtrado (m³);

a = área da boca da rede (m²);

n = n° de rotações do fluxômetro e

c = taxa de calibração do fluxômetro

A densidade de ovos e larvas foi calculada através da fórmula:

$$d = N / V$$

Onde: **d** = densidade por 100m³

N = número de ovos ou larvas coletadas

V = volume de água filtrada (m³)

5.5 Abundância relativa

A abundância relativa foi calculada de acordo com a fórmula (Nakatani et al., 2001):

$$Ar = (Na \times 100) / NA$$

Onde: **Na** é número total de larvas de peixes de cada espécie obtida na amostra e **NA** é o número total de larvas de peixes na amostra.

Os resultados foram dados em percentagem, tendo sido utilizado o seguinte critério:

>70% → dominante

70% ┆ 40% → abundante

40% ┆ 10% → pouco abundante

≤ 10% → raro

6 RESULTADOS

76 larvas de peixes foram destinadas à análise molecular, onde um fragmento de aproximadamente 600pb da região COI foi isolado de 54 larvas. Na identificação morfológica preliminar, foram analisadas 343 larvas distribuídas em 10 ordens, 30 famílias, 29 gêneros e 17 espécies. Dessa identificação 76 larvas, de cada grupo taxonômico, foram analisadas pelo Barcode. Resultando na identificação de 8 ordens, 31 famílias, 16 gêneros e 34 espécies.

Após a comparação das sequências obtidas com as sequências disponíveis em banco de dados públicos, 27% das amostras divergiram da identificação morfológica preliminar (Tabela 1). Todas as sequências foram armazenadas no BOLD, onde foi criado o projeto “AMAZOMIX-UFRA” cujo números de sequência de acesso vão de MJSO0001-23 a MJSO054-24.

A pesquisa realizada no banco de dados revelou que algumas sequências apresentaram códon de parada, sugerindo que marcador mitocondrial COI pode não ser totalmente eficiente.

A análise filogenética conseguiu distinguir os táxons identificados, resultando na formação de clados monofiléticos para a grande maioria dos grupos, nos quais táxons da mesma família foram agrupados.

No entanto, os táxons identificados pertencentes à família de peixes Labridae não foram agrupados como esperado, indicando que o marcador COI pode não ser eficaz para esses grupos específicos de peixes. (Figura 6).

As distâncias de Kimura-2 geral das sequências COI são mostradas na (Tabela 2). As distâncias intraespecíficas (dentro das espécies) não sofreram variação, pois apenas um espécime de cada espécie foi utilizado.

Enquanto as distâncias interespecíficas (dentro do gênero) variaram de 2.09% a 24.66%, o que é maior do que a distância intraespecífica mínima de 2%, o limite para a identificação de espécies de peixes pelo DNA Barcode. Esta distância aumentou com o aumento do nível taxonômico dentro das famílias variando de 9.80% a 31.29%.

A espécie de larva de peixe que apresentou uma abundância significativa foi a *Parexocoeteus hillianus* (19,01%) classificada como pouco abundante. As demais espécies obtiveram abundância inferior a 10% sendo classificadas como raras.

Tabela 1 – Lista das larvas de peixes da plataforma continental amazônica identificadas pela morfologia e DNA Barcode. BOLD= Banco de dados BOLD SYSTEM. GB = GenBank.

Morphological identification	Acess BOLD	Identified species	Family	Similarity BOLD	Similarity GB	Morphological error	BIN BOLD
<i>Serranus sp II</i>	MJSO002-23	<i>Serranus baldwini</i>	Serranidae	100%	100%	No	BOLD:AAA6921
<i>Decapterus sp</i>	MJSO003-23	<i>Decapterus macarellus</i>	Carangidae	100%	100%	No	BOLD:AAI3669
<i>Eucinostomus spp</i>	MJSO001-23	<i>Eucinostomus harengulus</i>	Gerreidae	100%	99.51%	No	BOLD:AAA5333
Myctophidae	MJSO004-23	<i>Haemulon steindachneri</i>	Haemulidae	100%	100%	Yes	BOLD:AAC5791
<i>Lepidophanes sp</i>	MJSO005-23	<i>Lepidophanes guentheri</i>	Myctophidae	100%	100%	No	BOLD:AAD1806
Scombridae	MJSO015-23	<i>Auxis rochei</i>	Scombridae	100%	99.84%	No	
Labridae I	MJSO017-23	<i>Decodon puellaris</i>	Labridae	100%	92.62%	No	BOLD:ADG8016
Scombridae	MJSO027-24	<i>Ruvettus pretiosus</i>	Gemplyidae	100%	99.83%	No	BOLD:AAB1796
Scombridae	MJSO028-24	<i>Euthynnus alletteratus</i>	Scombridae	100%	99.53%	No	
<i>Scomberesox sp</i>	MJSO029-24	<i>Prognichthys occidentalis</i>	Excoetidae	100%	100%	Yes	BOLD:AAG2009
<i>Selar crumenophthalmus</i>	MJSO030-24	<i>Selar crumenophthalmus</i>	Carangidae	100%	99.24%	No	
<i>Saurida sp</i>	MJSO006-23	<i>Saurida caribbaea</i>	Synodontidae	100%	99.84%	No	BOLD:ABX9779
<i>Ophichthus sp I</i>	MJSO007-23	<i>Ophichthus cylindroideus</i>	Ophichthidae	100%	99.23%	No	BOLD:ADL7576
<i>Syacium papillosum</i>	MJSO008-23	<i>Syacium papillosum</i>	Paralichthyidae	100%	99.84%	No	BOLD:AAD4397
<i>Oligoplites saurus</i>	MJSO009-23	<i>Upeneus parvus</i>	Mulidae	100%	99.84%	Yes	BOLD:AAG7363
<i>Auxis sp</i>	MJSO010-23	<i>Auxis thazard</i>	Scombridae	100%	99.64%	No	BOLD:AAB0928
Mugilidae I	MJSO011-23	<i>Parexocoeteus hillianus</i>	Exocoetidae	100%	99.84%	Yes	BOLD:AAG2007
<i>Erotelis smaragdus</i>	MJSO012-23	<i>Eleotris amblyopsis</i>	Eleotridae	100%	91.01%	yes	BOLD:AAC9395
<i>Lutjanus sp</i>	MJSO013-23	<i>Lutjanus synagris</i>	Lutjanidae	99.47%	99.83%	No	
Scorpaenidae	MJSO014-23	<i>Pterois volitans</i>	Scorpaenidae	99.2%	99.33%	No	
<i>Bothus ocellatus</i>	MJSO016-23	<i>Bothus ocellatus</i>	Bothidae	99.68%	98.27%	No	

Labridae II	MJSO018-23	<i>Halichoeres bivittatus</i>	Labridae	99.87%	98.25%	No	
<i>Mycrognathus crinitus</i>	MJSO031-24	<i>Microphis brachyurus</i>	Syngnathidae	100%	99.32%	Yes	BOLD:AAD4081
Scorpaenidae	MJSO032-24	<i>Prionotus punctatus</i>	Triglidae	99.67%	98.39%	Yes	BOLD:AFT3387
Scombridae	MJSO033-24	<i>Ariomma bondi</i>	Ariommatidae	99.34%	98.40%	Yes	
Myctophidae	MJSO034-24	<i>Diaphus splendidus</i>	Myctophidae	99.67%	99.51%	No	BOLD:AAU0498
<i>Diaphus sp</i>	MJSO035-24	<i>Diaphus perpicillatus</i>	Myctophidae	99.83%	99.53%	No	
Phycidae	MJSO036-24	<i>Polydactylus virginicus</i>	Polynemidae	100%	99%	Yes	BOLD:AAD3370
<i>Thunnus sp</i>	MJSO037-24	<i>Scombrobrax heterolepis</i>	Scombrobracidae	100%	99.06%	Yes	BOLD:AAB6365
Carangidae	MJSO038-24	<i>Selene setapinnis</i>	Carangidae	99.51%	99.02%	No	
Sciaenidae	MJSO039-24	<i>Isopisthus remifer</i>	Sciaenidae	99.36%	99%	No	BOLD:AAI8144
Gobiidae	MJSO040-24	<i>Evorthodus lyricus</i>	Gobiidae	100%	99.51%	No	BOLD:AAE6706
<i>Callionymus bairdi</i>	MJSO041-24	<i>Callionymus bairdi</i>	Callinomyidae	99.35%	99.04%	No	
Gobiidae	MJSO020-23	<i>Bollmannia sp</i>	Gobiidae	98.53%	98.86%	No	BOLD:ACF7489
<i>Ctenogobius sp</i>	MJSO042-24	<i>Ctenogobius sp</i>	Gobiidae	98.86%	98.86%	No	BOLD:AAF8707
Myctophidae	MJSO024-23	<i>Dasyscyopelus sp</i>	Myctophidae	98.53%	97.05%	No	
Myctophidae	MJSO025-23	<i>Diaphus sp</i>	Myctophidae	98.69%	97.48%	No	
<i>Acanthurus sp</i>	MJSO043-24	<i>Acanthurus sp</i>	Acanthuridae	98.62%	97.83%	No	
<i>Pseudomyrophis sp</i>	MJSO019-23	<i>Pseudomyrophis sp</i>	Ophichthidae	97.05%	97.39%	No	BOLD:AFT0763
Ophichthidae	MJSO044-24	<i>Gordiichthys sp</i>	Ophichthidae	No data	95.21%	No	
<i>Urophycis sp</i>	MJSO026-23	<i>Polydactylus sp</i>	Polynemidae	97.09%	97.56%	Yes	
Synodontidae	MJSO045-24	<i>Synodus sp</i>	Synodontidae	97.81%	93.19%	No	
Priacanthidae	MJSO046-24	<i>Pontinus sp</i>	Scorpaenidae	95.42%	95.11%	Yes	BOLD:AFT0259
<i>Serranus sp</i>	MJSO021-23	<i>Serranus sp</i>	Serranidae	96.81%	93.90%	No	BOLD:AAH3868
Labridae	MJSO022-23	<i>Xyrichtys sp</i>	Labridae	No data	94.06%	No	BOLD:AFT9323
<i>Sparisoma sp</i>	MJSO023-23	<i>Sparisoma sp</i>	Scaridae	No data	92.66%	No	
<i>Centropyge sp</i>	MJSO047-24	Balistidae		No data	90.48%	Yes	
Ophichthidae	MJSO048-24	Nettastomatidae		No data	90.86%	Yes	
<i>Neoconger mucronatus</i>	MJSO049-24	<i>Neoconger sp</i>	Moringuidae	96.05%	96.02%	No	

<i>Lepidophanes sp</i>	MJSO050-24	<i>Lepidophanes sp</i>	Myctophidae	No data	95%	No
<i>Symphurus sp</i>	MJSO051-24	<i>Symphurus sp</i>	Cynoglossidae	No data	95%	No
Myctophidae	MJSO052-24	<i>Lampanyctus nobilis</i>	Myctophidae	100%	99.84%	No
<i>Eleotris pisonis</i>	MJSO053-24	<i>Eleotris sp</i>	Eleotridae	98.09%	97.92%	No
<i>Bregmaceros sp</i>	MJSO054-24	<i>Bregmaceros sp</i>	Bregmacerotidae	No data	95.56%	No

Fonte: O autor (2024)

Figura 6 – Árvore do vizinho mais próximo ilustrando as relações entre as larvas de peixes da Plataforma continental amazônica com base em sequências do DNA Barcode.

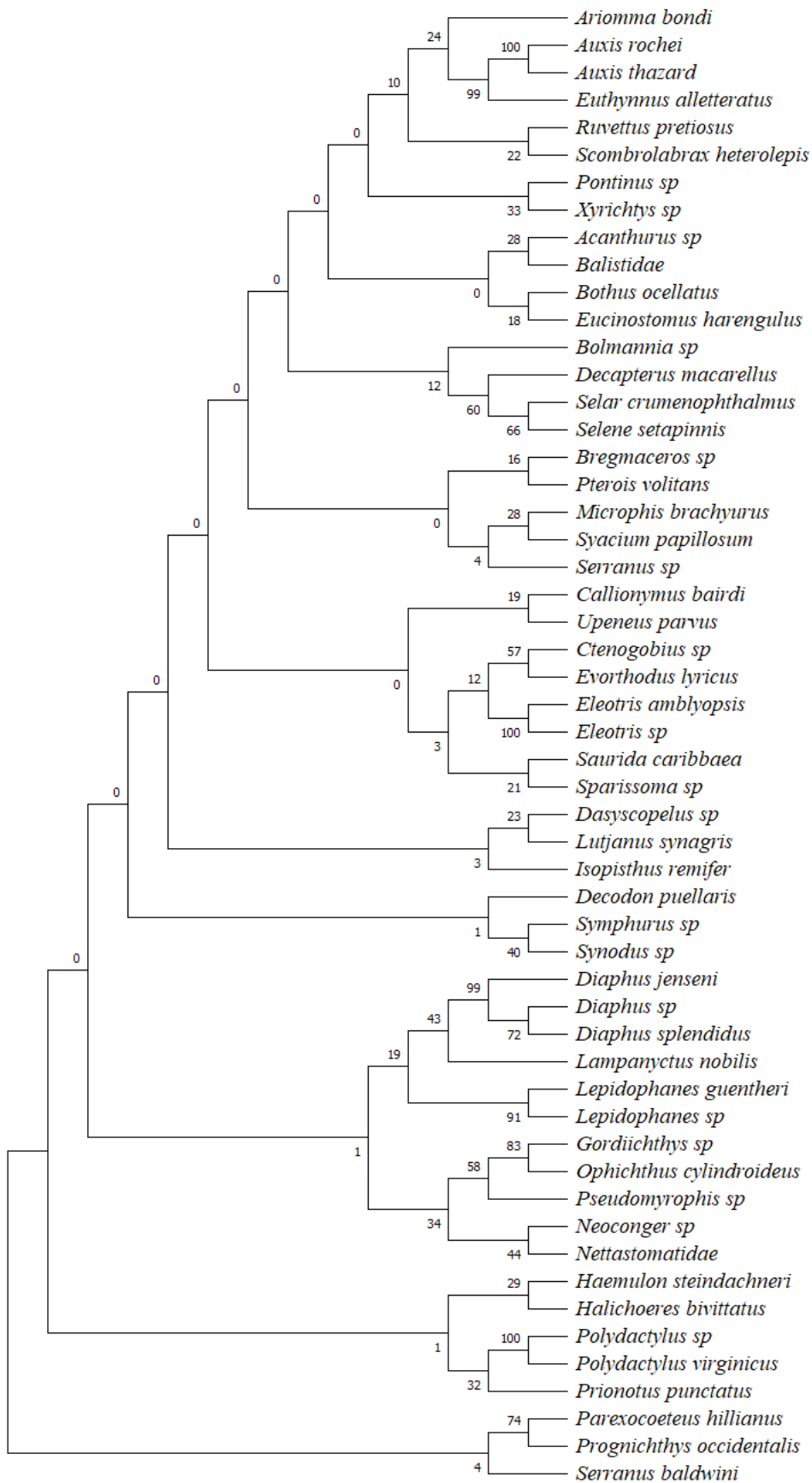


Tabela 2 – Resultados da divergência genética (Kimura-2) em cada nível taxonômico

Rótulo	n	taxa	Comparações	Dist Min (%)	Dist Méd (%)	Dist Máx(%)	Dist SE (%)
Dentro das espécies	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dentro do gênero	11	5	7	2.09	9.81	24.66	1.07
Dentro da família	23	9	18	9.80	18.49	31.29	0.26

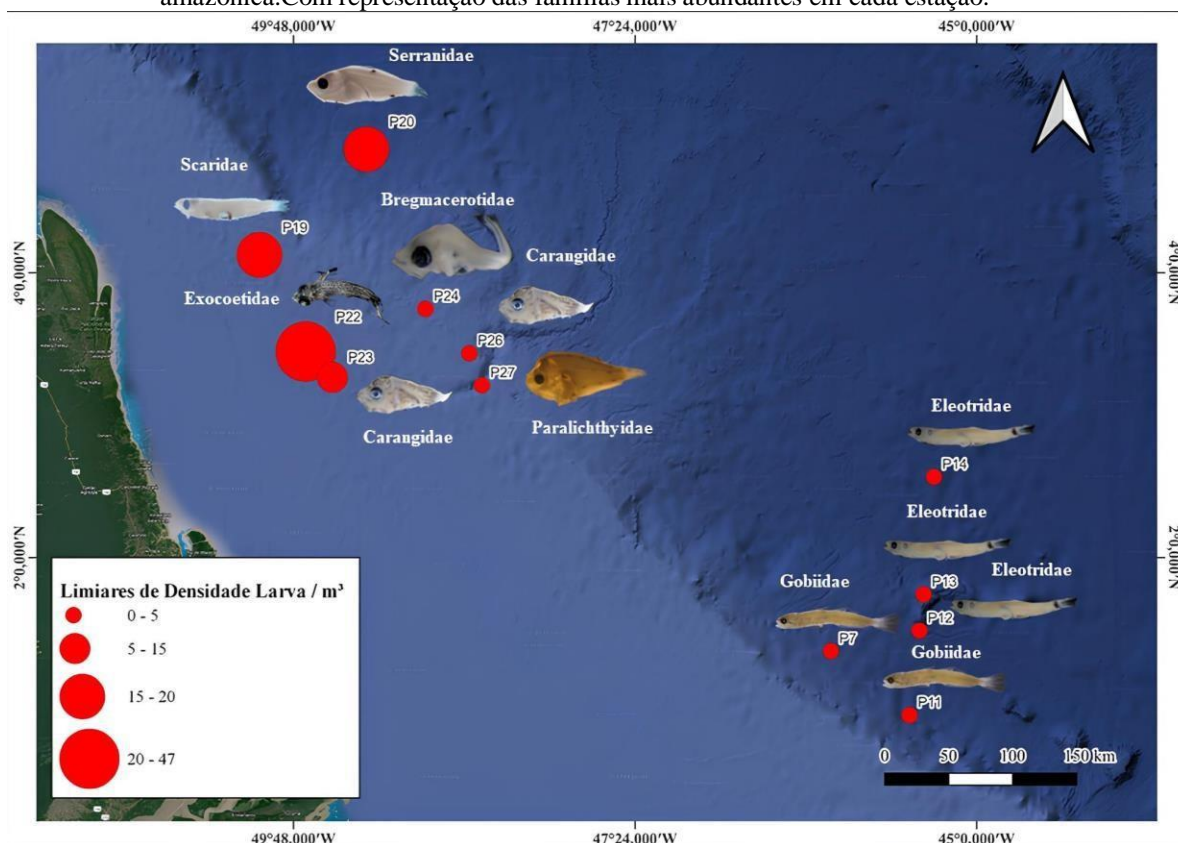
Fonte: A autora (2024)

As maiores densidades de larvas de peixes foram registradas nas estações costeiras (Figura 7), onde o maior valor de densidade foi na estação 22 com 47,22 larvas/100m³, seguida pelas estações 19 com 16,06 larvas/100m³, estação oceânica 20 com 16,09 larvas/100m³ e estação 23 com 12,50 larvas/100m³, as demais estações obtiveram valores de densidade inferiores a 5 larvas/100m³.

Em termos de abundância das famílias, na zona costeira as famílias com valores significativo de abundância foram Exocoetidae (20,85%) pouco abundante; Carangidae (10,88%) pouco abundante e Scaridae (10,88%) pouco abundante. Enquanto na região oceânica as famílias Eleotridae (20,85%); Gobiidae (10,88%) e Serranidae (10,88%) foram classificadas como pouco abundante. As demais famílias obtiveram abundância inferior a 10%.

A espécie mais frequente na região oceânica foi a *Evorthodus lyricus* (91,67%) muito frequente; *Eleotris amblyopsis* (66,67%) frequente e *Lepidophanes guentheri* (50%) frequente. Enquanto na região costeira *Ophichthus cylindroideus* (41,67%) frequente e *Sparissoma sp* (41,67%) frequente.

Figura 7 – Mapa representando valores de densidade das larvas em cada estação na plataforma continental amazônica. Com representação das famílias mais abundantes em cada estação.



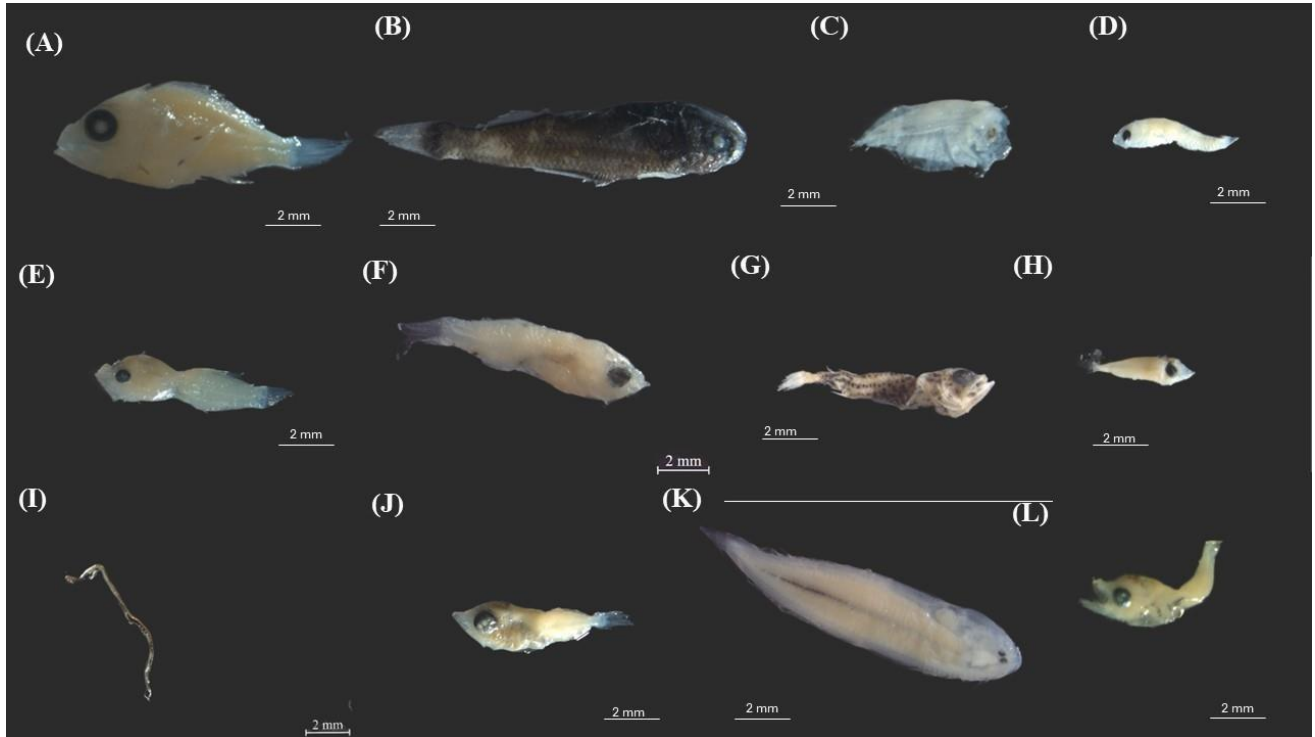
Fonte: A autora (2024)

A larva do peixe *Pterois volitans* (Figura 8) popularmente conhecido como peixe-leão, foi encontrada nas amostras. Este peixe é uma espécie exótica que foi introduzida no Brasil. Até então, capturas de indivíduos adultos foram registradas por (Cintra et al, 2023) na costa do Amapá.

No entanto, larvas dessa espécie ainda não haviam sido coletadas na região. A larva foi identificada pela morfologia a nível de família, e o DNA Barcode identificou-a a nível de espécie, revelando a presença de uma espécie invasora, possivelmente já estabelecida na plataforma continental amazônica.

Uma sequência inicialmente identificada pelo método morfológico a nível de família, Myctophidae, foi catalogada no Bold como *Diaphus jenseni*, enquanto no NCBI foi designada como *Diaphus perspicillatus*. Ambas as identificações apresentaram um nível de similaridade superior a 99%, evidenciando uma discrepância nos registros entre os bancos de dados públicos. Porém, é importante notar que a mesma sequência foi recuperada como *Diaphus perspicillatus* no Bold (acesso privado).

Figura 8 – Larvas identificadas pelo método morfológico e DNA Barcode na Costa Norte do Brasil. (A) *Pontinus sp*; (B) *Diaphus sp*; (C) *Bothus ocellatus*; (D) *Xyrichthys sp*; (E) *Pterois volitans*; (F) *Serranus Baldwin*; (G) *Prognichthys occidentalis*; (H) *Lampanyctus nobilis*; (I) *Microphis brachyurus*; (J) *Auxis thazard*; (K) *Symphurus sp*; (L) *Scombrolabrax heterolepis*



Fonte: O autor (2023)

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que houve uma divergência de 27% entre as identificações morfológicas e as análises de DNA Barcode. Os equívocos foram identificados especialmente entre grupos de larvas de peixes com características morfológicas muito similares.

A divergência entre os dois métodos corroboram com os trabalhos (Xing et al., 2022; Lutz et al., 2023; Muhala et al., 2024). Para evitar erros na identificação morfológica Ko et al., (2013) sugere que a identificação seja mais conservadora a nível de família.

Este estudo evidenciou a utilidade do DNA Barcode em complementar a identificação morfológica. O método conseguiu identificar um número maior de espécies do que o método tradicional, o que está em consonância com grande parte dos estudos anteriores. (Ko et al, 2013; Frantine-Silva et al, 2015; Ardura et al; 2016; Lutz et al, 2023;).

Esses resultados são particularmente significativos porque, embora o DNA Barcode tenha sido amplamente utilizado a nível global para identificar espécies de peixes, este estudo representa a primeira aplicação desse método para larvas de peixes marinhos na plataforma continental amazônica.

Segundo Xing et al. (2022), a eficácia da identificação de espécies de peixes por meio do DNA Barcode depende, em parte, da existência de uma divergência inter e interespecífica suficiente. No contexto deste estudo, a falta de variação na divergência intraespecífica foi observada devido à utilização de apenas um espécime para cada espécie.

Por outro lado, a média da distância interespecífica foi de 31.29%, apresentando um aumento progressivo conforme o nível taxonômico, também observado em estudos anteriores (Muhala et al., 2024; Lutz et al., 2023; Xing et al., 2022)

As sequências identificadas a nível de gênero e família formaram clados com espécies que compartilham semelhanças fenotípicas. Entretanto, o método de Neighbor-Joining (NJ) revelou que alguns grupos, como os Labridae, não se agruparam. Isso sugere que o marcador utilizado pode não ser tão eficiente para certos grupos específicos de peixes., como já observado (Burrows et al, 2018; Mahala et al, 2024).

7.3 Incongruência dos bancos de dados

Quando as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis nos bancos de dados públicos (BOLD e NCBI), foi observada uma ambiguidade em relação a uma

sequência específica. No BOLD, esta foi identificada como *Diaphus jenseni*, enquanto no NCBI foi catalogada como *Diaphus perspicillatus*, ambas exibindo uma similaridade de mais de 99%.

Contudo, é importante citar que *D. jenseni* é uma espécie documentada nos oceanos Índico e Pacífico, não tendo sido registrado nenhum espécime no Atlântico (Borsa et al., 2022). A mencionada sequência foi recuperada como *D. perspicillatus* no BOLD (acesso restrito).

Este fenômeno foi destacado por Lutz et al. (2023) ao examinarem grupos de espécies pertencentes às famílias Mugilidae e Sciaenidae. O autor enfatiza a necessidade de os pesquisadores agirem com cautela ao validar a identificação das espécies, recomendando a consulta a literatura atualizada e a busca de assistência de especialistas em taxonomia dos organismos em questão.

Além disso, é crucial que as sequências públicas sejam submetidas a revisões contínuas para resolver casos ambíguos, reduzir erros e aumentar a confiabilidade dos dados (Durand et al., 2017)

Um dos desafios do DNA Barcode é a incompletude da base de dados de COI, particularmente para famílias de peixes de pouca relevância comercial e de difícil identificação (Ko et al., 2013). Dois espécimes foram classificados apenas ao nível de família: Balistidae e Nesttatomatidae (similaridade < 92%), enquanto 17 espécimes foram identificados apenas ao nível de gênero (similaridade < 99%).

Foi observado no presente estudo que as famílias como Gobiidae, Serranidae, Scaridae, Ophichthidae, entre outras, frequentemente são reconhecidas em níveis taxonômicos menores através do DNA Barcode, devido à escassez de sequências disponíveis nos bancos de dados para esses grupos.

Os estudos de Xing et al. (2022) identificaram esse obstáculo para as larvas de peixes no Havaí; Ardura et al. (2016) para as larvas de peixes no Oceano Atlântico Oriental; e Leis et al. (2015) para as larvas de peixes no Indo-Pacífico.

7.3 Biodiversidade

A diversidade de peixes na plataforma continental amazônica ainda carece de estudos aprofundados, especialmente no que diz respeito à diversidade de larvas de peixes. A região Norte ainda enfrenta uma escassez de pesquisas nesse campo, e todos os estudos realizados até o momento se basearam exclusivamente em métodos morfológicos (Zarcadi et al., 2008; Ferreira et al., 2014; Zarcadi et al., 2015; Bonecker e Castro, 2018).

O DNA Barcode demonstrou eficiência ao revelar a presença da larva de uma espécie invasora de peixe na plataforma continental amazônica. Esse resultado sugere que a espécie está estabelecida na região. Estudos anteriores realizados no Brasil por Ferreira

et al., (2015); Luiz et al., (2021) e Cintra et al (2022) alertam para os riscos ambientais e à saúde humana decorrentes da presença do peixe-leão nas águas brasileiras.

Dos estudos realizados na costa norte sobre a diversidade de larvas de peixes, destaca-se a região como um local crucial de desova, atribuído à sua alta produtividade primária e à diversidade físico-química do ambiente (Zarcadi et al, 2015).

No presente estudo, as larvas se concentraram principalmente nas estações costeiras (Figura 7), corroborando com observações de estudos anteriores (Zarcadi et al., 2008; Ferreira et al, 2014; Bonecker e Castro, 2018) de que a plataforma continental é a área mais rica em ictioplâncton no sentido quantitativo e qualitativo.

Os ambientes costeiros são propícios para os estágios iniciais do ciclo de vida dos peixes, sendo frequentados por espécies com hábitos de desova distintos ou ecologicamente diversos (Doyle et al., 1993).

A espécie *Parexocoetus hillianus* destacou-se como a mais abundante. O DNA Barcode demonstrou ser eficaz na identificação da espécie, uma vez que pelo método morfológico ela foi inicialmente classificada como pertencente à família Mugilidae.

A espécie pertence à família Exocoetidae, comumente conhecida como família dos peixes voadores e habitat oceânico (Hunte et al., 1995), o presente estudo registrou larvas presentes em estações costeiras. O estudo de Castro et al. (2008) relatam a presença de espécies da família Exocoetidae, como *Hirundichthys affinis* e *Cheilopogon sp.*, em estuários tropicais do Nordeste.

Apesar de ser comum encontrar esta família na plataforma amazônica, há uma carência significativa de estudos sobre os hábitos reprodutivos de espécies dessa família (Castro et al., 2008).

Embora a maioria dos táxons de larvas de peixes coletados na área de estudo seja comum em amostras de ictioplâncton e tenha sido registrada em outros estudos ao longo da costa brasileira (Zacardi et al., 2008; Bonecker e Castro, 2018), o DNA Barcode identificou o táxon *Scombrobrax heterolepis*, pertencente à família monotípica Scombrobracidae. Registros dessa família em assembleias de larvas de peixes no Brasil são raros (Dias et al., 2021).

Isso demonstra a importância do DNA Barcode ao revelar a diversidade oculta da região e auxiliar na identificação de táxons que são difíceis de identificar apenas pela morfologia (Lutz et al., 2023).

8 CONCLUSÃO

O método morfológico identificou 10 ordens; 30 famílias; 29 gêneros e 17 espécies, enquanto o DNA Barcode identificou 8 ordens; 31 famílias; 16 gêneros e 34 espécies. Observou-se que o método morfológico foi mais preciso na identificação a nível de família. Por outro lado, o DNA Barcode se mostrou eficiente ao revelar os erros cometidos no método morfológico e ao identificar um maior número de táxons a nível de espécie.

Os resultados deste estudo apresentam evidências robustas de que a integração do método morfológico com o DNA Barcode pode ser uma ferramenta altamente eficaz na identificação precisa das larvas de peixes da plataforma continental amazônica. Esta abordagem tem o potencial de enriquecer nosso entendimento da biodiversidade local, oferecendo benefícios significativos tanto para a comunidade científica quanto para as práticas de gestão pesqueira. Essa combinação pode ser fundamental para avaliar a sustentabilidade e promover uma gestão mais eficaz dos recursos pesqueiros na região.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. S., FRANTINE-SILVA, W., LIMA, S. C., GARCIA, D. A., & ORSI, M. L. DNA barcoding as a useful tool for identifying non-native species of freshwater ichthyoplankton in the neotropics. **Hydrobiologia**, 817, 111-119. 2018
- ANIBALDI, A., BENASSI FRANCIOSI, C., MASSARI, F., TINTI, F., PICCINETTI, C., & RICCIONI, G. Morphology and species composition of southern Adriatic Sea leptocephali evaluated using DNA barcoding. **PloS one**, 11(11), e0166137. 2016
- ARDURA, A; MAROTE, E; KOCZHIUS, E; VAZQUEZ-GRACIA, E. Diversity of planktonic fish larvae along a latitudinal gradient in the Eastern Atlantic Ocean estimated through DNA barcodes. **PeerJ**, v. 4, p. e2438, 2016.
- AYALA, D., RIEMANN, L., & MUNK, P. Species composition and diversity of fish larvae in the Subtropical Convergence Zone of the Sargasso Sea from morphology and DNA barcoding. **Fisheries Oceanography**, 25(1), 85-104.2016
- AZMIR, I. A., ESA, Y., AMIN, S. M. N., Md Yasin, I. S., & Md Yusof, F. Z. Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia using morphology and DNA barcoding methods. **Journal of Applied Ichthyology**, 33(5), 998-1006. 2017
- BALDWIN, C. C., & JOHNSON, G. D. Connectivity across the Caribbean Sea: DNA barcoding and morphology unite an enigmatic fish larva from the Florida Straits with a new species of sea bass from deep reefs off Curaçao. **PloS one**, 9(5), e97661. 2014
- BALDWIN, C. C., BRITO, B. J., SMITH, D. G., WEIGT, L. A., & ESCOBAR- BRIONES, E. Identification of early life-history stages of Caribbean Apogon (Perciformes: Apogonidae) through DNA Barcoding. **Zootaxa**. 2011
- BITTENCOURT, S. C. S. **Composição, distribuição e abundância da ZEE norte coletado na região da Costa do Amapá e Plataforma do Amazonas**. Dissertação. Universidade Federal do Pará. Belém, 2004.
- BONECKER, T. C. A.; NAMIKI, P.A.C; CASTRO, S.M; CAMPOS, N.P. Catálogo dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes da baía de Campos. **SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia**, 2014.
- BONECKER, T. C. A e CASTRO, S.M. Larval fish assemblages in the Foz do Amazonas Basin. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v 13, n2, p. 114- 120. 2018
- BRANICKI, W., KUPIEC, T., & PAWLOWSKI, R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. **Journal of Forensic Sciences**, 48(1), 1-5. 2003
- BURGHART, S. E., VAN WOUDEMBERG, L., DANIELS, C. A., MEYERS, S. D., PEEBLES, E. B., & BREITBART, M. Disparity between planktonic fish egg and larval communities as indicated by DNA barcoding. **Marine Ecology Progress Series**, 503, 195-204. 2014
- BURROWS, M., BROWNING, J. S., BREITBART, M., MURAWSKI, S. A., & PEEBLES, E. B. DNA barcoding reveals clear delineation between spawning sites for neritic versus oceanic fishes in the Gulf of Mexico. **Fisheries Oceanography**, 28(2), 228-239. 2019
- CAMACHO-GASTÉLUM, R., DÍAZ-VILORIA, N., SÁNCHEZ-VELASCO, L., JIMÉNEZ-ROSENBERG, S. P., & PEREZ-ENRIQUEZ, R. Molecular identification and morphological description of *Micropogonias megalops*, *Cynoscion othonopterus*, *C. reticulatus* and *Menticirrhus nasus* larvae, collected in the upper Gulf of California during Summer 2012. **Mitochondrial DNA Part A**, 28(3), 416-423. 2017
- CAMPOS, P. N. **Composição e distribuição de ovos e larvas de peixes na plataforma continental amazônica (REVIZEE - ZEE/NORTE)**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém. 2005.
- CAMPOS, P. N. **Ictioplâncton da Plataforma Continental do Estado do Amapá (Brasil). Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas)** – Universidade Federal do Pará, 45 f, 2002.
- CASTILLO, G., MUÑOZ, H., GONZÁLEZ, H., & BERNAL, P. Daily analysis of abundance and size variability of fish larvae in relation to oceanic water intrusions in coastal areas. **Biología pesquera**, (20), 21-35. 1991
- CASTRO, M. F., DO NASCIMENTO MEDEIROS, T., DE FRANÇA, E. J., & SEVERI, W. Occurrence of early life stages of *Hirundichthys affinis* (Günther, 1866) and *Cheilopogon* sp.(Beloniformes, Exocoetidae) in a tropical estuary, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoociências**, 10(2). 2008
- CHEN, I., SHAO, K. T., HSU, S. L., GONG, G. C., CHEN, Y. C., & LIU, T. K. Dna barcoding of coastal larval fish communities of dongshar island, south china sea revealed by mitochondrial co i s */*equences. **Journal of Marine Science and Technology**, 21(7), 34. 2013
- CHU, C., LOH, K. H., NG, C. C., OOI, A. L., KONISHI, Y., HUANG, S. P., & CHONG, V. C. Using DNA

- barcodes to aid the identification of larval fishes in tropical estuarine waters (Malacca Straits, Malaysia). **Zoological studies**, 58. 2019
- CINTRA, I. H. A., ALVES-JÚNIOR, A., de ARAÚJO SILVA, K. C., CAVALLEIRO, A. G., & BARBOSA, J. M. NOVAS OCORRÊNCIAS DE PEIXE-LEÃO *Pterois volitans* (LINNAEUS, 1758) NA PESCA DO PARGO *Lutjanus purpureus* (POEY, 1866) NA COSTA NORTE DO BRASIL New occurrences of lionfish *Pterois volitans*. **Acta pesca**. 2023
- COLLET, A., DURAND, J. D., DESMARAIS, E., CERQUEIRA, F., CANTINELLI, T., VALADE, P., & PONTON, D. DNA barcoding post-larvae can improve the knowledge about fish biodiversity: an example from La Reunion, SW Indian Ocean. **Mitochondrial DNA Part A**, 29(6), 905-918. 2018
- CORREIA, S., OLNEY, J., FARIA, A., MEDINA, A., & RAMOS, V. **Programa de investigação sobre o ictioplancton em Cabo Verde**. 2012
- COSTA, D. S. N. **Diversidade e zonação do Ictioplâncton em um perfil da Plataforma Maranhense. 2017. 50 f. Dissertação** (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017
- DIAS, C. D. O., BONECKER, A. C. T., DE CASTRO, M. S., DE CARVALHO, P. F., PARANHOS, R., & BONECKER, S. L. C. Holoplankton and meroplankton of three western Atlantic sedimentary basins. **Marine Biology Research**, 16(10), 695-713. 2020
- DÍAZ-VILORIA, N.; VELASCO, S. L.; LAVÍN, F. M.; ENRIQUEZ, P. R.; ROSENBERG, J. P. S.; GODINEZ, M. V. Genetic corroboration of *Engraulis mordax* larvae in the upper Gulf of California, a previously undescribed spawning habitat. **Ichthyological Research**, v. 62, n. 2, p. 230-235, 2014.
doi: 10.1098/rspb.2002.2218. 2003
- DÓRIA, R. A. A. **Caracterização dos ovos e larvas de peixes na foz do rio Pará: plataforma continental norte do Brasil**. Dissertação. UFRA/Campus Belém, 2019.
- DOYLE, M.J.; MORSE, W.W.; KENDALL JR., A.W. A comparison of larval fish assemblages in the temperate zone of northeast Pacific and the northwest Atlantic Ocean. **Bull. Mar. Sci., Miami**, v.53, p.588-644, 1993.
- DULČIĆ, J., PLEIĆ, I. L., ZORICA, B., BUŠELIĆ, I., ŠESTANOVIĆ, M., & KOVAČIĆ, M. Fish larvae DNA barcoding indicated the potential appearance of rare species: *Buenia massutii* Kovačić, *Ordines*, and *Schliwen*, 2017 in the Adriatic Sea. **Acta Adriatica**, 63(1), 45-52. 2017
- FRANTINE-SILVA, W; SOFIA, H. S; ORSI, L. M; ALMEIDA, F. S. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 5, p. 1226-1237, 2015
- FILIZOLA, N.; SILVA, A.V.; SANTOS, A.M.C; OLIVEIRA, M.A. Cheias e secas na Amazônia: breve abordagem de um contraste na maior bacia hidrográfica do mundo. **T&C Amazônia**, Manaus, vol. 9, p. 42-40, 2006.
- GARCÍA-DÁVILA, C., CASTRO-RUIZ, D., RENNO, J. F., CHOTA- MACUYAMA, W., CARVAJAL-VALLEJOS, F. M., SANCHEZ, H. & DUPONCHELLE, F. Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of *Pimelodid* catfishes from the Marañon, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. **Journal of Applied Ichthyology**, 31, 40-51. 2015
- GREGORY, T. R. DNA barcoding does not compete with taxonomy. **Nature** n 434, v 1. 2005
- HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp** 41: 95–98, 1999.
- HARADA, Alice; LINDGREN, A. E; HERMSMEIER, C. M; ROGOWSKI, A. P; TERRILL, E; BURTON, S. R. Monitoring spawning activity in a southern California marine protected area using molecular identification of fish eggs. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134647, 2015.
- HEBERT PD, CYWINSKA A, BALL SL, DEWAARD JR. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci**. 2003
- HOU, G., CHEN, Y., WANG, S., WANG, J., CHEN, W., & ZHANG, H. Formalin-fixed fish larvae could be effectively identified by DNA barcodes: A case study on thousands of specimens in South China Sea. **Frontiers in Marine Science**, 8, 634575. 2021
- HOU, G., WANG, J., CHEN, Z., ZHOU, J., HUANG, W., & ZHANG, H. Molecular and morphological identification and seasonal distribution of eggs of four Decapterus fish species in the northern South China Sea: a key to conservation of spawning ground. **Frontiers in Marine Science**, 7, 590564. 2020
- HUANG, D., CHEN, J., XU, L., WANG, X., NING, J., LI, Y., & Du, F. Larval Fish Assemblages and Distribution Patterns in the Zhongsha Atoll (Macclesfield Bank, South China Sea). **Frontiers in Marine Science**, 8, 787765. 2022

- HUBERT, N; ESPIAU, B; MEYER, C; PLANES, S. Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 57-67, 2014.
- ISARI, S., PEARMAN, J. K., CASAS, L., MICHELL, C. T., CURDIA, J., BERUMEN, M. L., & IRIGOIEN, X. Exploring the larval fish community of the central red Sea with an integrated morphological and molecular approach. **Plos one**, v 12, n 8, 2017.
- J. K., SHIROZA, A., & ALEMANY, F. Evidence of density-dependent cannibalism in the diet of wild Atlantic bluefin tuna larvae (*Thunnus thynnus*) of the Balearic Sea (NW-Mediterranean). **Fisheries Research**, 212, 63-71. 2019
- JIANG, R., MCHURA, M., LIANG, Z., YIN, R., ZHOU, Y., & CHEN, Y. Identification of ichthyoplankton in the East China Sea off the Coast of Zhoushan Archipelago using an integrated strategy of morphology and DNA barcoding. **Authorea Preprints**. 2023
- JOHN, B., SHEIKH, H. I., JALAL, K. C. A., KAMARUZZAMAN, B. Y., SANOWER, H., NUR HANISAH, M., & ROZIHAN, M. DNA Barcoding of Ichthyoplankton and Juvenile Fishes of a Tropical River in Malaysia. **DNA Barcoding and Molecular Phylogeny**, 237-251. 2020
- JULIO, M. M., BONECKER, A. C. T., de OLIVEIRA DIAS, C., SILVA, R., & BONECKER, S.L. C. Engraulidae (Teleostei, Clupeiformes) in tropical estuarine ecosystems: identification of fish larvae based on morphological analysis and molecular evidence. **Marine Biodiversity**, 52(3), 29. 2022
- KERR, M., BROWNING, J., BØNNELYCKE, E. M., ZHANG, Y., HU, C., ARMENTEROS, M., & BREITBART, M. DNA barcoding of fish eggs collected off northwestern Cuba and across the Florida Straits demonstrates egg transport by mesoscale eddies. **Fisheries Oceanography**, 29(4), 340-348. 2020
- KO, H. L; WANG, T. Y; CHIU, S. T; LEE, A. M; LEU, Y. M; CHANG, Z. K; CHEN, Y. W; SHAO, T. K. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53451, 2013.
- LEWIS, L. A; RICHARDSON, E. D; ZAKHAROV, V. E; HANNER, R. **Integrating DNA barcoding of fish eggs into ichthyoplankton monitoring programs**. 2016.
- LEYVA-CRUZ, E., VÁSQUEZ-YEOMANS, L., CARRILLO, L., & VALDEZ- MORENO, M. Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes. **Genome**, 59(12), 1117-1129. 2016
- LIMA, M. C. C. D., LIMA, S. C., SAVADA, C. S., SUZUKI, K. M., ORSI, M. L., & ALMEIDA, F. S. D. Use of DNA barcode in the identification of fish eggs in tributaries of the Paranapanema River basin. **Genetics and Molecular Biology**, 43, e20190352. 2020
- LUTZ, Í., MARTINS, T., ARAÚJO, F., FERREIRA, C., SANTANA, P., MIRANDA, J. & Gomes, G. E. Molecular characterization of juvenile fish from the Amazon estuary using DNA barcoding approach. **Plos one**, 18(9), e0292232. 2023
- MANGAS, A. P. **Distribuição e biodiversidade do ictioplâncton em um transecto na Plataforma Continental Amazônica**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 47 f, 2014.
- MARCENIUK, A.P., R.A. CAIRES, W.B. WOSIACKI & F. DARIO. Conhecimento e conservação dos peixes marinhos e estuarinos (Chondrichthyes e Teleostei) da costa norte do Brasil. **Biota Neotrop**. 13:4-12. 2013
- MATARESE, A. C., SPIES, I. B., BUSBY, M. S., & ORR, J. W. Early larvae of *Zesticelus profundorum* (family Cottidae) identified using DNA barcoding. **Ichthyological research**, 58, 170-174. 2011
- MATEOS-RIVERA, A. MAURITZEN, S. R; DAHLE, G; SUNDBY, S; MOZFAR, B; THORSEN, A; WEHDE, H; KRAFFT, A. B. Comparison of visual and molecular taxonomic methods to identify ichthyoplankton in the North Sea. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 18, n. 10, p. 599-605, 2020.
- MCKENZIE, J. L., & ALVARADO BREMER, J. R. Genetic identification of istiophorid larvae from the Gulf of Mexico based on the analysis of mitochondrial DNA control region sequences. **Journal of Fish Biology**, 90(3), 1070-1079. 2017
- MELO, N. F. A. C.; NEUMANN-LEITÃO, S. **Biodiversidade e Biomassa do Macrozooplâncton, com ênfase nos Copepoda (Crustacea), na Plataforma Continental Norte Brasileira**. Tese (Doutorado). 2004
- MORALES, B. F. **Uso do DNA barcoding na identificação e monitoramento da ictiofauna e do ictioplâncton em lagos de proteção, manejo e exploração na região do baixo rio Purus**. (Dissertação), 2023
- MORALES-PULIDO, J. M., GALINDO-SÁNCHEZ, C. E., JIMÉNEZ-ROSENBERG, S. P. A., ARTEAGA, M. C., BATTA-LONA, P. G., & HERZKA, S. Z. Identification of *Bothus ocellatus* and *Bothus robinsi* larvae using morphological and molecular approaches leads to a distribution record for the Gulf of Mexico. **Environmental Biology of Fishes**, 106(1), 43-59. 2023
- MORITZ, C., & CICERO, C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **PLoS Biol**, 2(10), e354. 2004

- MUHALA, V., GUIMARÃES-COSTA, A., MACATE, I. E., RABELO, L. P., BESSA-SILVA, A. R., WATANABE, L., & SAMPAIO, I. DNA barcoding for the assessment of marine and coastal fish diversity from the Coast of Mozambique. **Plos one**, 19(2), e0293345. 2024
- NAKATANI, M. Conceptual and physical clarification of rate and state friction: Frictional sliding as a thermally activated rheology. **Journal of Geophysical Research: Solid Earth**, 106(B7), 13347-13380. 2001
- NURYANTO, A., PRAMONO, H., & SASTRANEGARA, M. H. Molecular identification of fish larvae from east plawangan of Segara Anakan, Cilacap, Central Java, Indonesia. Biosaintifika: **Journal of Biology & Biology Education**, 9(1), 33-40. 2017
- OVERDYK, L. M., HOLM, E., CRAWFORD, S. S., & HANNER, R. H. Increased taxonomic resolution of Laurentian Great Lakes ichthyoplankton through DNA barcoding: A case study comparison against visual identification of larval fishes from Stokes Bay, Lake Huron. **Journal of Great Lakes Research**, 42(4), 812-818. 2016
- OXENFORD, H. A., MANON, R., & HUNTE, W. Distribution and relative abundance of flyingfish (Exocoetidae) in the eastern Caribbean. I. Adults. **Marine Ecology Progress Series**, 11-23. 1995
- PAINE, M. A.; MCDOWELL, J. R.; GRAVES, J. E. Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. **Ichthyological Research**, v. 55, p. 7-16, 2008.
- PAPPALARDO, A. M.; CUTTATA, A.; SARDELA, M.; MUSCO, T.; MAGGIO, B.; PATTI, S.; MAZZOLA, V. F. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae. **Hydrobiologia**, v. 749, n. 1, p. 155-167, 2015.
- PAULA, J. D., DE CARVALHO NOGUEIRA, L., PIMENTEL, Z. M. N., & BENTES, B. Dieta da Gurijuba-Sciades parkeri-Desembarcada pelas pescarias artesanais de larga escala da costa norte do Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v 20, n (1), p. 1-9. 2016
- PEGG, G.G; SINCLAIR, B; BRISKEY, L. & ASPDEN, W.J. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef. **Scientia Marina**, v 70: p. 7- 12, 2006.
- PUNCHER, G. N., ARRIZABALAGA, H., ALEMANY, F., CARIANI, A., ORAY, I. K., KARAKULAK, F. S., & TINTI, F. Molecular identification of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*, Scombridae) larvae and development of a DNA character-based identification key for Mediterranean Scombrids. **PLoS One**, 10(7), e0130407. 2015
- RATHNASURIYA, M. I. G., MATEOS-RIVERA, A., SKERN-MAURITZEN, R., WIMALASIRI, H. B. U., JAYASINGHE, R. P. P. K., KRAKSTAD, J. O., & DALPADADO, P. Composition and diversity of larval fish in the Indian Ocean using morphological and molecular methods. **Marine biodiversity**, v. 51, p. 1-15, 2021
- RÉ, P. M. A. B. **Ictioplâncton estuarino da Península Ibérica: guia de identificação dos ovos e estados larvares planctônicos** (p. 163). Cascais: Camara municipal de Cascais. 1999
- RICHARDS, W. J. (Ed.) **Early stages of Atlantic fishes: an identification guide for western central North Atlantic**. Vol. I & II. Boca Raton: CRC Press: p. 2640. 2006
- RODRIGUES, T. HILSDORF, S. W. A; PIMENTA, G. E; AMORIM, F. A. Ocurrence and identification of Istiophoridae larvae and Xiphiidae eggs off the southeastern Brazilian Coast. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 78- 86, 2017.
- SAVOLAINEN, V., COWAN, R. S., VOGLER, A. P., RODERICK, G. K., & LANE, R. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811. 2005
- SOUZA FILHO, P.W.M. Costa de manguezais e macromarés da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geofísica**, vol. 23, n. 4, p. 427-435, 2005.
- SILVA, M. L. S. **Influência dos rios Amazonas e Pará sob a biomassa fitoplanctônica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 71 p. 2015.
- SILVEIRA, P. C. A. **Ictionêuston da Zona Econômica Exclusiva referente ao Estado do Maranhão (Região Norte do Brasil)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2002
- THIRUMARAISELVI, R., SOURIN, D. A. S., RAMANADEVU, V., & THANGARAJ, M. MtDNA barcode identification of finfish larvae from Vellar estuary, Tamilnadu, India. **Notulae Scientia Biologicae**, 7(1), 16-19. 2015
- URIARTE, A., JOHNSTONE, C., LAIZ-CARRIÓN, R., GARCÍA, A., LLOPIZ, using morphological and molecular methods. **Marine Biodiversity**, 51, 1-15. 2021
- VALDEZ-MORENO, M; YEOMANSUMA-VÁSQUEZ, L; GUTIÉRREZ, E. M; IVANOVA, I. N; HEBERT, D. N. P. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan

Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. **Marine and Freshwater Research**, v. 61, n. 6, p. 655-671, 2010.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WIBOWO, A., PANGGABEAN, A. S., ZAMRONI, A., PRIATNA, A., & YUSUF, H. N. Using DNA barcode to improve the identification of marine fish larvae, case study coastal water near Jakarta and Banda Sea, Indonesia. **Indonesian fisheries research journal**, 24(1), 23-30. 2018

XING, B; CHUNGUANG, W; QIONG, W; YANGUO, W; XIAOYIN, C; ROUXIN, S; ZHILAN, Z; PENG, X. Species identification of larval fish in Hawaiian waters using DNA barcoding. **Frontiers Marine Science**. v.9, pag. 1-8. 2022

XU, H., LIU, B., & CAO, Y. Assemblage Distribution of the Larval and Juvenile Myctophid Fish in the Kuroshio Extension Region: Winter 2020. **Journal of Marine Science and Engineering**, 11(5), 898. 2023

ZACARDI, D. M. Variação e abundância de icteoplâncton em canais de maré no Extremo Norte do Brasil. **Biota Amazônia**, ISSN 2179-5746, v. 5, n. 1, pág. 43. 2015

ZACARDI, D. M; BITTENCOURT, S. C. S; RAWIETSCH, K. L; NAKAYAMA, L. Ictioplâncton marinho da plataforma continental e águas adjacentes à foz do Rio Amazonas (OPERAÇÃO NORTE III–REVIZEE SCORE NORTE). **Boletim Técnico Científico do CEPNOR**, v. 8, n. 1, p. 9-20, 2008