



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

LUARA HANNA OLIVEIRA FALCÃO

**SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO DE VERTEBRADOS MARINHOS:
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MONITORAMENTO DO COMÉRCIO *ONLINE***

FORTALEZA
2017

LUARA HANNA OLIVEIRA FALCÃO

**SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO DE VERTEBRADOS MARINHOS:
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MONITORAMENTO DO COMÉRCIO *ONLINE***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Conservação

**Orientador: Prof. Dr. Vicente Vieira Faria
Co-orientadores: Dr. João Eduardo Pereira de Freitas e Dr. Matthew McDavitt**

**FORTALEZA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

F164s Falcão, Luara Hanna Oliveira.

Subsídios para a conservação de vertebrados marinhos: identificação molecular e monitoramento do comércio *online* / Luara Hanna Oliveira Falcão. – 2017.
81f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2017.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Prof^o. Dr^o. Vicente Vieira Faria.

Co-Orientação: Dr^o. João Eduardo Pereira de Freitas.

Co-Orientação: Dr^o. Matthew McDavitt.

1. Cetáceos. 2. Espécies ameaçadas. 3. Pargo. 4. Peixe-Serra. 5. Comercio - Peixes. I. Título.

CDD 599.5

LUARA HANNA OLIVEIRA FALCÃO

SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO DE VERTEBRADOS MARINHOS:
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MONITORAMENTO DO COMÉRCIO *ONLINE*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Conservação

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Vicente Vieira Faria (orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Carolina Oliveira de Meirelles
Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (Aquasis)

A Deus.

Aos meus pais, Tâmara e João.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vicente Faria, pela excelente orientação, incentivo e ensino durante os últimos seis anos. Me mostrando o incrível mundo da genética e conservação de animais marinhos.

Ao meu co-orientador Dr. Eduardo Freitas, pelo ensino na realização análises moleculares em programas de bioinformática e pela excelentes sugestões.

Ao Prof. Dr. Manuel Furtado Neto, pelo dados cedidos de sua tese de doutorado e pela colaboração para as pesquisas com cetáceos e peixes ósseos.

Ao meu co-orientador Dr. Matthew McDavitt, pelos dados fornecidos e colaborações na pesquisa com peixe-serra.

A minha Banca Examinadora de qualificação, Prof. Dr. Rodrigo Maggioni e Prof. Dr. Itayguara Ribeiro da Costa, pelas valiosas sugestões e correções.

A colega graduanda Andréia Campos, pela colaboração e co-autoria na pesquisa com cetáceos.

Aos meus colegas do Laboratório de Evolução e Conservação de Vertebrados Marinhos (Evolve) pela parceria, sugestões e momentos de convivência.

Esta pesquisa teve apoio financeiro, na forma de 22 meses de bolsa de mestrado da FUNCAP.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”
(Bíblia sagrada: Josué 1:9)

RESUMO

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN), existem atualmente um total de 12.221 espécies em situação de ameaça e outras 11.029 espécies consideradas vulneráveis, globalmente. Algumas dessas espécies possuem alto valor comercial. Produtos como carne de baleia, marfim do elefante, chifre do rinoceronte, rostro de peixe-serra e barbatanas de tubarão são exemplos de produtos comercializados de forma ilegal. O fato desse comércio ser voltado para partes de animais (barbatanas, carne, filés congelados, etc) dificulta a fiscalização dessa atividade. Isto porque espécimes nestas condições estão desprovidos de suas principais características morfológicas, o que frequentemente impede uma identificação. No caso dos filés congelados de peixes com elevado interesse comercial (Ex. pargo), a falta de caracteres morfológicos no produto final permite a ocorrência de fraude de substituição, onde uma espécie menos valorizada (mais barata) é comercializada com o nome de outra espécie de maior valor. E este comércio se dá não apenas de forma presencial ou física, mas também através de comércio virtual - em lojas e sites *online*. Dada as situações de ameaça, pesquisas que visem a produção de ferramentas que auxiliam a identificação de partes animais e monitoramento de comércio são necessárias. Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi fornecer subsídios para o combate contra o comércio ilegal de animais marinhos ameaçados, com ênfase nos cetáceos, no pargo e nas raias conhecidas como peixes-serra. Este estudo contribui com sequências do gene Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) de sete espécies de cetáceos do Atlântico Oeste (Canadá e Brasil) que são úteis para identificação de espécies. Adicionalmente, marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP (Reação da Cadeia em Polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) também são descritos para identificar o pargo (*Lutjanus purpureus*) da costa norte do Brasil. Quanto ao peixe-serra, aqui está descrito o estado atual de um comércio *online* de rostros isolados. Baseado em aproximadamente um ano de monitoramento e 402 rostros isolados registrados, foi observado que rostros de peixe-serra envolvidos nesse tipo de comércio custam em média US\$ 676,80 a unidade. O *site* de comércio *online* eBay é responsável pela maior parte dos rostros de peixe-serra que estão ilegalmente disponíveis para entrega internacional.

Palavras-chave: espécies ameaçadas, comércio ilegal, conservação, cetáceos, pargo e peixe-serra.

ABSTRACT

According to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) there is currently 12,221 endangered species and another 11,029 vulnerable species, globally. Some of these species are highly valuable. Whale meat, elephant ivory, rhino horn, sawfish rostrum, and shark fin are examples of illegally traded items. The fact that these trades are based on animal parts makes difficult the monitoring of species involved. This is because animal parts lack most of diagnostic characters that may permit species identification. In the case of highly valuable frozen fish fillet, as for example the one from the Caribbean Snapper, this lack of diagnostic characters permits a substitution fraud. In this kind of fraud, a low valuable species is trade under the name of a highly valuable species. Moreover, this trade does not only occur in marketplaces or so. It also occurs through virtual or online trade. Given this threatening situation, the development of research on identification of animal parts and trade monitoring are needed. In this context, the goal of the present study was to provide new tools against illegal trade of endangered marine vertebrates, with emphasis on cetaceans, snappers and the batoids known as sawfish. The present study presents mitochondrial DNA Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) DNA sequences useful for identification of seven cetacean species from the West Atlantic (Canada and Brazil). In addition, prospective Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorphism (PCR-RFLP) molecular markers are also described for identification of the Caribbean Red Snapper (*Lutjanus purpureus*) from northern and northeastern Brazil. About the sawfish, here it is described the current status of an ongoing online trade of isolated rostra. Based on roughly one year of monitoring and 402 isolated rostra recorded, it was found that sawfish rostra involved in this kind of trade cost US\$ 676.80 a piece, in average. The trade website eBay is responsible for most of the sawfish rostra that is illegally available for international delivery.

Keywords: endangered species, illegal trade, conservation, cetacean, Red snapper, sawfish

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 - The E3-I5 region of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene used as a molecular marker for identification of cetacean species potentially involved in strandings and/or in the trade of isolated parts in the West Atlantic waters (black bar, with identification of the loci). This region is in contrast to the full COI (larger grey bar) and to the Folmer region, traditionally used in DNA barcoding studies (smaller grey bar). See Lunt et al. (1996) for more details of the E3-I5 region 24

Figura 2 - Map showing the six localities (black dots) from where the seven cetacean species (numbers 1 to 7) were sampled. Three species sampled from Newfoundland, Canada were: (1) *Balaenoptera musculus*, St. George's Bay; (2) *B. acutorostrata*, Portugal Cove-St. Philip's; and (3) *Phocoena phocoena*, Trinity Bay. The remaining four species sampled along the coast of Ceará State, northeastern Brazil were: (4) *Physeter macrocephalus*, Aquiraz; (5) *Peponocephala electra*, São Gonçalo do Amarante; (6) *Sotalia guianensis*, Fortaleza; and (7) *Tursiops truncatus*, Fortaleza 24

Figure 3 - Verification of the identity of GenBank's 'unverified' complete mitochondrial DNA sequences for *Sotalia guianensis* JF681039 and *Sotalia fluviatilis* JF681040. The Maximum Likelihood tree based on the partial cytochrome *b* sequences shows that these 'unverified' sequences have, in fact, correct identities. The respective GenBank accession No. for each sequence is provided. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)..... 27

Figure 4 - Clades of conspecific sequences for the seven studied cetacean species showing a match between present study (highlighted in purple) and GenBank sequences. Maximum likelihood tree based on an I3-E5 region of the mitochondrial COI gene. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)..... 30

CAPÍTULO II

Figura 5 - Árvore Neighbor-Joining para todas as espécies aqui estudadas 44

CAPÍTULO III

Figura 6 - Ocorência das cinco espécies de peixe-serra no mundo, (a) *Anoxypristis cuspidata*,
(b) *Pristis clavata*, (c) *Pristis pectinata*, (d) *Pristis zjisron*, (e) *Pristis pristis* do
Oceano Atlântico e Pacífico leste e (f) *Pristis pristis* do Oceano Índico e Pacífico
Oeste 53

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO III

Gráfico 1- Quantidade de rostros ofertados por país	57
Gráfico 2 - Tipos de entrega por país	58
Gráfico 3 - Quantidade de rostros com opção de entrega internacional por website	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percent identity values between sequences of the E3-I5region of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene obtained in the present study for cetaceans from Canada and Brazil (West Atlantic) and DNA sequence from its respective congener available in the online database GenBank. BLAST scores for each comparison have E-value = 0. Percent identity values were obtained after Blast and Maximum Likelihood (ML) analyses..... 29
- Tabela 2 - Espécies estudadas e seus respectivos códigos genbank 40
- Tabela 3 - Sítio de restrição (SR) e o tamanho da banda esperada (BE) em pares de base do corte enzimático (*in silico*) realizado pelas enzimas AfLIII e MLuI nas 11 espécies aqui estudadas 43
- Tabela 4 - Palavras-chave utilizadas na busca realizada no *Google Images* 56
- Tabela 5 - Lista de países envolvidos no comércio online e suas respectivas situações quanto ao processo de declaração da CITES 61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	Organização da dissertação	16
	REFERÊNCIAS	17
	CAPÍTULO I: Molecular Identification of Cetaceans From The West Atlantic Using the E3-I5 region of COI	20
2	INTRODUCTION	22
3	MATERIAL AND METHODS	24
3.1	Geographical locality, species, and gene region	24
3.2	Laboratory procedures	25
3.3	Molecular identification: BLAST	26
3.4	Preparation for percent identity analysis: Checking the identity of <i>Sotalia guianensis</i> complete mitochondrial sequences available in GenBank	26
3.5	Molecular identification: percent identity analysis of COI	28
28		
4	RESULTS	29
5	DISCUSSION	31
	REFERENCES	34
	CAPÍTULO II: marcadores moleculares para a autenticação de produtos de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>)	38
6	INTRODUÇÃO	38
7	MATERIAL E MÉTODOS	40
8	RESULTADOS	42
8.1	Digestão <i>in silico</i>	42
8.2	Árvore Filogenética <i>Neighbor-Joining</i>	44
9	DISCUSSÃO	46
	REFERÊNCIAS	49

	CAPÍTULO III: Comércio internacional <i>online</i> de rostro de peixe-serra	52
10	INTRODUÇÃO.....	52
11	MATERIAL E MÉTODOS	56
12	RESULTADOS	57
13	DISCUSSÃO	60
14	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS.....	64
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	ANEXO A	67
	ANEXO B	71
	ANEXO C	77
	ANEXO D	81

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, existem cerca de 12.991 espécies em situação de ameaça e 11.316 espécies vulneráveis, segundo IUCN (The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. acessado em 02 Fevereiro 2017). Algumas dessas espécies possuem alto valor comercial, tanto no tráfico de espécies vivas como nos produtos oriundos das mesmas. Produtos como carne de baleia (PHIPPS *et al.*, 2000), olho e genitália de golfinho (GRAVENA *et al.*, 2008; SHOLL *et al.*, 2008), marfim do elefante (SCHIFFMAN, 2017), chifre do rinoceronte (AYLING, 2013) rosto de peixe-serra (McDAVITT & CHARVET-ALMEIDA, 2004) e barbatanas de tubarão (CHUANG *et al.*, 2016) são alguns exemplos de produtos comercializados de forma ilegal. Além disso, ainda existem registros de fraude ou erros de rotulagem no comércio de filés congelados de peixes, onde o filé de peixe de menor valor comercial é vendido com o nome do peixe de maior valor (CARVALHO *et al.*, 2011; MILLER *et al.* 2011; CARVALHO *et al.*, 2015; WARNER, 2013; BRITO *et al.*, 2015; BÉNARD-CAPELLE *et al.*, 2015; NAGALAKSHMI *et al.*, 2016; MAPA, 2016).

Uma das espécies exportadas pelo Brasil como filé congelado e que possui relevante interesse comercial é a espécie *Lutjanus purpureus*, conhecida como pargo (SOUZA, 2000; SALES *et al.*, 2006). Alguns peixes desse gênero são muito semelhantes morfologicamente, e o erro de rotulagem ou fraude de substituição intencional são práticas comuns, com os principais registros de ocorrência no Estados Unidos (WARNER, 2013). As imagens das espécies aqui estudadas, que estão envolvidas nessas práticas, encontram-se no Anexo B do presente estudo.

A fiscalização do comércio de partes de animais possuem algumas limitações, como por exemplo a dificuldade de identificar a espécie. Isto porque a retirada de importantes características morfológicas (Ex. barbatanas e cabeça) para a obtenção do produto final fazem com que a identificação visual da espécie seja prejudicada. Há ainda a facilidade da compra e venda de partes de espécies ameaçadas através do comércio em lojas online, o que também dificulta a fiscalização. Sendo este comércio mais comum em produtos desidratados como barbatanas de tubarão, chifres, marfim de elefante e rosto de peixe-serra.

No caso dos rostos, o comércio internacional *online* acontece a mais de uma década (McDAVITT & CHARVET-ALMEIDA, 2004), mesmo com essa prática sendo proibida pela CITES (Convenção Internacional do Comércio de Espécies Ameaçadas da

Fauna e Flora). As imagens do rostro comercializado e das espécies de peixe-serra podem ser visualizadas no Anexo C do presente estudo.

Além do comércio de partes de animais, o encalhe de animais aquáticos é uma outra situação onde a identificação visual da espécie é prejudicada. Isto porque o avançado grau de decomposição das carcaças impedem uma identificação mais precisa da espécie encalhada (ALFONSI *et al.*, 2013). No caso dos cetáceos, que são animais com frequentes registros de encalhe, a identificação das espécies encalhadas é crucial para o monitoramento do encalhe e conservação das espécies (MEIRELLES *et al.*, 2009; MEIRELLES *et al.*, 2010; ALFONSI *et al.*, 2013). As imagens das espécies de cetáceos aqui estudadas podem ser visualizadas no Anexo A.

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de identificação de partes destes vertebrados marinhos, bem como de um monitoramento de seu comércio (legal ou ilegal). Dentro desse contexto, o presente estudo teve como principal objetivo fornecer subsídios (dados e ferramentas) para auxiliar na conservação de algumas espécies de vertebrados marinhos envolvidas em comércios ilegais ou encalhes, como cetáceos, peixe ósseos e cartilaginosos.

1.1 Organização da dissertação

A dissertação foi dividida em três capítulos. Cada capítulo fornece subsídios para auxiliar na conservação de espécies ameaçadas que estão (de alguma forma) envolvidas no comércio ilegal ou em situações de encalhe. Nos capítulos I e II, são fornecidas ferramentas moleculares (genéticas) capazes de identificar partes de cetáceos e peixes ósseos.

No capítulo III, foi descrita uma atividade de comércio *online* internacional (ilegal) de partes de cinco espécies de peixes cartilaginosos ameaçados. Estas partes eram comercializadas como produtos de luxo para decoração.

Por fim, como já mencionado, imagens de cada uma das espécies incluídas na dissertação estão disponíveis em anexo (Anexos A, B e C).

REFERÊNCIAS

- ALFONSI, E.; MÉHEUST, E.; FUCHS, S.; CARPENTIER, F-G.; QUILLIVIC, Y.; VIRICEL, A.; HASSANI, S.; JUNG, J-L. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. **ZooKeys**. 365: 5–24, 2013
- AYLING J. What Sustains Wildlife Crime? Rhino Horn Trading and the Resilience of Criminal Networks. **Journal of International Wildlife Law & Policy**. 16: 57-50, 2013.
- B'ENARD-CAPELLE, J.; GUILLONNEAU, V.; NOUVIAN, C.; FOURNIER, N.; LO'ET, K.L.; DETTAI, A. Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. **PeerJ**. 2:e714, 2015
- BRITO, M.A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Res. Int.** 70: 40–46, 2015.
- CARVALHO, D.C.; NETO, D.A.P.; BRASIL, B.S.A.F.; OLIVEIRA, D.A.A. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. **Mitochondrial DNA**. 22: 97–105, 2011.
- CARVALHO, D.C.; PALHARES, R.M.; DRUMMOND M.G.; FRIGO, T.B. DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. **Food Control**. 50: 784-788, 2015.
- CHUANG, P.S.; HUNG, T-C.; CHANG, H-A.; HUANG, C-K.; SHIAO, J-C. The Species and Origin of Shark Fins in Taiwan’s Fishing Ports, Markets, and Customs Detention: A DNA Barcoding Analysis. **PLoS ONE** 11(1): e0147290, 2016.
- GRAVENA, W.; HRBEK, T.; SILVA, V.M.F.; FARIAS, I.P. Amazon River dolphin love fetishes: From folklore to molecular forensics. **Marine Mammal Science**, 24(4): 969–978, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fiscais federais identificam fraude em pescados à venda em supermercados do país. Disponível em: <
<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/03/fiscais-federais-identificam-fraude-em-pescados-a-venda-em-supermercados-do-pais>> Acesso: 01 Agosto 2016.

McDAVITT, M.; CHARVET-ALMEIDA, P. Quantifying trade in sawfish rostra: two examples. **Shark News Newsletter of the IUCN Specialist Group**. 16:10-11, 2004.

MEIRELLES, A.C.O.; MONTEIRO-NETO, C.; MARTINS, A.M.A.; COSTA, A.F.; BARROS, H.M.D.R.; ALVES, A.M.D.O. Cetacean strandings on the coast of Ceará, north-eastern Brazil (1992–2005). **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 89: 1083 - 1090, 2009.

MEIRELLES, A.C.O.; RIBEIRO, A.C.; SILVA, C.P.N.; SOARES FILHO, A.A. Records of guiana dolphin, *Sotalia guianensis*, in the state of Ceará, northeastern Brazil. **LAJAM** 8: 97-102, 2010.

MILLER, D.; JESSEL, A.; MARIANI, S. Seafood mislabelling: comparisons of two western European case studies assist in defining influencing factors, mechanisms and motives. **Blackwell Publishing Ltd, FISH and FISHERIES**. 13: 345–358, 2011.

NAGALAKSHMI, K.; ANNAM, P-K.; VENKATESHWARLU, G.; PATHAKOTA, G-B.; LAKRA, W.S. Mislabeled in Indian seafood: An investigation using DNA barcoding. **Food Control**. 59: 196 - 200, 2016.

PHIPPS, M.; ISHIHARA, A.; KANDA, N.; SUZUKI, H. A preliminary report on DNA sequence analysis of whale meat and whale meat products collected in Japan. **TRAFFIC Bull.** 17: 91-94, 1998.

SALES, R.; FONTELES-FILHO, A.A.; FURTADO-NETO, M.A.A.; CARR, S.M.; FREITAS, S.M. Morphometric and mitochondrial DNA analyses of the caribbean red snapper, *Lutjanus purpureus* (Teleostei, Lutjanidae), in Western Atlantic off Brazil. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 32(2): 115-125, 2006.

SCHIFFMAN, R. Wildlife Warrior. **Scientific American**. 316: 64 - 67, 2017.

SHOLL, T. G. C.; NASCIMENTO, F.F.; LEONCINI, O.; BONVICINO, C.R.; SICILIANO,

S.. Taxonomic identification of dolphin love charms commercialized in the Amazonian region through the analysis of cytochrome b DNA. **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 88: 1207-1210, 2008.

SOUZA, R.C. Brazil, northern red snapper fishery. *In*: Regional Reviews and National Management Reports - Fourth Workshop on the Assessment and Management of Shrimp and Groundfish Fisheries on the Brazil-Guianas Shelf. FAO Fisheries Report No. 651. 2000.

WARNER, K.; TIMME, W.; LOWELL, B.; HIRSHFIELD, M. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. **Report OCEANA**. February, 2013. Disponível em: <http://usa.oceana.org/sites/default/files/reports/National_Seafood_Fraud_Testing_Results_FINAL.pdf>.

Capítulo I: Molecular identification of cetaceans from the West Atlantic using the E3-I5 region of COI

Running title: Molecular identification of cetaceans

L.H.O. Falcão¹, A.S. Campos², J.E.P Freitas¹, M.A.A. Furtado-Neto³ and V.V. Faria²

¹Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE, Brasil

²Departamento de Biologia, UFC, Fortaleza, CE, Brasil

³Departamento de Engenharia de Pesca, UFC, Fortaleza, CE, Brasil

Corresponding author: LUARA H. O. FALCÃO

Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR, Universidade Federal do Ceará - UFC. Av. da Abolição, 3207, Meireles, Fortaleza, CE, Brazil, CEP 60165-081

Tel.: 55-85-3366-9803

E-mail: luarafalcao@gmail.com

Genet. Mol. Res. 16 (2): gmr16029607

Received January 12, 2017

Accepted March 28, 2017

Published

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029607> (Anexo D)

ABSTRACT. Molecular identification is very useful in cases where morphology-based species identification is not possible. Examples for its application in cetaceans include the identification of carcasses of stranded animals in advanced state of decomposition and body parts that are illegally traded. One DNA region that is often used for molecular identification is the Folmer region of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) (locus 48 to 705 bp). This locus has been used for the identification of several animal species, including whales and dolphins. The goal of the present study was to evaluate the usefulness of another region of COI, the E3-I5 (locus 685 to locus 1179; 495 bp) as a marker for identification of cetaceans from northeastern Canada and northeastern Brazil. The identification markers were successfully obtained for seven cetacean species after performing percent identity and Basic Local Alignment Search Tool analyses. The obtained markers are now publicly available and are useful for the identification of the endangered blue whale (*Balaenoptera musculus*), common minke whale (*B. acutorostrata*), vulnerable sperm whale (*Physeter macrocephalus*), harbor porpoise (*Phocoena phocoena*), common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*), and melon-headed whale (*Peponocephala electra*).

Key words: Species identification; Endangered species; Molecular marker; Whale; Dolphin

2 INTRODUCTION

Cetaceans comprise at least 92 whale and dolphin species that are globally distributed in marine and riverine environments (Perrin, 2017). Whales and dolphins have been the subject of several studies, including those related to their behavior (Rendell and Whitehead, 2001; Visser et al., 2016), strandings (Meirelles et al., 2009; Meirelles et al., 2010; Truchon et al., 2013), geographical range (Pompa et al., 2011; Attard et al., 2016; Di Tullio et al., 2016), conservation (Pompa et al., 2011), bycatch (Lewison et al., 2004), and taxonomy (Monteiro-Filho et al., 2002). Cetaceans have also been studied using molecular markers for delimitation of species (Cunha et al., 2005) and population lineages (Torres-Florez et al., 2014), molecular phylogeny (Leduc et al., 1999), and molecular identification through the use of molecular markers (Phipps et al., 1998; Dizon et al., 2000; Sholl et al., 2008; Amon et al., 2013).

Molecular markers are, in some cases, the only way to identify a cetacean species. This is the case, for example, of stranded carcasses, which can be difficult to identify by their morphological characters, depending on how degraded it is. Similarly, they are useful in situations when isolated parts of cetaceans are illegally traded. In all these cases, molecular markers have the potential for aiding the successful identification of species. These markers include, for example, the mitochondrial cytochrome b (Phipps et al., 1998; Dizon et al., 2000; Gravena et al., 2008; Sholl et al., 2008; Tsai et al., 2013; Cypriano-Souza et al., 2016), and the control region [Dizon et al., 2000; Cypriano-Souza et al., 2016; however, see Dizon et al. (2000). for failure in identifying the species of *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus* complex using the control region].

Currently, the approach that is mostly used for molecular identification of animals is DNA barcoding. This method uses DNA sequences from the initial portion (the Folmer region; locus 48 to 705) of the cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene for species identification (Hebert et al., 2003). This method can be accessed through BOLD—Barcode of Life Data Systems (<http://www.boldsystems.org/>)—an online database that hosts COI sequences with certified species identification (Kochzius, 2009).

Despite the vast application of the DNA Barcode method for animal identification, focused on the Folmer region, this method is not universally efficient for cetaceans. This method has been efficient for identification of several cetacean species (Tsai et al., 2013; Chang et al., 2014; Cypriano-Souza et al., 2016). However, there have been cases in which the Folmer region was not useful for differentiating *Delphinus delphis*, *D. capensis*,

Stenella coeruleoalba, *S. frontalis*, and *Tursiops truncatus*, all of which are species in the family Delphinidae, more specifically in the subfamily Delphininae (Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013). Therefore, researchers frequently use more than one gene region for species identification (Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013; Cypriano-Souza et al., 2016).

Given the fact that, eventually, it is necessary to use other molecular markers in addition to the Folmer region for cetacean identification, a continuous search for markers from different gene regions and species is warranted. It is in this context that we, herewith, provide markers of another region of COI for identification of seven cetacean species potentially involved in strandings and/or in the trade of isolated parts in the West Atlantic waters.

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Geographical location, species, and gene region

Partial COI sequences (495 bp) from the E3-I5 region (locus 685 to 1179) were obtained for seven cetacean species (Figure 1). The specimens were sampled between 1986 and 1996 along the coasts of Newfoundland (northeastern Canada) and Ceará State (northeastern Brazil) (Figure 2). The Canadian samples were collected from animals that were stranded on the beaches at Newfoundland coast and stored in the freezers of the Whale Research Group (WRG) at the Memorial University of Newfoundland (MUN) in St. John's. The Brazilian samples were also collected from animals stranded on beaches from Ceará State. They were stored in freezers of the Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará-GECC, at the Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR from Universidade Federal do Ceará, in Fortaleza.

Figure 1. The E3-I5 region of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene used as a molecular marker for identification of cetacean species potentially involved in strandings and/or in the trade of isolated parts in the West Atlantic waters (black bar, with identification of the loci). This region is in contrast to the full COI (larger grey bar) and to the Folmer region, traditionally used in DNA barcoding studies (smaller grey bar). See Lunt et al. (1996) for more details of the E3-I5 region.

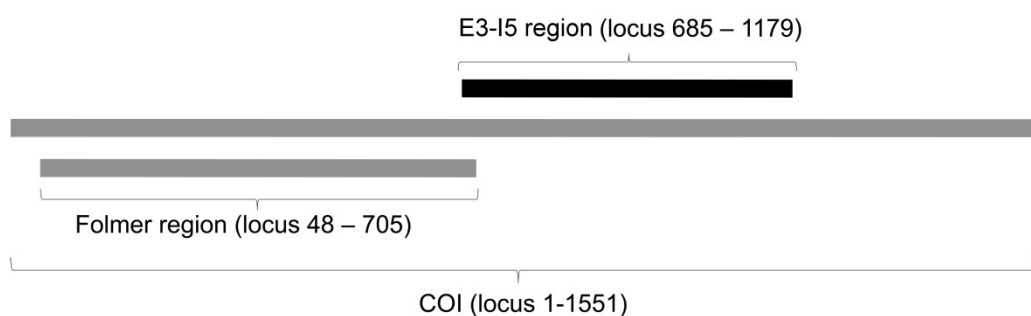
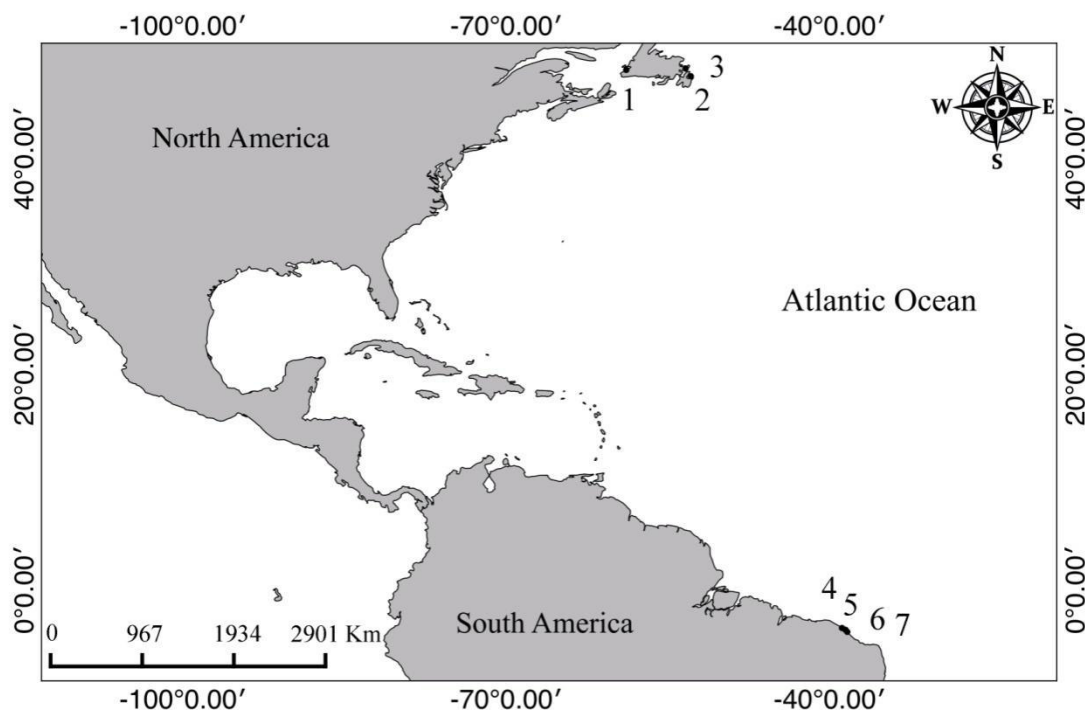


Figure 2. Map showing the six localities (black dots) from where the seven cetacean species (numbers 1 to 7) were sampled. Three species sampled from Newfoundland, Canada were: (1) *Balaenoptera musculus*, St. George's Bay; (2) *B. acutorostrata*, Portugal Cove-St. Philip's; and (3) *Phocoena phocoena*, Trinity Bay. The remaining four species sampled along the coast of Ceará State, northeastern Brazil were: (4) *Physeter macrocephalus*, Aquiraz; (5)

Peponocephala electra, São Gonçalo do Amarante; (6) *Sotalia guianensis*, Fortaleza; and (7) *Tursiops truncatus*, Fortaleza.



3.2 Laboratory procedures

The DNA was extracted with chloroform:isoamyl alcohol (24:1), precipitated with isopropanol, washed with 75% ethanol, and resuspended in 50 μ L distilled water. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify 495 base pairs (bp) of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (COI) using the following primers (Integrated DNA Technologies, Inc): COIf-L 5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3' and COIe-H 5'-CCAGAGATTAGAGGGAATCAGTG-3' (Kessing et al., 1989). The amplification reaction was performed in 100 μ L solution containing 1.96 mM $MgCl_2$, 67 mM Tris-HCl, pH 9.0, 9.94 mM β -mercaptoethanol, 0.2 mM each dNTP, 2 μ L isolated DNA, 0.4 μ L each primer, 1–3 units *AmpliTaq*TM DNA Polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Mississauga, ON). The amplification conditions were as follows: 5 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 93°C, 1 min at 40°C, and 30 s at 55°C, and 2 min at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C. The electrophoresis of the 5 μ L PCR product mixed with 1 μ L dye was performed on 2% agarose gel in 1 M TBE buffer. The purification of PCR products was performed using WizardTM Magic PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., Madison, WI),

following the manufacturer instructions. The forward and reverse strands were sequenced on an Automated DNA Sequencer ABI373A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

3.3 Molecular identification: BLAST

The sequences were checked for their potential as markers for species identification. Each sequence was analyzed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990) available on the website of the National Center for Biotechnology Information - NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). More specifically, the sequences were assessed using Blastn analysis and Megablast. Blastn is most appropriate for short input queries, for the identification of short matches, and for cross-species search, whereas Megablast is most appropriate for sequence identification and intra-species comparison (NCBI, 2016). Both analyses were performed using the default parameters and gave the same results. Only the matches with E-value of 0.0 were considered, because they imply an almost zero probability of the alignment occurring by chance. This procedure worked as expected for six out of the seven E3-I5 COI sequences obtained; the *S. guianensis* sequence did not produce any Blastn or Megablast output. This led us to perform an alternative crosscheck of the obtained *S. guianensis* DNA sequence as detailed below.

3.4 Preparation for percent identity analysis: Checking the identity of *Sotalia guianensis* complete mitochondrial sequences available in GenBank

The Blastn and Megablast trials did not produce any output for *S. guianensis* because of the absence of homologous sequences for this species/genus available for BLAST analysis in GenBank. This was unexpected because GenBank does have a total of six complete mitochondrial genome sequences of *S. guianensis* (GenBank accession Nos. JF681039 and KM893424) and its congener *S. fluviatilis* (GenBank accession Nos. JF681040, KM893423, KM893421, and KM893422). The reason for this unavailability of *Sotalia* sequences for BLAST analysis is that these sequences are currently designated as ‘unverified’ in GenBank.

To help confirm the identity of the ‘unverified’ complete mitochondrial genome sequences of *S. guianensis* and *S. fluviatilis*, we performed a phylogenetic analysis using the mitochondrial cytochrome *b* gene, which is also available in GenBank. The idea behind this procedure was that if the identity of each ‘unverified’ mitochondrial genome sequences was

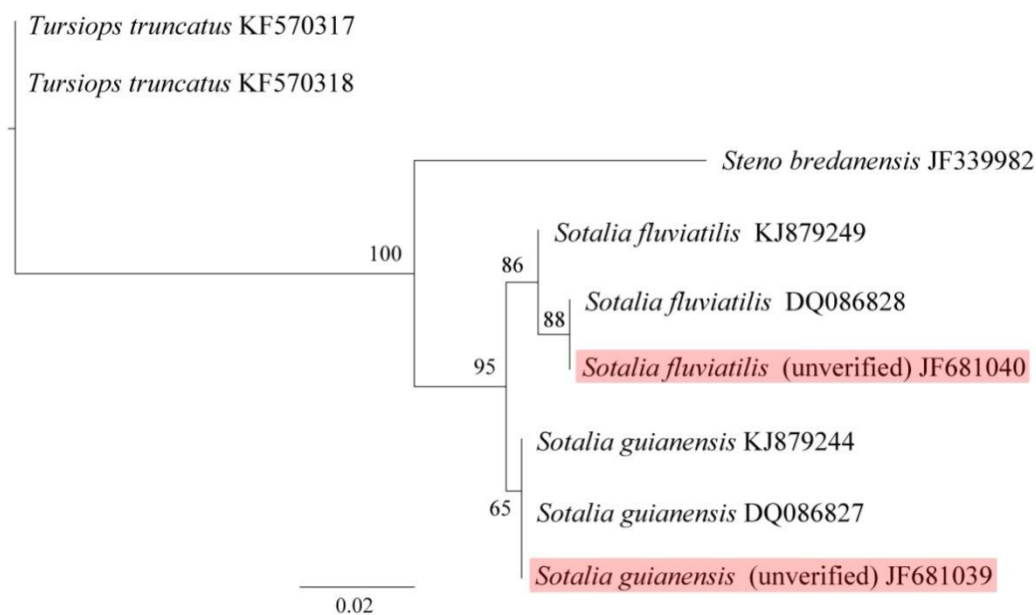
confirmed, we would have a species-certified COI gene region available for comparison. This would then permit us to test whether the E3-I5 COI sequence used in the present study could correctly assign the species. For instance, having a certified *S. guianensis* COI sequence, a percent identity analysis could serve as an immediate alternative to the unavailable BLAST analysis.

The aforementioned phylogenetic analysis based on *cyt b* was then performed as follows. First, we built a 365-bp dataset including the six ‘unverified’ complete mitochondrial sequences and all the other sequences available in GenBank for *S. guianensis* and *S. fluviatilis*. These included *S. guianensis* DQ086827 and *S. fluviatilis* DQ086828 sequences (i.e., the ones included in the analysis that revealed that the marine and riverine ecotypes of *Sotalia* are different species; Cunha et al., 2005). Our analysis also included one sequence from the northeastern coast of Brazil (*S. guianensis*, GenBank accession No. KJ879244) and another from the Amazon (*S. fluviatilis*, GenBank accession No. KJ879249) (Falcão et al., 2014). Finally, the sequences of *T. truncatus* and *Steno bredanensis* were included as outgroups for the analysis.

The *cyt b* sequences were aligned in Geneious 7.1.5 using MAFFT v7 (Katoh et al., 2002). The crosschecking revealed that four of the six ‘unverified’ sequences (GenBank accession Nos. KM893424, KM893423, KM893421, and KM893422) had unexpected stop codons along the sequence. These were excluded from the alignment. The two remaining ‘unverified’ sequences were *S. guianensis* JF681039 and *S. fluviatilis* JF681040.

After finalizing the alignment, we selected the most appropriated model of evolution using jModelTest 2 (Guindon and Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012), following a Bayesian selection criteria. The analysis suggested Hasegawa -Kishino-Yano (HKY) as the most appropriate model. A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic analysis was then performed on PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), which is also implemented in Geneious. Finally, the identity of each of the two ‘unverified’ sequences, *S. guianensis* JF681039 and *S. fluviatilis* JF681040, was confirmed (Figure 3).

Figure 3. Verification of the identity of GenBank’s ‘unverified’ complete mitochondrial DNA sequences for *Sotalia guianensis* JF681039 and *Sotalia fluviatilis* JF681040. The Maximum Likelihood tree based on the partial cytochrome *b* sequences shows that these ‘unverified’ sequences have, in fact, correct identities. The respective GenBank accession No. for each sequence is provided. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).



3.5 Molecular identification: percent identity analysis of COI

Once the identity of each ‘unverified’ complete mitochondrial DNA sequence was confirmed by the *cyt b* analysis, we built a 495 bp COI dataset. This COI dataset included the seven sequences from the E3-I5 region obtained in the present study and nine homologous sequences available in GenBank. The DNA sequences obtained from GenBank were: *B. musculus* (X72204), *B. acutorostrata* (GenBank accession No. AP006468), *P. macrocephalus* (GenBank accession No. KC312603), *P. phocoena* (GenBank accession No. AJ554063), *P. electra* (GenBank accession No. JF289176), *S. guianensis* (GenBank accession No. JF681039), *T. truncatus* (GenBank accession No. FJ590428), *Hippopotamus amphibius* (GenBank accession No. AP003425), and *S. fluviatilis* (GenBank accession No. JF681040). This COI dataset was then submitted to ML analysis. This was done in order to obtain percent identity values, which in turn were crosschecked with the percent identity values obtained after BLAST analyses. The same methodology as described above for the *Cyt b* ML analysis was followed for this COI ML analysis, except for the model of evolution. The model of evolution adopted for the COI dataset was the HKY+G (gamma = 0.163).

4 RESULTS

The E3-I5 region of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences obtained from all the seven species showed high percent identity with the DNA sequence(s) available in GenBank for their respective species. For the six species that were available for BLAST analysis in GenBank, BLAST and the percent identity (based on maximum likelihood analysis) values varied between 99 and 100% (Table 1). As for the only species that was unavailable for BLAST, *Sotalia guianensis*, the percent identity value obtained was 99% (Table 1). (See Figure 4 for a maximum likelihood tree including all seven studied cetacean species displaying clades of conspecific sequences and showing a match between present study and GenBank sequences).

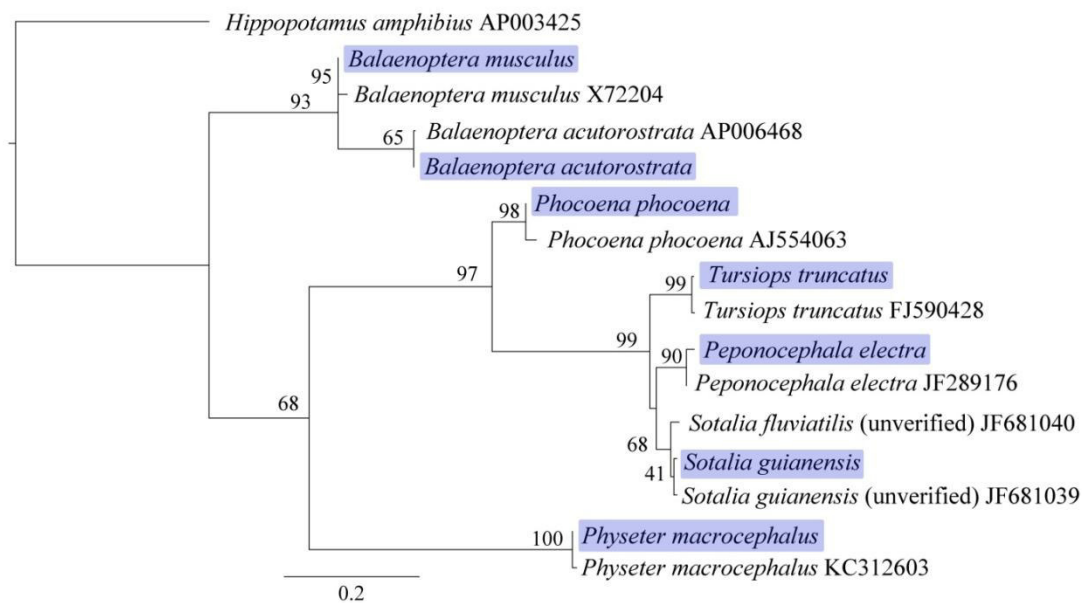
Table 1. Percent identity values between sequences of the E3-I5 region of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene obtained in the present study for cetaceans from Canada and Brazil (West Atlantic) and DNA sequence from its respective congener available in the online database GenBank. BLAST scores for each comparison have E-value = 0. Percent identity values were obtained after Blast and Maximum Likelihood (ML) analyses.

Species (GenBank accession No.) Present study/GenBank	Percent identity- BLAST	Percent identity- ML
Balaenopteridae		
<i>Balaenoptera musculus</i> (KX079489)/(X72204.1)	99%	99%
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (KX079490)/(AP006468.1)	99%	99%
Physeteridae		
<i>Physeter macrocephalus</i> (KX079491)/(KC312603)	100%	99%
Phocoenidae		
<i>Phocoena phocoena</i> (KX079493)/(AJ554063.1)	99%	99%
Delphinidae		
<i>Peponocephala electra</i> (KX079494)/(JF289176.1)	99%	99%
<i>Tursiops truncatus</i> (KX079496)/(FJ590428.1)	99%	99%

Sotalia guianensis
(KX079497)/(unverified) (JF681039)* N/A 99%

* This sequence is not available for BLAST analysis in GenBank

Figure 4. Clades of conspecific sequences for the seven studied cetacean species showing a match between present study (highlighted in purple) and GenBank sequences. Maximum likelihood tree based on an I3-E5 region of the mitochondrial COI gene. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).



5 DISCUSSION

Here we provide markers that are suitable for molecular identification of seven species of whales and dolphins that occur in West Atlantic waters. The efficiency of this identification was confirmed through the BLAST analysis and the values of percent identity. One of these markers is useful for the identification of the largest animal on Earth (Attard et al., 2016): the blue whale, *B. musculus*. This species is distributed globally and is considered an endangered species (Reilly et al., 2008).

The markers here proposed are potentially useful in a hot spot of cetacean strandings. This is because the state of Ceará, from where four of our samples were collected, is well known for cetacean strandings. For instance, a carcass of the Omura's whale, *B. omurai*, stranded in Ceará was recently identified with the aid of molecular tools (Cypriano-Souza et al., 2016). Still, the present study provides the first COI sequence to be available for BLAST analysis in GenBank for the most stranded species along the coast of Ceará, *S. guianensis* (Meirelles et al., 2010). In addition, at least two other species for which markers were developed in the present study, namely *T. truncatus* and *P. electra*, are also known to strand along the coast of Ceará (Meirelles et al., 2009). Also Canada, from where three of our samples were collected, is known for cetacean strandings (Carr et al., 2002).

In addition to carcass identification, the markers generated here are also potentially useful for monitoring the trade of the isolated parts of dolphins and whales. The capture or trade of any dolphin or whale species is illegal in Brazil (Law 7.643, December 1987). However, in spite of this law, dolphins are incidentally captured and used for consumption or as bait in Ceará (Meirelles et al., 2009), Bahia (Barbosa-Filho et al., 2016), and Rio de Janeiro (Di Benedetto et al., 2001). In addition, dolphin genitalia are sold as love charms in Amazonas and Pará (Sholl et al., 2008).

Due to these illegal uses and trade of dolphin parts, the need for identification of the stranded cetaceans, both in Canada (Truchon et al., 2013) and Brazil (Meirelles et al., 2009; Meirelles et al., 2010), and the need for conservation of these animals (Pompa et al., 2011), molecular tools for precise species identification of these animals are critical. The present study helps to fill in this immediate demand by providing an additional region of the COI gene—the E3-I5 region (loci 685 to 1179)—as a marker for molecular identification of seven species of whales and dolphins that occur in West Atlantic waters. The empirical evidence of the efficiency of these markers is supported by the congruence among all the analyses performed, which included BLAST, and percent identity.

Species in the Delphininae subfamily have been through recent and rapid processes of speciation and potential hybridization (Amaral et al., 2012). Not surprisingly, it is difficult to successfully apply molecular markers for identification of Delphininae, especially between those from the genera *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus* (Dizon et al., 2000, Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013). Due to this, the use of multiple mitochondrial regions or the development of new markers for identification of Delphininae species has been proposed (Viricel and Rosel, 2012). The marker here proposed for the common bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, may suggest the use of the I3-E5 region of COI in studies targeting multiple DNA regions of Delphininae species. Nevertheless, further sequencing of this region of COI is suggested in order to assess its potential towards molecular identification of closely related species of the genera *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus*.

ACKNOWLEDGMENTS

M.A.A. Furtado-Neto is grateful to S.M. Carr for guidance during his doctoral studies at the Memorial University of Newfoundland, which was completed under a fellowship granted by the Canadian International Development Agency–CIDA. The authors are grateful to A.C.O. de Meirelles (Aquasis), R. Maggioni (UFC), and an anonymous reviewer for invaluable suggestions on the manuscript. We are grateful to Aspen Padilla for language review. The Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP provided a Master in Science fellowship to L.H.O. Falcão; The Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico-CNPq provided a Scientific Initiation fellowship to A.S. Campos (Programa PIBIC); The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES provided a postdoctoral fellowship to J.E.P. Freitas (Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alfonsi E, Méheust E, Fuchs S, Carpentier FG, et al. (2013). The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *ZooKeys* 365: 5-24.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Amaral AR, Jackson, JA, Möller LM, Beheregaray LB (2012). Species tree of a recent radiation: The subfamily Delphininae (Cetacea, Mammalia). *Mol. Phylogenet. Evol.* 64: 243-253.
- Amaral AR, Sequeira M and Coelho, MM (2007). A first approach to the usefulness of cytochrome *c* oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species. *Mar. Freshwater Res.* 58: 505-510.
- Amon JD, Glover AG, Wiklund H, Marsh L, et al. (2013). The discovery of a natural whale fall in the Antarctic deep sea. *Deep Sea Res. II* 92: 87-96.
- Attard CR, Beheregaray LB and Möller LM (2016). Towards population-level conservation in the critically endangered Antarctic blue whale: the number and distribution of their populations. *Sci. Rep.* 6: 22291.
- Barbosa-Filho MLV, Costa-Neto EM and Danilewicz D (2016). Dolphin harpooning off the coast of Bahia, Brazil. *Mar. Biodivers. Rec.* 9: 42.
- Carr SM, Marshall HD, Johnstone KA, Pynn LM, et al. (2002). How to tell a sea monster: molecular discrimination of large marine animals of the North Atlantic. *Biol. Bull.* 202: 1-5.
- Chang CH, Yao CJ, Yu HY, Liao YC, et al. (2014). A molecular forensic method for identifying species composition of processed marine mammal meats. *J. Forensic Leg. Med.* 23: 65-69.
- Cunha HA, da Silva VMF, Lailson-Brito Jr J, Santos MCO, et al. (2005). Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Mar. Biol.* 148: 449-457.
- Cypriano-Souza AL, Meirelles ACO and Carvalho VL (2016). Rare or cryptic? The first report of an Omura's whale (*Balaenoptera omurai*) in the South Atlantic Ocean. *Mar. Mammal Sci.* 33: 80-95.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9: 772.

- Di Benedetto AP, Ramos RMA and Lima NRW (2001). Os golfinhos: origem, classificação, captura acidental, hábito alimentar. Cinco Continentes Editora, Porto Alegre.
- Di Tullio JC, Gandra TB, Zerbini AN and Secchi ER (2016). Diversity and distribution patterns of cetaceans in the subtropical southwestern Atlantic outer continental shelf and slope. *PLoS One* 11: e0155841.
- Dizon A, Baker CS, Cipriano F, Lento G, et al. (2000). Molecular genetic identification of whales, dolphins and porpoises: proceedings of a workshop on the forensic use of molecular techniques to identify wildlife products in the market place. NOAA Technical Memorandum NMFS NOAA-TM-NMFS-SWFSC- 286, 2000. (National Oceanic and Atmospheric Administration: La Jolla, CA.)
- Falcão LH, Furtado-Neto MA, Maggioni R and Faria VV (2014). Prospective molecular markers for the identification of illegally traded angelsharks (*Squatina*) and dolphin (*Sotalia guianensis*). *Genet. Mol. Res.* 13: 9710-9717.
- Gravena W, Hrbek T, Silva VMF and Farias IP (2008). Amazon River dolphin love fetishes: from folklore to molecular forensics. *Mar. Mammal Sci.* 24: 969-978.
- Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *P. Roy. Soc. B.- Biol. Sci.* 270: 313-321
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30: 3059-3066.
- Kessing B, Croom AM, McIntosh C, Mcmillan OW, et al. (1989). The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, HI.
- Kochzius M (2009). Trends in fishery genetics. In: The Future of Fisheries Science in North America (Beamish RJ and Rothschild BJ, eds.). *Fish Fisheries Series* 31: 453-493, Springer Netherlands.
- Leduc GR, Perrin WF and Dizon AE (1999). Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome *b* sequences. *Mar. Mammal Sci.* 15: 619-648.
- Lewis RL, Crowder LB, Read AJ and Freeman SA (2004). Understanding impacts of fisheries bycatch on marine megafauna. *Trends Ecol. Evol.* 19: 598-604.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153 - 165.

- Meirelles ACO, Monteiro-Neto C, Martins AMA, Costa AF, et al. (2009) Cetacean strandings on the coast of Ceará, north-eastern Brazil (1992–2005). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 89: 1083-1090.
- Meirelles ACO, Ribeiro AC, Silva CPN and Soares Filho AA (2010). Records of guiana dolphin, *Sotalia guianensis*, in the state of Ceará, northeastern Brazil. *LAJAM* 8: 97-102.
- Monteiro-Filho ELA, Monteiro LR and Reis SF (2002). Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: A morphometric tridimensional analysis. *J. Mammal.* 83: 125-134.
- NCBI (2016) BLAST homepage & search pages. NCBI Handout Series. Available at [http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf]. Last updated on March 18, 2016.
- Perrin WF (2017). World Cetacea Database. Available at [<http://www.marinespecies.org/cetacea>]. Accessed August 08, 2016.
- Phipps M, Ishihara A, Kanda N and Suzuki H (1998). A preliminary report on DNA sequence analysis of whale meat and whale meat products collected in Japan. *TRAFFIC Bull.* 17: 91-94.
- Pompa S, Ehrlich PR and Ceballos G (2011). Global distribution and conservation of marine mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 13600-13605.
- Reilly SB, Bannister JL, Best PB, Brown M, et al. (2008). *Balaenoptera musculus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. e.T2477A9447146. Available at: [<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T2477A9447146.en.>].
- Rendell L and Whitehead H (2001). Culture in whales and dolphins. *Behav. Brain Sci.* 24: 309-324.
- Sholl TGC, Nascimento FF, Leoncini O, Bonvicino CR, et al. (2008). Taxonomic identification of dolphin love charms commercialized in the Amazonian region through the analysis of cytochrome *b* DNA. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 88: 1207-1210.
- Torres-Florez JP, Hucke-Gaete R, Leduc R, Lang A, et al. (2014). Blue whale population structure along the eastern South Pacific Ocean: evidence of more than one population. *Mol. Ecol.* 23: 5998-6010.
- Truchon MH, Measures L, L'Hérault V, Brêthes JC, et al. (2013). Marine mammal strandings and environmental changes: a 15-year study in the St. Lawrence ecosystem. *PloS One* 8: e59311.
- Tsai LC, Lee JC, Shen LL and Hsieh HM (2013). Identification of the seized meats products for suspected Cetacea. *Forensic Sci. J.* 12: 9-14.

- Viricel A and Rosel PE (2012). Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Mar. Mammal Sci.* 28: 37-62.
- Visser F, Curé C, Kvadsheim PH, Lam FPA, et al. (2016). Disturbance-specific social responses in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *Sci. Rep.* 6: 28641.

Capítulo II: MARCADORES MOLECULARES PARA A AUTENTICAÇÃO DE PRODUTOS DE PARGO, *Lutjanus purpureus*

6 INTRODUÇÃO

Os peixes da família Lutjanidae, também conhecidos como vermelhos, possuem uma relevante importância comercial, especialmente na região norte e nordeste do Brasil (SOUZA, 2000; SALES *et al.*, 2006). No total, oito espécies dessa família ocorrem no Brasil: *Lutjanus purpureus*, *L. alexandrei*, *L. analis*, *L. bucanella*, *L. cyanopterus*, *L. jocu*, *L. synagris* e *L. vivanus* (MOURA *et al.*, 2007). O pargo (*L. purpureus*) por exemplo, é o terceiro produto pesqueiro mais exportado pelo Brasil (anos 2014-2015) na forma de filé congelado (SEAFOOD BRASIL, 2015). Para transformar o peixe em filé, ele passa por etapas de beneficiamento que removem importantes características morfológicas, dificultando a identificação da espécie do produto final. A soma da semelhança morfológica com outras espécies do gênero com a falta de caracteres morfológicos em produtos como filés, fazem com que a ocorrência de fraudes ou erro de rotulagem no comércio internacional seja comum (WARNER *et al.*, 2013).

Erros de identificação envolvendo espécies de Lutjanideos já foram relatados em alguns países como no Panamá (GOLD *et al.*, 2011), Espanha (MUÑOZ-COLMENERO *et al.*, 2016), Itália (FERRITO *et al.*, 2016) Brasil (BRITO *et al.*, 2015) e nos Estados Unidos (HSIEH *et al.*, 1994; MARKO *et al.*, 2004; WARNER *et al.*, 2013). O Grupo Conservacionista OCEANA investigou em 2013 a ocorrência de fraude na substituição de várias espécies de pescado no Estados Unidos, incluindo os peixes vermelhos (WARNER *et al.*, 2013). Essa investigação revelou que o peixe vermelho *red snapper* (nome popular que deve fazer referência apenas para a espécie *L. campechanus* que ocorre no Atlântico Norte) é alvo de substituições por espécies semelhantes, como o *spotted rose snapper* (*L. guttatus*), o *pargol/caribbean red snapper* (*L. purpureus*) e até mesmo por tilápia (*Oreochromis niloticus*).

No Brasil, o *L. purpureus* compreende uma única população que está presente no Norte e Nordeste do país (GOMES *et al.*, 2012). Esses autores consideraram, baseado nos resultados das suas análises moleculares, que as espécies *L. purpureus* e *L. campechanus* são uma única espécie de populações diferentes. Entretanto, ainda não foi decidido qual será o nome dessa espécie, se será chamada de *L. purpureus* (pargo) ou *L. campechanus* (*red*

snapper). Sabe-se que, segundo a IUCN, os estoques dessa espécie são bem definidos, sendo um no Atlântico Norte e outro no Atlântico Sul (Refs. IUCN). Dessa forma, apesar do presente estudo aceitar a relevante proposta de GOMES *et al* (2012), o presente estudo continuará utilizado os nomes que são válidos até o momento, *L. purpureus* e *L. campechanus*. O primeiro para se referir aos espécimes do estoque do Atlântico Sul e o segundo para os espécimes do estoque do Atlântico Norte. Isto será feito com a finalidade de facilitar a compreensão do estudo aqui realizado.

Por conta do intenso esforço de captura nos estoques dessa espécie, a ocorrência de erros de identificação ou fraude de substituições intencionais e a sua importância econômica, é importante que haja um monitoramento do comércio dessa espécie, evitando assim a falsa impressão de que a mesma é abundante na natureza devido a sua constante oferta no mercado (HSIEH *et al.*, 1994; MARKO *et al.*, 2004; FONTELES-FILHO, 2007; GOLD *et al.*, 2011; WARNER *et al.*, 2013).

Devido a falta de caracteres morfológicos nos filés de peixe e da dificuldade de identificação morfológica entre as espécies de vermelhos, a identificação a nível molecular para produtos morfológicamente descaracterizados pode ser necessária. Dois tipos de marcadores moleculares já foram aplicados de maneira eficiente na identificação de vermelhos. Um deles foi o marcador do tipo PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), utilizando do Citocromo *b* (CHOW E CLARKE, 1993). A outra classe, foi o sequenciamento de DNA, utilizando-se os genes COI e *D-loop* (GOMES *et al.*, 2008; VENEZA *et al.*, 2014). Destes, o método de identificação molecular mais simples e de menor custo é o PCR-RFLP (MENDONÇA *et al.*, 2009). Esse método se baseia em padrões de bandas em gel, gerados a partir de cortes em amplicons (produtos de PCR) realizados por enzimas de restrição. O PCR-RFLP, também tem sido utilizado com sucesso para identificação de outros tipos de pescados (ESPIÑERA *et al.*, 2009). Entretanto, apesar da eficiência do PCR-RFLP, associado ao Citocromo *b*, já ter sido demonstrada para identificação de várias espécies de peixes vermelhos (CHOW E CLARKE, 1993), ainda não foi descrito um marcador do tipo PCR-RFLP para identificação do pargo que ocorre no Norte e Nordeste do Brasil, *Lutjanus purpureus*. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver (*in silico*) marcadores moleculares prospectivos do tipo PCR-RFLP, associado ao Citocromo *b*, para identificação o *L. purpureus*, do estoque do Atlântico Sul, diferenciando das outras sete espécies do gênero *Lutjanus* que ocorrem no Brasil, do *L. campechanus*, do estoque do Atlântico Norte, além de outras espécies envolvidas em fraude nesse comércio.

7 MATERIAL E MÉTODOS

Doze sequências parciais (278bp) não publicadas, da porção inicial do gene mitocondrial Citocromo *b* da espécie *Lutjanus purpureus*, foram obtidas da tese de doutorado de Furtado-Neto (1998). Os espécimes amostrados foram capturados no litoral norte do Brasil, sendo identificado um total de quatro haplótipos. Adicionalmente, foram obtidas no *Genbank* todas as sequências homólogas e de mesmo tamanho (n= 43) de todas as espécies do gênero *Lutjanus* que ocorrem no Brasil e de outras duas espécies (*Ocyurus chrysurus* e *Oreochromis niloticus*) com registro em casos de substituição de pargo. Com exceção apenas para a espécie *L. purpureus*, pois, na data da análise do presente estudo, não havia sequências homólogas disponíveis no *Genbank* para essa espécie (Tabela 2). Assim, este será o primeiro depósito de sequências da referida região do gene citocromo *b* para essa espécie.

Tabela 2- Espécies estudadas e seus respectivos códigos genbank

Espécie	Nome comum	Código Genbank
<i>Lutjanus purpureus</i>	Pargo	-
<i>L.campechanus</i>	<i>red snapper</i>	AY374294, HQ162421 - HQ162423
<i>L. alexandrei</i>	Baúna	HQ162467
<i>L. analis</i>	Cioba	HQ162430 - HQ162432
<i>L. bucanella</i>	pargo-boca-preta	HQ162436 - HQ162438
<i>L. cyanopterus</i>	Caranha	HQ162439 - HQ162441
<i>L. jocu</i>	Dentão	HQ162442 - HQ162444
<i>L. synagris</i>	Ariacó	HQ162427 - HQ162429
<i>L. vivanus</i>	olho-de-vidro	HQ162446 - HQ162448
<i>Ocyurus chrysurs</i>	Guaiuba	HQ162449 - HQ162451
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia	GU477624 - GU477628, AB018989, HM352753, GU370126, NC_013663, HE792804.2, GU238433.

Todas as sequências foram compiladas e alinhadas utilizando o programa MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 2016). No mesmo programa foi realizada a árvore *Neighbor Joining* com 500 replicações de *bootstrap*. Após alinhadas, as 43 sequências foram utilizadas no programa *Restriction Mapper*. Esse programa simula a ação (corte enzimático) de enzimas de restrição nas sequências de DNA. No total, o programa testa virtualmente 143 enzimas de restrição, indicando a posição de corte na sequência. Das várias enzimas que atuavam na sequências do gene citocromo b, foram escolhidas (por eliminação) aquelas que eram capazes de identificar apenas as sequências da espécie *L. purpureus* das demais espécies aqui estudadas. Ou seja, o critério utilizado para a escolha da enzimas era que, dentro das 11 espécies aqui estudadas, as enzimas de restrição deveriam cortar (*in silico*) apenas as sequências de pargo, sem atuar nas demais sequências analisadas.

8 RESULTADOS

8.1 Digestão *in silico*

As enzimas de restrição AfLIII e MluI foram identificadas com potencial para distinguir o pargo (*Lutjanus. purpureus*) de todas as espécies do gênero *Lutjanus* que ocorrem no Brasil e do *red snapper* (*L. campechanus*). Para as nossas sequências do gene Citocromo *b* de *L. purpureus* o programa *Restriction Mapper* testou um total de 143 enzimas de restrição comerciais e apenas 22 destas tiveram potencial de ação sobre as sequências do pargo. Destas 22, apenas as enzimas AfLIII e MluI atuaram exclusivamente nas sequências de pargo, no universo das 11 espécies testadas. Ambos os cortes enzimáticos, realizado pelas enzimas AfLIII e MluI, ocorreram na posição 18 na sequência do gene citocromo *b* do *L. purpureus* (EAS) de 278 bp (Tabela 3).

Tabela 3 - Sítio de restrição* (SR) e o tamanho da banda esperada* (BE) em pares de base do corte enzimático (*in silico*) realizado pelas enzimas AfLIII e MluI nas 11 espécies aqui estudadas.

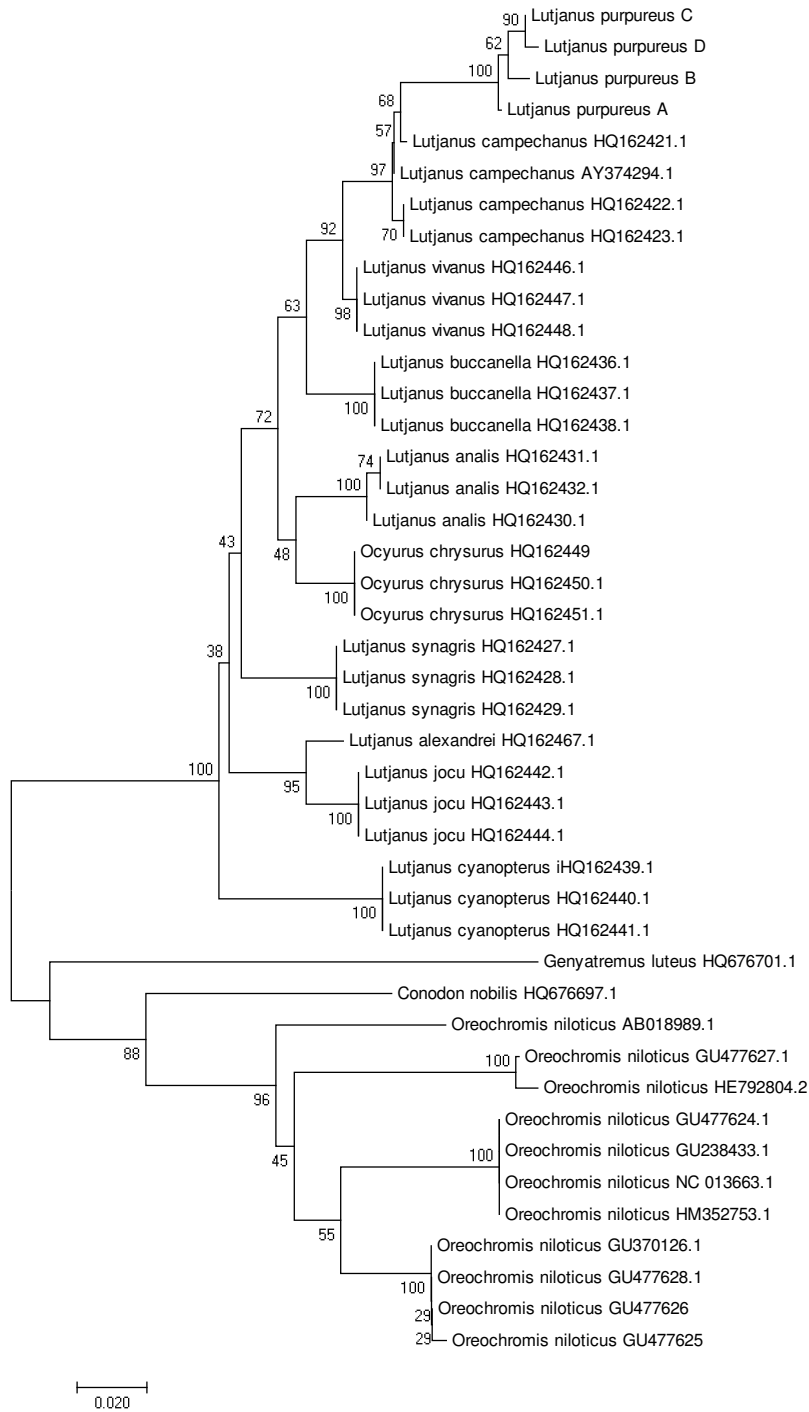
Enzimas	<i>L. purpureus</i>		<i>L. campechanus</i>		<i>L. analis</i>		<i>L. bucanella</i>		<i>L. synagris</i>		<i>L. alexandrei</i>		<i>L. jocu</i>		<i>L. vivanus</i>		<i>L. cyanopterus</i>		<i>O. chrysurus</i>		<i>O. niloticus</i>	
	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE	SR	BE
AfLIII	91	301, 91	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392
MluI	91	301, 91	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392	-	392

* Considerando um amplicon de 392 bp

8.2 Árvore filogenética *Neighbor Joining*

A árvore filogenética do tipo *Neighbor Joining* gerada, realizada para as 11 espécies aqui estudadas e incluindo duas espécies como grupo externo (*Genyatremus luteus* e *Conodon nobilis*), apresentou clados bem definidos para cada espécie (Figura 5).

Figura 5 - Árvore *Neighbor Joining* com 500 replicações, incluindo todas espécies de *Lutjanus* do Brasil, além de outras espécies relevantes à fraudes no comércio de *Lutjanus purpureus*.



9 DISCUSSÃO

Aqui foram descritas prospectivas enzimas de restrição (AfLIII e MluI) potencialmente capazes de distinguir a espécie *Lutjanus purpureus* do estoque Atlântico Sul do estoque do Atlântico Norte (*L. campechanus*) e de outras 8 espécies de vermelhos que ocorrem no Brasil. A aplicação desses marcadores é potencialmente útil na investigação das seguintes situações: fraude de substituição de *L. purpureus* por uma das outras 10 espécies aqui estudadas, erro de rotulagem/identificação e identificação da origem geográfica do pargo e *red snapper* comercializado (estoque do Atlântico Sul ou do Atlântico Norte). Situações nas quais devem estar envolvidas apenas as 11 espécies aqui estudadas.

Algumas espécies aqui estudadas são muito semelhantes morfológicamente entre si e essa semelhança facilita a ocorrência de erros de identificação (Ward, 2000). Além disso, esse autor afirma que o processamento, no qual alguns produtos de pescado são submetidos, passa por etapas onde ocorre a remoção de importantes características morfológicas (Ex. cabeça e as nadadeiras), facilitando a ocorrência de substituição intencional por uma espécie mais barata, principalmente em produtos como filés de peixe. Nos Estados Unidos por exemplo, apenas o peixe da espécie *Lutjanus campechanus* pode ser legalmente chamado ou rotulado como *red snapper*, no entanto esse nome popular também é utilizado para se referir a outras espécies comercializadas (MARKO *et al.*, 2004). Estes autores realizaram análises moleculares nas quais revelaram que entre 60% e 94% dos peixes comercializados no Estados Unidos como *red snappers* não são da espécie *L. campechanus*. Eles afirmam ainda que isso pode ter acontecido por diferentes fatores como erro de identificação ainda na embarcação e substituição intencional por uma espécie mais barata. Erros de identificação ou substituições intencionais de espécies de pescado podem causar uma falsa impressão de que os estoques dessa espécie estão em níveis sustentáveis, pois a constante oferta de uma "mesma espécie" no comércio faz parecer que o estoque está acompanhando a demanda (MARKO *et al.*, 2004). Existe ainda o potencial de impactar programas de conservação de estoques pesqueiros dessas espécies e de causar problemas de saúde pública (WARD *et al.*, 2000; VENEZA *et al.*, 2014).

O pargo é um importante recurso pesqueiro da região nordeste do Brasil (SOUZA, 2000). A espécie está classificada como vulnerável na portaria nº 445/2014 e seu estoque adulto no Nordeste teve um declínio considerável, causando diminuição na qualidade do filé congelado exportado (FONTELES-FILHO, 2007). O autor declara ainda que, devido ao intenso esforço de pesca sobre o pargo, esse recurso encontra-se em situação de sobrepesca. Dessa forma, é importante realizar um monitoramento no comércio de pargo, identificando (quando possível) a origem geográfica desse produto, a fim de verificar a ocorrência de fraude nesse comércio e alertar a comunidade sobre a necessidade de conservação, implementando manejo adequado e medidas como o objetivo de garantir a diversidade genética para essa espécie (GOMES *et al.*, 2012).

Uma das informações importantes para o monitoramento do comércio de partes de animal é origem geográfica do espécime comercializado. A partir dessa informação foi possível, por exemplo, constatar uma contribuição internacional no comércio de barbatanas de tubarão em Taiwan (CHUANG *et al.*, 2016). Os autores constataram, através de análises de DNA, que algumas barbatanas comercializadas em Taiwan pertenciam a espécie *Sphyrna lewini* do Oceano Atlântico, mesmo com a proibição de captura dessa espécie nesse oceano. Eles afirmam ainda que essa contribuição internacional é subestimada e que é necessária uma regulamentação mais rigorosa no comércio e captura dessas espécies. Dessa forma, ao identificar a origem geográfica de um produto de pescado, é possível saber a qual população ele pertenceu, podendo até mesmo confirmar se e o produto é oriundo de uma população em risco ou não. Essa informação permite que cada população ou estoque pesqueiro seja estudado e o manejo seja elaborado de forma sustentável, visando a conservação desse recurso pesqueiro. Dentro desse contexto, as enzimas AFLIII e MLuI descritas no presente estudo são bastante úteis devido ao potencial de identificar (através do padrão de bandas) se o peixe vermelho comercializado, conhecido como pargo, pertence ao estoque do Atlântico Sul (*L. purpureus*) ou ao estoque do Atlântico Norte (*L. campechanus*), assumindo-se que se trata de uma única espécie de populações diferentes (GOMES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2012).

A utilização dessas enzimas para a identificação do pargo é feita através do uso do método PCR-RFLP. Esse método de identificação é baseado no padrão de bandas esperado, observado em gel de agarose (Figura 2). O referido método de identificação mostrou-se mais eficaz utilizando o gene Citocromo *b* ao invés do 12 S

rDNA, para algumas espécies de vermelhos (CHOW *et al.*, 1993). Essa técnica é mais rápida e barata do que outras técnicas moleculares de identificação de espécies, como por exemplo o sequenciamento do fragmento de DNA (MENDONÇA *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

- BRITO, M.A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Res. Int.** 70: 40–46, 2015.
- CHOW, S.; CLARK, M.E. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. **Fishery Bulletin** 91(4). 1993.
- CHUANG, P.S.; HUNG, T-C.; CHANG, H-A.; HUANG, C-K.; SHIAO, J-C. The Species and Origin of Shark Fins in Taiwan’s Fishing Ports, Markets, and Customs Detention: A DNA Barcoding Analysis. **PLoS ONE** 11(1): e0147290, 2016.
- ESPIÑEIRA, M.; VIEITES, J.M.; SANTA CLARA, F.J. Development of a genetic method for the identification of salmon, trout, and bream in seafood products by means of PCR-RFLP and FINS methodologies. **Eur. Food Res. Tech.** 229: 785-793, 2009.
- FERRITO, V.; BERTOLINO, V., PAPPALARDO, A.M. White fish authentication by COI Bar-RFLP: Toward a common strategy for the rapid identification of species in convenience seafood. **Food Control**, 70: 130-137, 2016.
- FONTELES-FILHO, A. Síntese sobre a distribuição, abundância, potencial pesqueiro e biologia do pargo, *Lutjanus purpureus poey* da zona econômica exclusiva do nordeste do Brasil. **Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva MMA - REVIZEE**. Brasília, 2000.
- FURTADO-NETO, MAA. Molecular Systematic and Population Genetics of Marine Vertebrates from Brazil. Doctoral thesis, Memorial University of Newfoundland, St. John’s. 1998.
- GOLD, J.R.; VOELKER, G.; RENSHAW, M.A. Phylogenetic relationships of tropical western Atlantic snappers in subfamily Lutjaninae (Lutjanidae: Perciformes) inferred from mitochondrial DNA sequences. [Biol. J. Linnean Soc.](#) 102, 915–929, 2011.

GOMES, G.; SCHNEIDER, H.; VALLINOTO, M.; SANTOS, S.; ORTI, G.; SAMPAIO, I. Can *Lutjanus purpureus* (South red snapper) be “legally” considered a red snapper (*Lutjanus campechanus*)? **Genet. Mol. Biol.** 31, 1 (suppl), 372-376, 2008.

GOMES, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Population Structure of *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae - Perciformes) on the Brazilian coast: further existence evidence of a single species of red snapper in the western Atlantic. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 84(4): 979-999, 2012.

HSJEH, Y.H.P.; WOODWARD, B.B.; BLANCO, A.W. Species substitution of retail snapper fillets. **J. of Food Quality** 18: 131-140, 1995.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33(7):1870–1874, 2016.

MARKO, P.B.; LEE, S.C.; RICE, A.M.; GRAMLING, J.M.; FITZHENRY, T.M.; MCALISTER, J.S.; HARPER, G.R.; MORAN, A.L. Mislabelling of a depleted reef fish. **NATURE**, 43, 2004.

MENDONÇA, F.F.; HASHIMOTO, D.T.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O.B.F.; FORESTI, F. Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. **Mol. Ecol. Resour.** 9: 771-773, 2009.

MOURA, R.L.; LINDEMAN, K.C. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*. **Zootaxa** 1422: 31–43, 2007

MUÑOZ-COLMENERO, M.; BLANCO, O.; ARIAS, V.; MARTINEZ, J.L.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA Authentication of Fish Products Reveals Mislabeling Associated with Seafood Processing. **Fisheries**, 41(3): 128-138, 2016.

SALES, R.; FONTELES-FILHO, A.A.; FURTADO-NETO, M.A.A.; CARR, S.M.; FREITAS, S.M. Morphometric and mitochondrial DNA analyses of the caribbean red snapper, *Lutjanus purpureus* (Teleostei, Lutjanidae), in Western Atlantic off Brazil. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 32(2): 115-125, 2006.

SEAFOOD BRASIL. 1º Anuário de Produtos, Serviços e Conteúdo. **Anuário 2015**.
ISSN 2319-0450. 2015.

SOUZA, R.C. Brazil, northern red snapper fishery. *In*: Regional Reviews and National Management Reports - Fourth Workshop on the Assessment and Management of Shrimp and Groundfish Fisheries on the Brazil-Guianas Shelf. FAO Fisheries Report No. 651. 2000.

VENEZA, I.; FELIPE, B.; OLIVEIRA, J.; SILVA, R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; GOMES, G. A barcode for the authentication of the snappers (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? **Food Control**. 38: 116 - 123, 2014.(GOMES *et al.*, [s.d.]

WARD, R.D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia** 420: 191–201, 2000.

WARNER, K.; TIMME, W.; LOWELL, B.; HIRSHFIELD, M. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. **Report OCEANA**. February, 2013. Disponível em: <http://usa.oceana.org/sites/default/files/reports/National_Seafood_Fraud_Testing_Results_FINAL.pdf>.

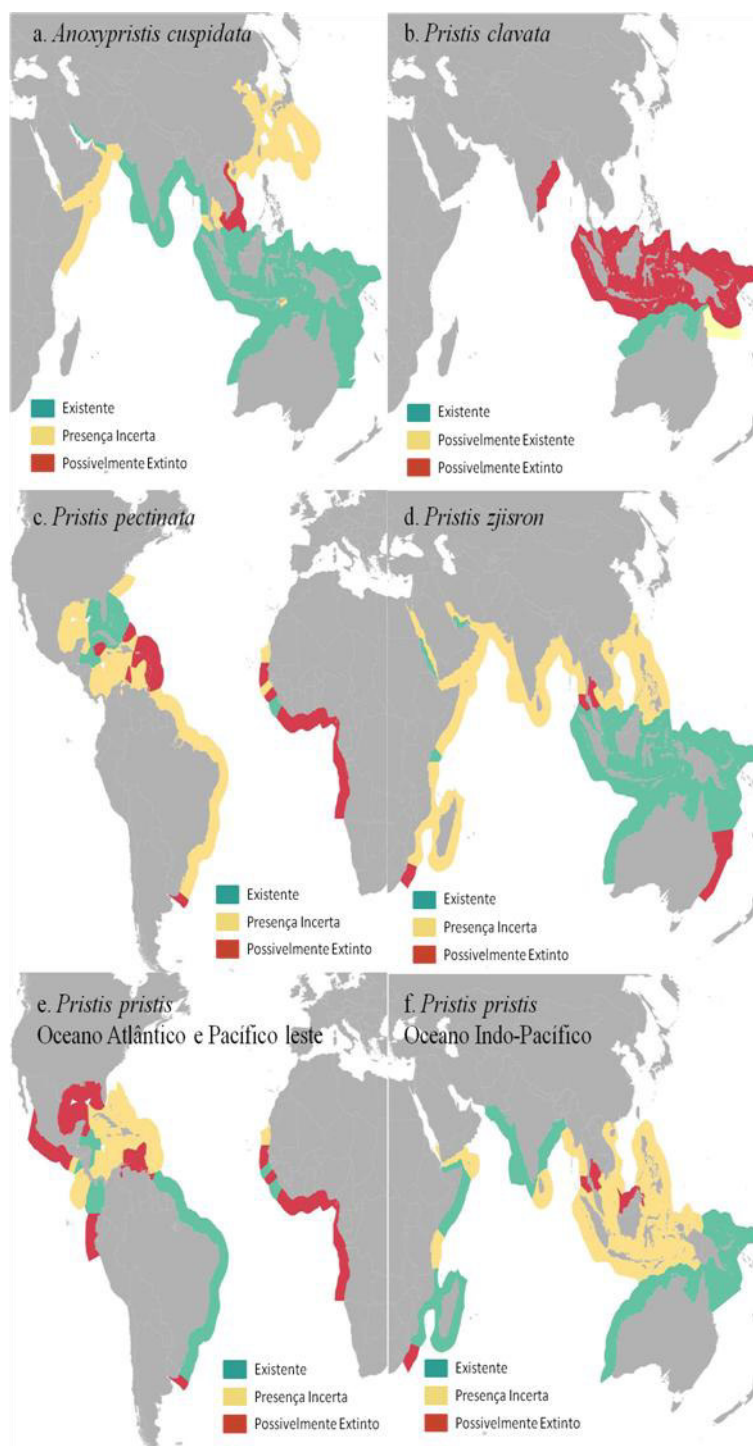
Capítulo III: COMÉRCIO *ONLINE* INTERNACIONAL DE ROSTRO DE PEIXE-SERRA (Pristidae)

10 INTRODUÇÃO

Os peixes-serra são raias que pertencem a família Pristidae. Estas raias possuem um rostro prolongado com dentes rostrais laterais, uma estrutura também chamada de serra ou catana. O rostro, que é utilizado como ferramenta para detecção (campo elétrico) e captura de presas, pode equivale de 20 a 28% do comprimento total do animal, que chega a uma média de 7 metros (WUERINGER *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2013; SIMPFENDORFER *et al.*, 2014).

As cinco espécies de peixe-serra são: *Pristis pectinata*, *Pristis pristis*, *Pristis zijsron*, *Pristis clavata* e *Anoxypristis cuspidata* (Faria *et al.*, 2013). Todas elas são consideradas eurialinas, suportando variadas concentrações de salinidade, podendo ser encontradas em rios, lagos, estuários e no mar (SIMPENDORFER *et al.*, 2014). Quanto a distribuição geográfica dos peixes-serra, a presença das espécies é incerta em várias regiões do globo (DULVY *et al.*, 2012). Os autores ainda afirmam que pelo menos uma espécie de peixe-serra está possivelmente extinta em 43 países. E em 20 destes não há mais a presença desse organismo (Figura 6).

Figura 6- Ocorrência das cinco espécies de peixe-serra no mundo, (a) *Anoxypristis cuspidata*, (b) *Pristis clavata*, (c) *Pristis pectinata*, (d) *Pristis zjisron*, (e) *Pristis pristis* do Oceano Atlântico e Pacífico leste e (f) *Pristis pristis* do Oceano Índico e Pacífico Oeste.



Fonte: DULVY *et al.*, 2012

Todas as cinco espécies estão listadas no Apêndice I da CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. As espécies incluídas neste apêndice têm o seu comércio internacional proibido (animal inteiro ou partes do animal), com exceção para fins científicos autorizados pela CITES. Entretanto, nos Estados Unidos, existe uma lei na qual lista alguns critérios que, caso sejam cumpridos, permitem o comércio de espécies listadas na CITES. Segundo a lei 16 U.S.C.A. § 1538(a)(1)(F) da Endangered Species Act (ESA), válida em território americano, é permitido o comércio de *antiques* (mais de 100 anos) feitos de espécies listadas na CITES, desde que se apresente a documentação exigida.

Apesar das leis de proteção, do desenvolvimento de estratégias globais de conservação (DULVY *et al.*, 2014), do risco de extinção e da conseqüente urgente necessidade de conservação, o peixe-serra ainda é alvo de captura e comércio. Esse comércio tem como principal alvo as barbatanas ou nadadeiras. Mas, a carne de animais capturados também é vendida como pescado. Por exemplo, o peixe-serra, *Pristis pristis*, é vendido como "cação" em mercados da região norte do Brasil (PALMEIRA *et al.*, 2013). Assim como os filés, as nadadeiras de peixe serra podem ter o comércio mais facilitado, devido a semelhança com as nadadeiras de tubarão (FELDHEIM *et al.*, 2010). Outro importante item desse comércio é o rostro ou catana, que possui um alto valor cultural, além do comercial. Culturalmente, na Indonésia, o rostro e/ou cabeça dos *Pristis* spp. são utilizados em casas como amuletos de proteção (NIJMAN & NEKARIS, 2014) e como máscaras em rituais e cerimônias nas Ilhas de Bijago em Guiné-Bissau (LEENEY & PONCELET, 2015). Já no Peru, os dentes rostrais são utilizados para fabricação de esporas utilizadas em rinhas de galo (McDAVITT, 2014).

Recentemente foi relatado no Quênia que um único exemplar de peixe-serra pode render até US\$ 5.346, a partir da venda de suas barbatanas e do rostro (McDavitt, 2014).

O comércio de partes de peixe-serra pode ocorrer tanto localmente, como internacionalmente. Sites oriundos da China, Indonésia, Austrália e Madagascar fazem comércio de nadadeiras de *Pristis* sp. e *Anoxypristis cuspidata* (McDAVITT, 2014). Também já foi relatado o comércio internacional de rostro de peixe-serra através do *eBay*, um popular site de compras e vendas. Para exemplificar o quão representativo é este comércio, apenas entre 2004 e 2005, foi estimado um total de 210 rostros vendidos/ano por um único *site* de compra e vendas (*eBay*) (McDAVITT & CHARVET-ALMEIDA, 2004). Estes mesmos autores estimaram o valor total de produtos ofertados neste período de US\$ 25.000.

Notavelmente, o estudo pioneiro McDavitt & Charvet-Almeida (2004) ainda é toda a informação que se sabe sobre o comércio *online* desses animais ameaçados. Portanto, já existe uma lacuna de mais de 10 anos sobre o conhecimento do status desse tipo de comércio. Ainda, vale ressaltar que o estudo desses autores abordou o *site* de comércio *online* mais importante da época, sendo que diversos outros sites do gênero foram criados desde então. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo descrever o status atual do comércio *online* de rostros de peixe-serra.

11 MATERIAL E MÉTODOS

Buscas por palavras-chave em diferentes idiomas foram feitas no site de busca *Google Images* (Tabela 4). As buscas foram realizadas entre os meses de Março/2015 e Janeiro/ 2016 com frequência de 3 a 4 vezes por semana.

Tabela 4. Palavras-chave utilizadas na busca realizada no *Google Images*.

Palavra-chave	Idioma*
Zaagvis rostrum	Africâner
Schwert Sägefisch	Alemão
Rostre de requin	Espanhol
Rostre poisson-scie	Francês
Sawfish rostrum, Sawfish sword	Inglês
Peixe-serra, Rostro de peixe-serra, Catana	Português

* As palavras-chave foram traduzidas no tradutor *online* do *Google*.

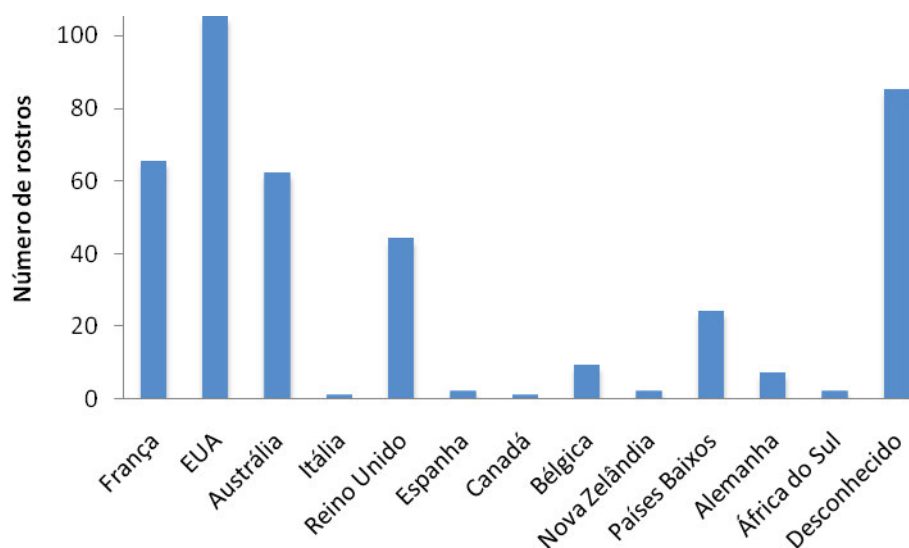
Fotos resultantes das buscas e relacionadas ao tema do trabalho foram acessadas e arquivadas. Estas incluíam todas as cinco espécies de peixe-serra, distribuídas nas seguintes proporções: 30,3% *Anoxypristis cuspidata*, 30,3% *Pristis zijsron*, 32,3% *Pristis pristis*; 4% *Pristis pectinata*; 3% *Pristis clavata*. As identificações foram baseadas em Faria *et al.* (2013).

Os dados de cada oferta foram registrados em uma planilha de dados. São eles: (1) data da busca, (2) data da oferta, (3) nome do site/vendedor, (4) local do vendedor, (5) local de entrega, (6) valor do produto, (7) quantidade, (8) comprimento e (9) idade do produto. Por fim, os dados foram explorados graficamente.

12 RESULTADOS

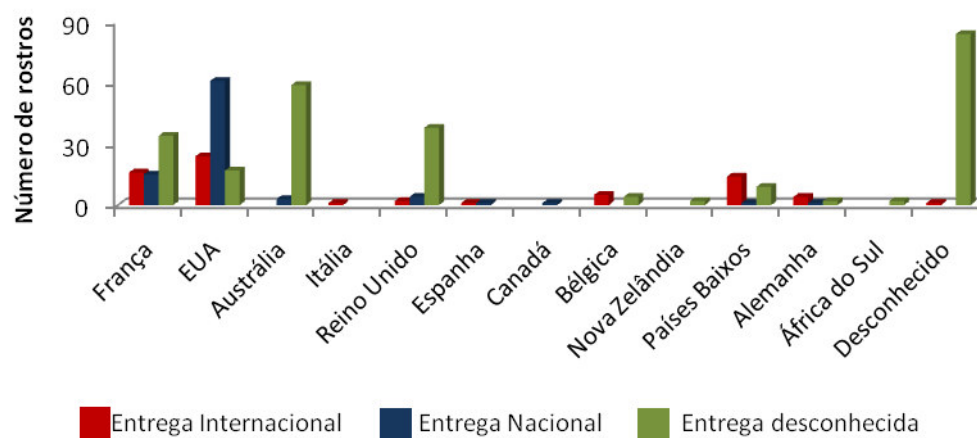
Um total de 402 rostros ofertados (vendidos ou à venda) foram registrados. Lojas e vendedores de pelo menos 12 países estão envolvidos no comércio *online* de rostros de peixe-serra. Os países com o maior número de ofertas são os Estados Unidos da América (EUA) e França. Entretanto, existe um grande número de ofertas que não fornecem informação sobre o local do produto (Gráfico 1).

Gráfico 1. Quantidade de rostros ofertados por país. As informações dos locais (países) dos produtos são referentes ao endereço da loja física ou estavam disponíveis pelos vendedores no *site* de compra e venda.

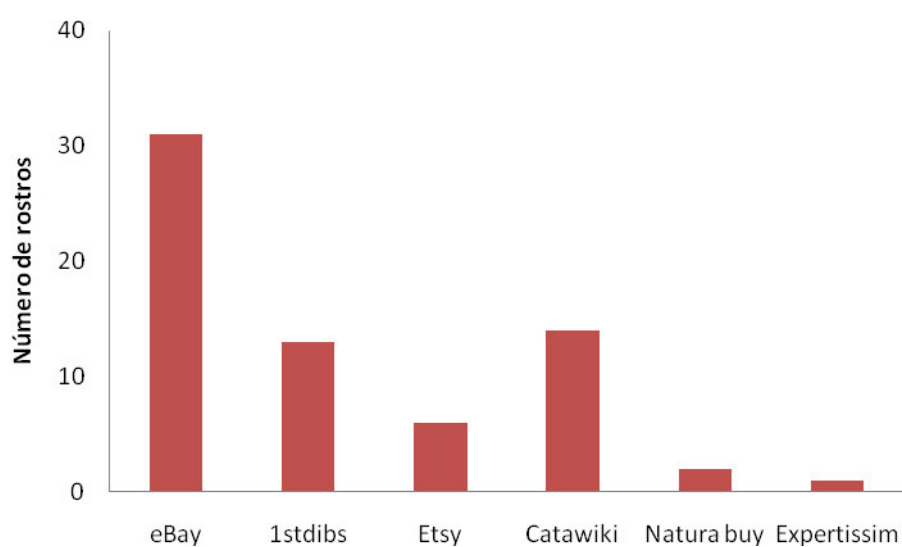


Com relação a entrega do produto, os vendedores/lojas *online* que ofertavam rostros com a opção de entrega internacional eram localizados principalmente nos EUA, França, Países Baixos e Bélgica (Gráfico 2). Porém, muitos sites ou vendedores não disponibilizam essa informação. A falta de dados sobre a entrega do produto foi de 57,3% do número total de rostros.

Gráfico 2. Tipos de entrega por país.



Foram encontrados pelo menos seis websites ou lojas *online* que disponibilizavam a entrega internacional do rosto de peixe-serra (Gráfico 3). O site que teve maior número de rostros ofertados com a opção de entrega internacional foi o *eBay*. Dos 67 rostros com opção de entrega internacional, apenas 5 rostros possuem mais de 100 anos de idade.

Gráfico 3. Quantidade de rostros com opção de entrega internacional por *website*.

Com relação aos preços dos rostros ofertados, foram encontrados os seguintes tipos de valor: preço, lance, lance inicial, lance atual, lance vencedor e valor estimado. Para os 402 rostros encontrados, apenas 302 possuíam a informação de valor, e somaram um total de US\$ 204.394,13 (média de US\$ 676,80/rostro). O valor do rosto mais caro encontrado durante a pesquisa foi de US\$ 5.595,00.

13 DISCUSSÃO

O primeiro registro de monitoramento do comércio *online* de rostro de peixes-serra foi realizado no site *eBay* no ano de 2004 (McDAVITT AND CHARVET-ALMEIDA, 2004). Isso mostra que o comércio *online* desses animais vem ocorrendo há mais de 10 anos. McDavitt and Charvet-Almeida (2004) ainda verificaram que os EUA foram o país com o maior número de vendedores e compradores no referido website. Mesmo com um maior número de websites acessados pelo presente estudo (pelo menos 40), nossos dados também mostram que os EUA ainda são os maiores envolvidos nesse comércio.

O comércio internacional de espécies ameaçadas é regulamentado pela CITES e, no caso do peixe-serra, apenas o comércio internacional é proibido. Por conta disso, alguns sites e vendedores informavam que não faziam entrega internacional, ou seja, o produto só era vendido para pessoas residentes do mesmo país do vendedor. Vale ressaltar que as cinco espécies de peixe-serra estão na Lista Vermelha da IUCN nas categorias ameaçadas ou criticamente ameaçadas (The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **07 June 2016**). E, apesar de cinco dos seis websites (*eBay*, *Istdibs*, *Etsy*, *Natura buy* e *Expertissim*) possuírem uma política de proibição do comércio de espécies pertencentes a Lista Vermelha ou ao Apêndice I da CITES, o rostro de peixe-serra é facilmente encontrado à venda nesses sites.

Os países cuja CITES tenha entrado em vigor, ou seja, que são membros, são chamados de Party. No total, a CITES possui 182 Parties ou membros. O presente

estudo mostra a participação de lojas e vendedores de 12 países nos quais estão em diferentes situações de processo de declaração (Tabela 5).

Tabela 5. Lista de países envolvidos no comércio online e suas respectivas situações quanto ao processo de declaração da CITES

Member countries	CITES	International delivery available
France	Approval	Yes
USA	Ratification	Yes
Australia	Ratification	No
Italy	Ratification	Yes
UK	Ratification	Yes
Spain	Adhesion	Yes
Canada	Ratification	No
Belgium	Ratification	Yes
New Zealand	Adhesion	No
Netherlands	Ratification	Yes
Germany	Ratification	Yes
South Africa	Ratification	No

Segundo a CITES, os estados/países que estão com o termo "ratificação", "aprovação" ou "aceitação" são os estados que assinaram a Convenção. Apenas aqueles que usam o termo "adesão" ainda não assinaram a Convenção.

Apesar da CITES proibir o comércio internacional de espécies listadas no Apêndice I, uma lei ambiental dos Estados Unidos, chamada *Endangered Species Act* (ESA), possui algumas exceções que permitem o comércio de espécies listadas na CITES. Para isso, é necessário que o produto siga os seguintes critérios: (A) não ter menos de 100 anos de idade; (B) é composto totalmente ou por partes de qualquer tipo de espécie ameaçada listada na seção 1533 da Lei; (C) não foi reparado ou modificado com qualquer parte dessas espécies depois de 28 de Dezembro de 1973; e (D) é introduzida em uma porta designada para importação de antiguidades da ESA. O produto que segue os quatro critérios estabelecido pelo ESA é chamado de *ESA antique*.

Segundo o *Guidance on the Antique Exception under the Endangered Species Act*, para importação de *antiques* ESA, feito com espécies listadas na CITES, o importador deve apresentar o formulário de declaração de importação e exportação de peixe ou animal selvagem (FORM 3-177) e uma documentação que demonstra que o item segue os quatro critérios de exceção, listados anteriormente. Ou seja, ainda que o produto tenha mais de 100 anos, se encaixando nos 4 critérios de exceção do ESA, é necessário que o vendedor possua a documentação exigida para realizar o comércio. Já a exportação de ESA *antiques*, de espécies listadas na CITES, exige um certificado do U.S. CITES *Management Authority* como parte da declaração de exportação. No presente estudo, nenhuma das ofertas que foram feitas por lojas ou vendedores residentes dos Estados Unidos, mencionavam possuir algum documento autorizando o comércio.

14 CONCLUSÕES

- Existe atualmente um comércio *online* internacional de rostros de peixe-serra; prática proibida pela CITES.
- A maior parte das ofertas de rosto não restringe localidade de entrega.
- A maior parte das ofertas de rosto não apresentam a documentação que permite o comércio de rosto de peixe-serra.

REFERÊNCIAS

- DULVY, N.K., DAVIDSON, L.N.K., KYNE, P.M., SIMPFENDORFER, C.A., HARRISON, L.R., CARLSON, J.K. & FORDHAM, S.V. (2014). Ghosts of the coast: global extinction risk and conservation of sawfishes. **Aquatic Conservation: marine and freshwater ecosystems**. DOI: 10.1002/aqc.2525.
- FARIA, V.V.; McDAVITT, M.T.; CHARVET, P.; WILEY, T.R.; SIMPFENDORFER, C.A.; NAYLOR, G.J.P. Species delineation and global population structure of Critically Endangered sawfishes (Pristidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. 167, 136–164, 2013.
- FELDHEIM, K.A.; CHAPMAN, D.D.; SIMPFENDORFER, C.A.; RICHARDS, V.P.; SHIVJI, M.S.; WILEY, T.R.; POULAKIS, G.R.; CARLSON, J.K.; ENG, R.; SAGARESE, S. Genetic tools to support the conservation of the endangered smalltooth sawfish, *Pristis pectinata*. **Conservation Genet Resour** 2: 105-113, 2010.
- LEENEY, R.H.; PONCELET, P. Using fishers' ecological knowledge to assess the status and cultural importance of sawfish in Guinea-Bissau. **Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst** 25: 411–430, 2015.
- McDAVITT, M. & CHARVET-ALMEINDA, P. Quantifying trade in sawfish rostra: two examples. **Shark News. Newsletter of the IUCN Specialist Group** 16:10-11, 2004
- McDAVITT M. Threats to Sawfish: Sawfish products and trade. *In*: HARRISON, L.R.; DULVY, N.K. Sawfish: A Global Strategy for Conservation. **IUCN Species Survival Commission's Shark Specialist Group**, Vancouver, Canada. ISBN: 978-0-9561063-3-9. p. 72-75, 2014.
- National Marine Fisheries Service (NMFS). Recovery Plan for Smalltooth Sawfish (*Pristis pectinata*). Prepared by the Smalltooth Sawfish Recovery Team for the National Marine Fisheries Service. **Silver Spring**. 2009.
- NIJMAN, V.; NEKARIS, K.A.I. Trade in Wildlife in Bali, Indonesia, for Medicinal and Decorative Purposes. **TRAFFIC Bulletin**. 26: 0267-4297, 2014.

PALMEIRA, C.A.M.; RODRIGUES-FILHO, L.F.S.; SALES, J.B.L.; VALLINOTO, M.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: Authenticity by DNA analysis. **Food Control** 34: 249 - 252, 2013.

SIMPFENDORFER, C.A.; SMITH, K.; CARLSON, J.K. The Unusual Biology of Sawfishes. *In: In: HARRISON, L.R.; DULVY, N.K. Sawfish: A Global Strategy for Conservation. IUCN Species Survival Commission's Shark Specialist Group, Vancouver, Canada. ISBN: 978-0-9561063-3-9. p. 72-75, 2014.*

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <>. Downloaded on 07 June 2016.

WUERINGER, B.E.; SQUIRE JR, L.; KAJIURA, S.M.; HART, N.S.; CONLLIN, S.P. The function of sawfish's saw. **Current Biology**. 22: R150- R151, 2012.

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Espécies marinhas em situações de risco e com interesse comercial precisam de ferramentas que auxiliem na sua conservação e monitoramento.
- O presente estudo fornece duas ferramentas moleculares potencialmente capazes de identificar espécies envolvidas em situações ilegais ou em encalhes.
- Aqui foi descrita a atual situação do comércio online ilegal de cinco espécies criticamente ameaçadas, preenchendo uma lacuna de informação de mais de 10 anos.

ANEXO A - IMAGENS DAS ESPÉCIES REFERENTES AO CAPÍTULO I

As seguintes informações de cada espécie foram obtidas na Lista Vermelha (IUCN - <http://www.iucnredlist.org/>).

Nome da espécie: *Balaenoptera musculus*

Nome comum: Baleia azul

Distribuição: circum global



Foto: Mike Johnson / SeaPics.com

Nome da espécie: *Balaenoptera acutorostrata*

Nome comum: Baleia Minke

Distribuição: circum global



Foto: Tim Rock

Nome da espécie: *Physeter macrocephalus*

Nome comum: Cachalote

Distribuição: circum global



Foto: François Gohier/ Auscape International

Nome da espécie: *Phocoena phocoena*

Nome comum: Toninha-comum

Distribuição: Hemisfério Norte



Foto: Florian Graner/ naturepl.com

Nome da espécie: *Tursiops truncatus*

Nome comum: Golfinho-nariz-de-garrafa

Distribuição: circum global



Foto: Jeff Rotman / naturepl.com

Nome da espécie: *Sotalia guianensis*

Nome comum: Boto-cinza

Distribuição: Honduras até Sul do Brasil



Foto: Marcos Santos

Nome da espécie: *Peponocephala electra*

Nome comum: Golfinho-cabeça-de-melão

Distribuição: Águas marinhas tropicais e sub-tropicais (Circumtropical)



Foto: Doug Perrine / naturepl.com

ANEXO B - IMAGENS DAS ESPÉCIES REFERENTES AO CAPÍTULO II

As seguintes informações e imagens de cada espécie foram obtidas no Fishbase (<http://www.fishbase.org/>).

Nome da espécie: *Lutjanus purpureus*

Nome comum: pargo

Distribuição: Mar do Caribe até o nordeste do Brasil



Foto: JAMARC

Nome da espécie: *Lutjanus analis*

Nome comum: cioba

Distribuição: Massachusetts ao sudeste do Brasil



Foto: Baumeier, E.

Nome da espécie: *Lutjanus buccanella*

Nome comum: pargo-boca-preta ou saçupema

Distribuição: Carolina do Norte até o norte do Brasil.



Foto: Wiggers, R.

Nome da espécie: *Lutjanus cyanopterus*

Nome comum: caranha

Distribuição: Nova Escócia, Bermuda e na foz do rio Amazonas



Foto: Wiggers, R.

Nome da espécie: *Lutjanus jocu*

Nome comum: dentão

Distribuição: Massachusetts até São Paulo.



Foto: JAMARC

Nome da espécie: *Lutjanus synagris*

Nome comum: ariacó

Distribuição: EUA até o sudeste do Brasil



Foto: Flescher, D

Nome da espécie: *Lutjanus campechanus*

Nome comum: *red snapper*

Distribuição: Golfo do México a costa leste dos Estados Unidos



Foto: Flescher, D.

Nome da espécie: *Lutjanus vivanus*

Nome comum: olho-de-vidro

Distribuição: Carolina do Norte até São Paulo



Foto: Bryan, D.

Nome da espécie: *Lutjanus alexandrei*

Nome comum: baúna

Distribuição: Maranhão até Bahia



Foto: Pereira, P.H.C.

Nome da espécie: *Oreochromis niloticus*

Nome comum: tilápia

Distribuição: Ocorem naturalmente nos rios costeiros de Israel



Foto: Shaw, P.

Nome da espécie: *Ocyurys chrysurus*

Nome comum: guaiuba

Distribuição: Estados Unidos até o sudeste do Brasil.



Foto: Randall, J.E.

ANEXO C - IMAGENS DAS ESPÉCIES REFERENTES AO CAPÍTULO III

As seguintes informações de cada espécie foram obtidas na Lista Vermelha da IUCN (<http://www.iucnredlist.org/>). As fotos dos rostros à venda foram obtidas nos sites das lojas *online*, monitoradas pelo presente estudo.

Nome da espécie: *Pristis pectinata*

Nome comum: Peixe-serra-de-dentes-pequenos

Distribuição: Região da Flórida (EUA) e Honduras

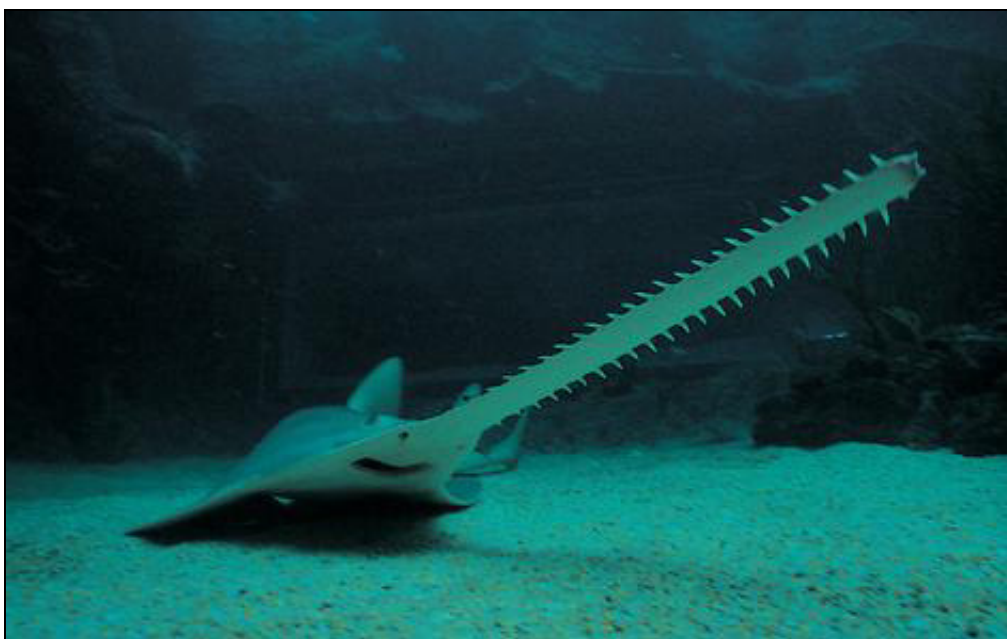


Foto: Sun International Resorts

Nome da espécie: *Pristis pristis*

Nome comum: Peixe-serra-comum

Distribuição: Austrália, África, Índia e Brasil (Circumtropical)



Foto: Andy Murch / Elasmodiver.com

Nome da espécie: *Pristis zijsron*

Nome comum: peixe-serra

Distribuição: Pacífico Indo-Oeste



Foto: Andy Murch / Elasmodiver.com

Nome da espécie: *Pristis clavata*

Nome comum: Peixe-serra-anão

Distribuição: Austrália

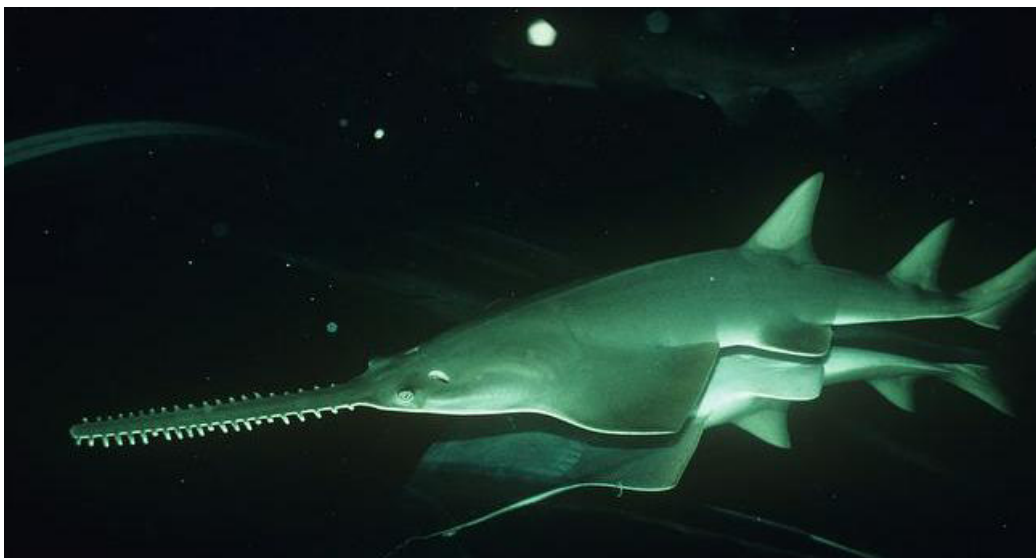


Foto: Rudie Kuitert / gettyimages.com

Nome da espécie: *Anoxypristis cuspidata*

Nome comum: Peixe-serra-dente-de-faca

Distribuição: Pacífico Indo-Oeste

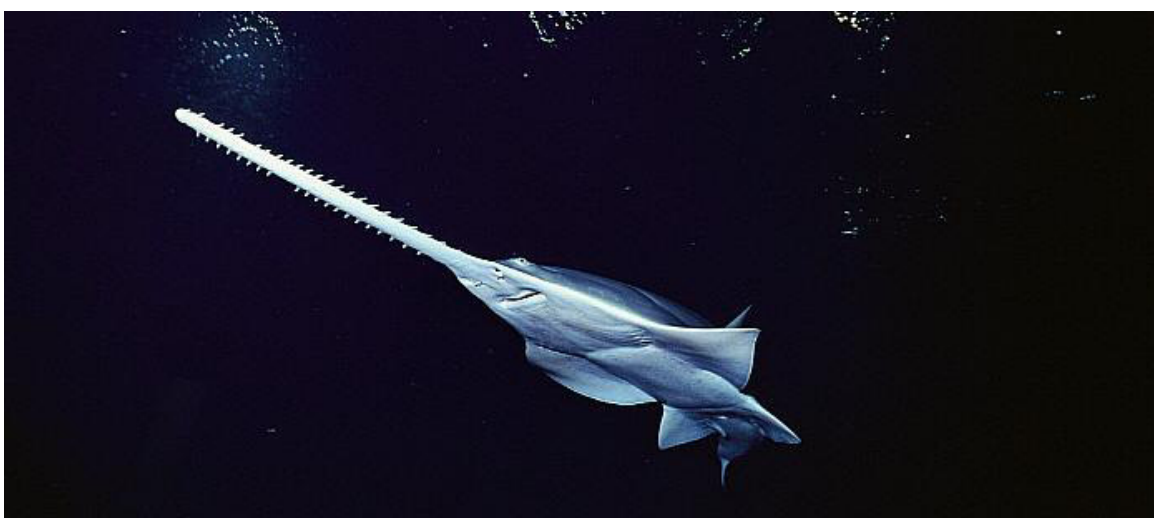
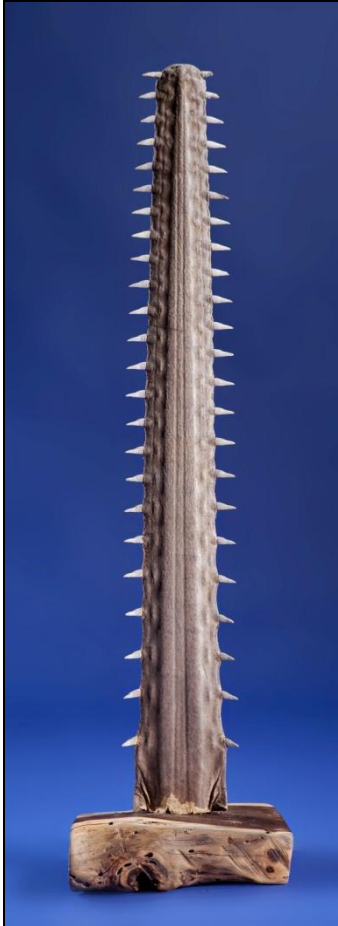


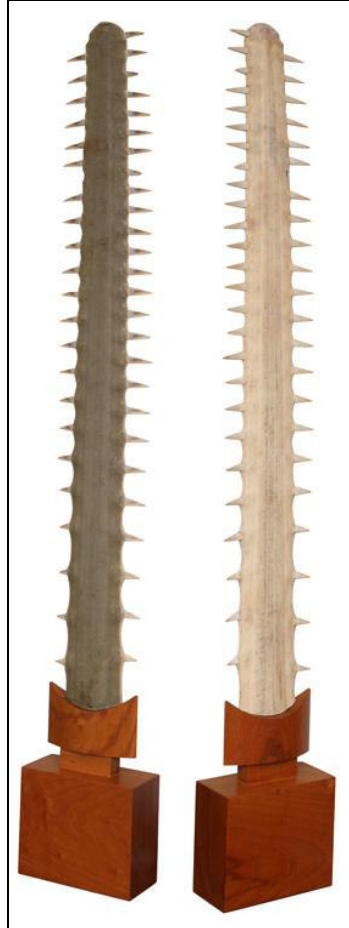
Foto: Norbert Wu / Minden Pictures

Rostros de peixe-serra à venda em lojas *online* como artigo/antiguidade de luxo para decoração:

eBay



1stdibs



Antiques reporter



ANEXO D - ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AO CAPÍTULO I

Molecular identification of cetaceans from the West Atlantic using the E3-I5 region of COI

L.H.O. Falcão¹, A.S. Campos², J.E.P. Freitas¹, M.A.A. Furtado-Neto³ and V.V. Faria²

¹Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Corresponding author: L.H.O. Falcão
E-mail: luarafalcao@gmail.com

Genet. Mol. Res. 16 (2): gmr16029607

Received January 12, 2017

Accepted March 28, 2017

Published April 20, 2017

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029607>

Copyright © 2017 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

ABSTRACT. Molecular identification is very useful in cases where morphology-based species identification is not possible. Examples for its application in cetaceans include the identification of carcasses of stranded animals in advanced state of decomposition and body parts that are illegally traded. One DNA region that is often used for molecular identification is the Folmer region of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) (locus 48 to 705 bp). This locus has been used for the identification of several animal species, including whales and dolphins. The goal of the present study was to evaluate the usefulness of another region of COI, the E3-I5 (locus 685 to locus 1179; 495 bp) as a marker for identification of cetaceans from northeastern Canada and northeastern Brazil. The identification markers were successfully obtained for seven cetacean species after performing percent identity and Basic Local Alignment Search Tool analyses. The obtained markers are now publicly available and are useful for the identification of the

endangered blue whale (*Balaenoptera musculus*), common minke whale (*B. acutorostrata*), vulnerable sperm whale (*Physeter macrocephalus*), harbor porpoise (*Phocoena phocoena*), common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*), and melon-headed whale (*Peponocephala electra*).

Key words: Species identification; Endangered species; Molecular marker; Whale; Dolphin

INTRODUCTION

Cetaceans comprise at least 92 whale and dolphin species that are globally distributed in marine and riverine environments (Perrin, 2017). Whales and dolphins have been the subject of several studies, including those related to their behavior (Rendell and Whitehead, 2001; Visser et al., 2016), strandings (Meirelles et al., 2009, 2010; Truchon et al., 2013), geographical range (Pompa et al., 2011; Attard et al., 2016; Di Tullio et al., 2016), conservation (Pompa et al., 2011), bycatch (Lewison et al., 2004), and taxonomy (Monteiro-Filho et al., 2002). Cetaceans have also been studied using molecular markers for delimitation of species (Cunha et al., 2005) and population lineages (Torres-Florez et al., 2014), molecular phylogeny (Leduc et al., 1999), and molecular identification through the use of molecular markers (Phipps et al., 1998; Dizon et al., 2000; Sholl et al., 2008; Amon et al., 2013).

Molecular markers are, in some cases, the only way to identify a cetacean species. This is the case, for example, of stranded carcasses, which can be difficult to identify by their morphological characters, depending on how degraded it is. Similarly, they are useful in situations when isolated parts of cetaceans are illegally traded. In all these cases, molecular markers have the potential for aiding the successful identification of species. These markers include, for example, the mitochondrial cytochrome b (Phipps et al., 1998; Dizon et al., 2000; Gravena et al., 2008; Sholl et al., 2008; Tsai et al., 2013; Cypriano-Souza et al., 2016), and the control region [(Dizon et al., 2000; Cypriano-Souza et al., 2016); however, see Dizon et al. (2000) for failure in identifying the species of *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus* complex using the control region].

Currently, the approach that is mostly used for molecular identification of animals is DNA barcoding. This method uses DNA sequences from the initial portion (the Folmer region; locus 48 to 705) of the cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene for species identification (Hebert et al., 2003). This method can be accessed through BOLD-Barcode of Life Data Systems (<http://www.boldsystems.org/>) - an online database that hosts COI sequences with certified species identification (Kochzius, 2009).

Despite the vast application of the DNA Barcode method for animal identification, focused on the Folmer region, this method is not universally efficient for cetaceans. This method has been efficient for identification of several cetacean species (Tsai et al., 2013; Chang et al., 2014; Cypriano-Souza et al., 2016). However, there have been cases in which the Folmer region was not useful for differentiating *Delphinus delphis*, *D. capensis*, *Stenella coeruleoalba*, *S. frontalis*, and *Tursiops truncatus*, all of which are species in the family Delphinidae, more specifically in the subfamily Delphininae (Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013). Therefore, researchers frequently use more than one gene region for species identification (Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013; Cypriano-Souza et al., 2016).

Given the fact that, eventually, it is necessary to use other molecular markers in addition to the Folmer region for cetacean identification, a continuous search for markers from different gene regions and species is warranted. It is in this context that we, herewith, provide markers of another region of COI for identification of seven cetacean species potentially involved in strandings and/or in the trade of isolated parts in the West Atlantic waters.

MATERIAL AND METHODS

Geographical location, species, and gene region

Partial COI sequences (495 bp) from the E3-I5 region (locus 685 to 1179) were obtained for seven cetacean species (Figure 1). The specimens were sampled between 1986 and 1996 along the coasts of Newfoundland (northeastern Canada) and Ceará State (northeastern Brazil) (Figure 2). The Canadian samples were collected from animals that were stranded on the beaches at Newfoundland coast and stored in the freezers of the Whale Research Group (WRG) at the Memorial University of Newfoundland (MUN) in St. John's. The Brazilian samples were also collected from animals stranded on beaches from Ceará State. They were stored in freezers of the Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará-GECC, at the Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR from Universidade Federal do Ceará, in Fortaleza.

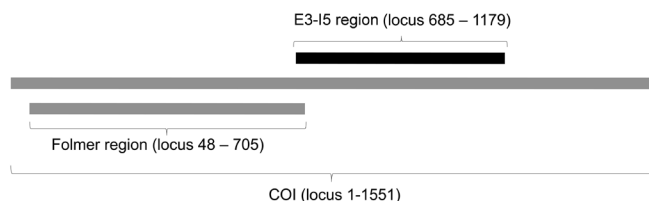


Figure 1. E3-I5 region of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene used as a molecular marker for identification of cetacean species potentially involved in strandings and/or in the trade of isolated parts in the West Atlantic waters (black bar, with identification of the loci). This region is in contrast to the full COI (larger grey bar) and to the Folmer region, traditionally used in DNA barcoding studies (smaller grey bar). See Lunt et al. (1996) for more details of the E3-I5 region.

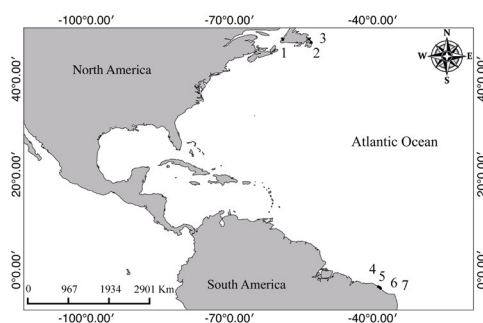


Figure 2. Map showing the six localities (black dots) from where the seven cetacean species (numbers 1 to 7) were sampled. Three species sampled from Newfoundland, Canada were: 1) *Balaenoptera musculus*, St. George's Bay; 2) *B. acutorostrata*, Portugal Cove-St. Philip's; and 3) *Phocoena phocoena*, Trinity Bay. The remaining four species sampled along the coast of Ceará State, northeastern Brazil were: 4) *Physeter macrocephalus*, Aquiraz; 5) *Peponocephala electra*, São Gonçalo do Amarante; 6) *Sotalia guianensis*, Fortaleza; and 7) *Tursiops truncatus*, Fortaleza.

Laboratory procedures

The DNA was extracted with chloroform:isoamyl alcohol (24:1), precipitated with isopropanol, washed with 75% ethanol, and resuspended in 50 μ L distilled water. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify 495 base pairs (bp) of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (COI) using the following primers (Integrated DNA Technologies, Inc): COI-F 5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3' and COI-R 5'-CCAGAGATTAGAGGGGAATCAGTG-3' (Kessing et al., 1989). The amplification reaction was performed in 100 μ L solution containing 1.96 mM MgCl₂, 67 mM Tris-HCl, pH 9.0, 9.94 mM β -mercaptoethanol, 0.2 mM each dNTP, 2 μ L isolated DNA, 0.4 μ L each primer, 1-3 U *AmpliTaq*TM DNA Polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Mississauga, ON, Canada). The amplification conditions were as follows: 5 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 93°C, 1 min at 40°C, and 30 s at 55°C, and 2 min at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C. The electrophoresis of the 5 μ L PCR product mixed with 1 μ L dye was performed on 2% agarose gel in 1 M TBE buffer. The purification of PCR products was performed using WizardTM Magic PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., Madison, WI, USA), following the manufacturer instructions. The forward and reverse strands were sequenced on an Automated DNA Sequencer ABI373A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA).

Molecular identification: BLAST

The sequences were checked for their potential as markers for species identification. Each sequence was analyzed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990) available on the website of the National Center for Biotechnology Information - NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). More specifically, the sequences were assessed using BLASTn analysis and Megablast. BLASTn is most appropriate for short input queries, for the identification of short matches, and for cross-species search, whereas Megablast is most appropriate for sequence identification and intra-species comparison (NCBI, 2016). Both analyses were performed using the default parameters and gave the same results. Only the matches with E-value of 0.0 were considered, because they imply an almost zero probability of the alignment occurring by chance. This procedure worked as expected for six out of the seven E3-I5 COI sequences obtained; the *S. guianensis* sequence did not produce any BLASTn or Megablast output. This led us to perform an alternative crosscheck of the obtained *S. guianensis* DNA sequence as detailed below.

Preparation for percent identity analysis: Checking the identity of *Sotalia guianensis* complete mitochondrial sequences available in GenBank

The BLASTn and Megablast trials did not produce any output for *S. guianensis* because of the absence of homologous sequences for this species/genus available for BLAST analysis in GenBank. This was unexpected because GenBank does have a total of six complete mitochondrial genome sequences of *S. guianensis* (GenBank accession Nos. JF681039 and KM893424) and its congener *S. fluviatilis* (GenBank accession Nos. JF681040, KM893423, KM893421, and KM893422). The reason for this unavailability of *Sotalia* sequences for BLAST analysis is that these sequences are currently designated as 'unverified' in GenBank.

To help confirm the identity of the 'unverified' complete mitochondrial genome sequences

of *S. guianensis* and *S. fluviatilis*, we performed a phylogenetic analysis using the mitochondrial cytochrome *b* gene, which is also available in GenBank. The idea behind this procedure was that if the identity of each ‘unverified’ mitochondrial genome sequences was confirmed, we would have a species-certified COI gene region available for comparison. This would then permit us to test whether the E3-15 COI sequence used in the present study could correctly assign the species. For instance, having a certified *S. guianensis* COI sequence, a percent identity analysis could serve as an immediate alternative to the unavailable BLAST analysis.

The aforementioned phylogenetic analysis based on *cyt b* was then performed as follows. First, we built a 365-bp dataset including the six ‘unverified’ complete mitochondrial sequences and all the other sequences available in GenBank for *S. guianensis* and *S. fluviatilis*. These included *S. guianensis* DQ086827 and *S. fluviatilis* DQ086828 sequences (i.e., the ones included in the analysis that revealed that the marine and riverine ecotypes of *Sotalia* are different species; Cunha et al., 2005). Our analysis also included one sequence from the northeastern coast of Brazil (*S. guianensis*, GenBank accession No. KJ879244) and another from the Amazon (*S. fluviatilis*, GenBank accession No. KJ879249) (Falcão et al., 2014). Finally, the sequences of *T. truncatus* and *Steno bredanensis* were included as outgroups for the analysis.

The *cyt b* sequences were aligned in Geneious 7.1.5 using MAFFT v7 (Kato et al., 2002). The crosschecking revealed that four of the six ‘unverified’ sequences (GenBank accession Nos. KM893424, KM893423, KM893421, and KM893422) had unexpected stop codons along the sequence. These were excluded from the alignment. The two remaining ‘unverified’ sequences were *S. guianensis* JF681039 and *S. fluviatilis* JF681040.

After finalizing the alignment, we selected the most appropriated model of evolution using jModelTest 2 (Guindon and Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012), following a Bayesian selection criteria. The analysis suggested Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) as the most appropriate model. A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic analysis was then performed on PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), which is also implemented in Geneious. Finally, the identity of each of the two ‘unverified’ sequences, *S. guianensis* JF681039 and *S. fluviatilis* JF681040, was confirmed (Figure 3).

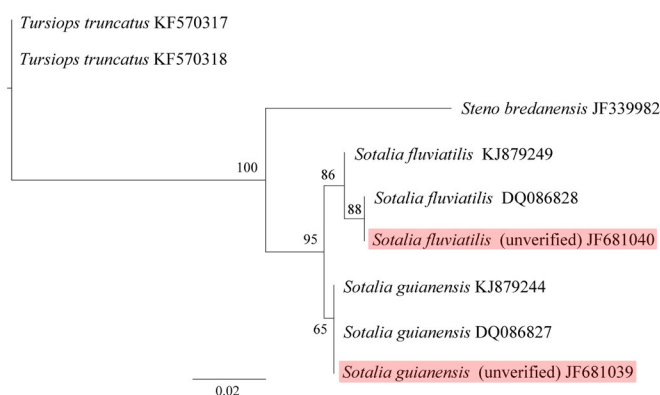


Figure 3. Verification of the identity of GenBank’s ‘unverified’ complete mitochondrial DNA sequences for *Sotalia guianensis* JF681039 and *Sotalia fluviatilis* JF681040. The Maximum Likelihood tree based on the partial cytochrome *b* sequences shows that these ‘unverified’ sequences have, in fact, correct identities. The respective GenBank accession No. for each sequence is provided. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Molecular identification: percent identity analysis of COI

Once the identity of each ‘unverified’ complete mitochondrial DNA sequence was confirmed by the *cyt b* analysis, we built a 495 bp COI dataset. This COI dataset included the seven sequences from the E3-I5 region obtained in the present study and nine homologous sequences available in GenBank. The DNA sequences obtained from GenBank were: *B. musculus* (X72204), *B. acutorostrata* (GenBank accession No. AP006468), *P. macrocephalus* (GenBank accession No. KC312603), *P. phocoena* (GenBank accession No. AJ554063), *P. electra* (GenBank accession No. JF289176), *S. guianensis* (GenBank accession No. JF681039), *T. truncatus* (GenBank accession No. FJ590428), *Hippopotamus amphibius* (GenBank accession No. AP003425), and *S. fluviatilis* (GenBank accession No. JF681040). This COI dataset was then submitted to ML analysis. This was done in order to obtain percent identity values, which in turn were crosschecked with the percent identity values obtained after BLAST analyses. The same methodology as described above for the *Cyt b* ML analysis was followed for this COI ML analysis, except for the model of evolution. The model of evolution adopted for the COI dataset was the HKY+G (gamma = 0.163).

RESULTS

The E3-I5 region of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences obtained from all the seven species showed high percent identity with the DNA sequence(s) available in GenBank for their respective species. For the six species that were available for BLAST analysis in GenBank, BLAST and the percent identity (based on maximum likelihood analysis) values varied between 99 and 100% (Table 1). As for the only species that was unavailable for BLAST, *Sotalia guianensis*, the percent identity value obtained was 99% (Table 1) (See Figure 4 for a maximum likelihood tree including all seven studied cetacean species displaying clades of conspecific sequences and showing a match between present study and GenBank sequences).

Table 1. Percent identity values between sequences of the E3-I5 region of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene obtained in the present study for cetaceans from Canada and Brazil (West Atlantic) and a DNA sequence from its respective congener available in the online database GenBank. BLAST scores for each comparison had E-value = 0. Percent identity values were obtained after BLAST and Maximum Likelihood (ML) analyses.

Species (GenBank accession No.: present study/GenBank)	Percent identity-BLAST	Percent identity-ML
Balaenopteridae		
<i>Balaenoptera musculus</i> KX079489/ X72204.1	99%	99%
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> KX079490/AP006468.1	99%	99%
Physeteridae		
<i>Physeter microcephalus</i> KX079491/ KC312603	100%	99%
Phocoenidae		
<i>Phocoena phocoena</i> KX079493/AJ554063.1	99%	99%
Delphinidae		
<i>Peponocephala electra</i> KX079494/JF289176.1	99%	99%
<i>Tursiops truncatus</i> KX079496/FJ590428.1	99%	99%
<i>Sotalia guianensis</i> KX079497/JF681039*	N/A	99%

*The JF681039 sequence is not available for BLAST analysis in GenBank due to its status as ‘unverified’.

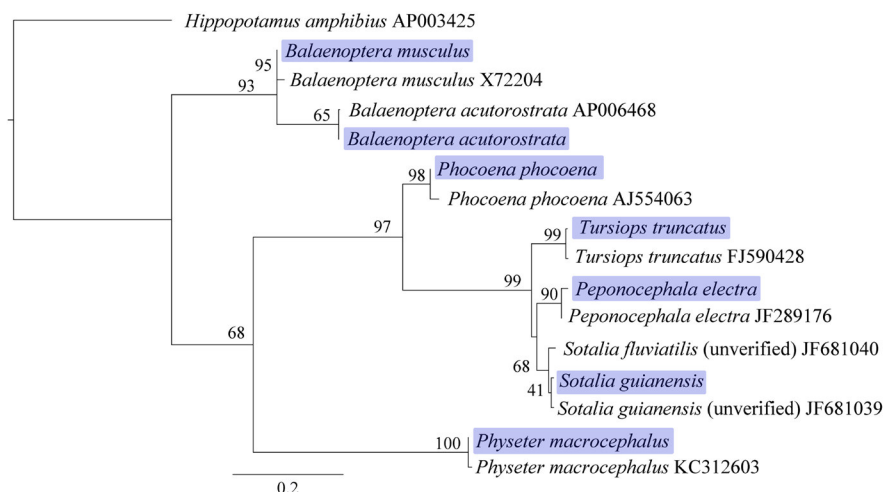


Figure 4. Clades of conspecific sequences for the seven studied cetacean species showing a match between present study (highlighted in purple) and GenBank sequences. Maximum likelihood tree based on an I3-E5 region of the mitochondrial COI gene. The tree output obtained on Geneious was edited using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

DISCUSSION

Here we provide markers that are suitable for molecular identification of seven species of whales and dolphins that occur in West Atlantic waters. The efficiency of this identification was confirmed through the BLAST analysis and the values of percent identity. One of these markers is useful for the identification of the largest animal on Earth (Attard et al., 2016): the blue whale, *B. musculus*. This species is distributed globally and is considered an endangered species (Reilly et al., 2008).

The markers here proposed are potentially useful in a hot spot of cetacean strandings. This is because the State of Ceará, from where four of our samples were collected, is well known for cetacean strandings. For instance, a carcass of the Omura's whale, *B. omurai*, stranded in Ceará was recently identified with the aid of molecular tools (Cypriano-Souza et al., 2016). Still, the present study provides the first COI sequence to be available for BLAST analysis in GenBank for the most stranded species along the coast of Ceará, *S. guianensis* (Meirelles et al., 2010). In addition, at least two other species for which markers were developed in the present study, namely *T. truncatus* and *P. electra*, are also known to strand along the coast of Ceará (Meirelles et al., 2009). Also Canada, from where three of our samples were collected, is known for cetacean strandings (Carr et al., 2002).

In addition to carcass identification, the markers generated here are also potentially useful for monitoring the trade of the isolated parts of dolphins and whales. The capture or trade of any dolphin or whale species is illegal in Brazil (Law 7.643, December 1987). However, in spite of this law, dolphins are incidentally captured and used for consumption or as bait in Ceará (Meirelles et al., 2009), Bahia (Barbosa-Filho et al., 2016), and Rio de Janeiro (Di Benedetto et al., 2001). In addition, dolphin genitalia are sold as love charms in Amazonas and Pará (Sholl et al., 2008).

Due to these illegal uses and trade of dolphin parts, the need for identification of the stranded cetaceans, both in Canada (Truchon et al., 2013) and Brazil (Meirelles et al., 2009, 2010), and the need for conservation of these animals (Pompa et al., 2011), molecular tools for precise species identification of these animals are critical. The present study helps to fill in this immediate demand by providing an additional region of the COI gene - the E3-I5 region (loci 685 to 1179) - as a marker for molecular identification of seven species of whales and dolphins that occur in West Atlantic waters. The empirical evidence of the efficiency of these markers is supported by the congruence among all the analyses performed, which included BLAST and percent identity.

Species in the Delphininae subfamily have been through recent and rapid processes of speciation and potential hybridization (Amaral et al., 2012). Not surprisingly, it is difficult to successfully apply molecular markers for identification of Delphininae, especially between those from the genera *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus* (Dizon et al., 2000, Amaral et al., 2007; Viricel and Rosel, 2012; Alfonsi et al., 2013). Due to this, the use of multiple mitochondrial regions or the development of new markers for identification of Delphininae species has been proposed (Viricel and Rosel, 2012). The marker here proposed for the common bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, may suggest the use of the I3-E5 region of COI in studies targeting multiple DNA regions of Delphininae species. Nevertheless, further sequencing of this region of COI is suggested in order to assess its potential towards molecular identification of closely related species of the genera *Stenella*, *Tursiops*, and *Delphinus*.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

M.A.A. Furtado-Neto is grateful to S.M. Carr for guidance during his doctoral studies at the Memorial University of Newfoundland, which was completed under a fellowship granted by the Canadian International Development Agency–CIDA. The authors are grateful to A.C.O. de Meirelles (Aquasis), R. Maggioni (UFC), and an anonymous reviewer for invaluable suggestions on the manuscript. We are grateful to Aspen Padilla for language review. Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP provided a Master in Science fellowship to L.H.O. Falcão; Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico-CNPq provided a Scientific Initiation fellowship to A.S. Campos (Programa PIBIC); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES provided a postdoctoral fellowship to J.E.P. Freitas (Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD).

REFERENCES

- Alfonsi E, Méheust E, Fuchs S, Carpentier FG, et al. (2013). The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *ZooKeys* 365: 5-24. <http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.365.5873>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amaral AR, Jackson JA, Möller LM, Beheregaray LB, et al. (2012). Species tree of a recent radiation: the subfamily Delphininae (Cetacea, Mammalia). *Mol. Phylogenet. Evol.* 64: 243-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.04.004>

- Amaral AR, Sequeira M and Coelho MM (2007). A first approach to the usefulness of cytochrome *c* oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species. *Mar. Freshw. Res.* 58: 505-510. <http://dx.doi.org/10.1071/MF07050>
- Amon JD, Glover AG, Wiklund H, Marsh L, et al. (2013). The discovery of a natural whale fall in the Antarctic deep sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 92: 87-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.01.028>
- Attard CR, Beheregaray LB and Möller LM (2016). Towards population-level conservation in the critically endangered Antarctic blue whale: the number and distribution of their populations. *Sci. Rep.* 6: 22291. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22291>
- Barbosa-Filho MLV, Costa-Neto EM and Danilewicz D (2016). Dolphin harpooning off the coast of Bahia, Brazil. *Mar. Biodivers. Rec.* 9: 42. <http://dx.doi.org/10.1186/s41200-016-0046-1>
- Carr SM, Marshall HD, Johnstone KA, Pynn LM, et al. (2002). How to tell a sea monster: molecular discrimination of large marine animals of the North Atlantic. *Biol. Bull.* 202: 1-5. <http://dx.doi.org/10.2307/1543217>
- Chang CH, Yao CJ, Yu HY, Liao YC, et al. (2014). A molecular forensic method for identifying species composition of processed marine mammal meats. *J. Forensic Leg. Med.* 23: 65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2014.01.012>
- Cunha HA, da Silva VMF, Lailson-Brito J, Jr., Santos MCO, et al. (2005). Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Mar. Biol.* 148: 449-457. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-005-0078-2>
- Cypriano-Souza AL, Meirelles ACO and Carvalho VL (2016). Rare or cryptic? The first report of an Omura's whale (*Balaenoptera omurai*) in the South Atlantic Ocean. *Mar. Mamm. Sci.* 33: 80-95. <http://dx.doi.org/10.1111/mms.12348>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9: 772. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Di Benedetto AP, Ramos RMA and Lima NRW (2001). Os golfinhos: origem, classificação, captura acidental, hábito alimentar. Cinco Continentes Editora, Porto Alegre.
- Di Tullio JC, Gandra TB, Zerbini AN and Secchi ER (2016). Diversity and distribution patterns of cetaceans in the subtropical southwestern Atlantic outer continental shelf and slope. *PLoS One* 11: e0155841. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155841>
- Dizon A, Baker CS, Cipriano F, Lento G, et al. (2000). Molecular genetic identification of whales, dolphins and porpoises: proceedings of a workshop on the forensic use of molecular techniques to identify wildlife products in the market place. NOAA Technical Memorandum NMFS NOAA-TM-NMFS-SWFSC- 286, 2000. (National Oceanic and Atmospheric Administration: La Jolla, CA.).
- Falcão LH, Furtado-Neto MA, Maggioni R and Faria VV (2014). Prospective molecular markers for the identification of illegally traded angelsharks (*Squatina*) and dolphin (*Sotalia guianensis*). *Genet. Mol. Res.* 13: 9710-9717. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.November.24.2>
- Gravena W, Hrbek T, Silva VMF and Farias IP (2008). Amazon River dolphin love fetishes: from folklore to molecular forensics. *Mar. Mamm. Sci.* 24: 969-978.
- Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and de Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *P. Roy. Soc. B.- Biol. Sci.* 270: 313-321. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30: 3059-3066. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kessing B, Croom AM, McIntosh C, Memillan OW, et al. (1989). The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, HI.
- Kochzius M (2009). Trends in fishery genetics. In: The Future of Fisheries Science in North America (Beamish RJ and Rothschild BJ, eds.). *Fish Fisheries Series* 31: 453-493, Springer Netherlands.
- Leduc GR, Perrin WF and Dizon AE (1999). Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome *b* sequences. *Mar. Mamm. Sci.* 15: 619-648. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00833.x>
- Lewis RL, Crowder LB, Read AJ and Freeman SA (2004). Understanding impacts of fisheries bycatch on marine megafauna. *Trends Ecol. Evol.* 19: 598-604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2004.09.004>
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM and Hewitt GM (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153-165. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00049.x>
- Meirelles ACO, Monteiro-Neto C, Martins AMA, Costa AF, et al. (2009). Cetacean strandings on the coast of Ceará, northeastern Brazil (1992–2005). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 89: 1083-1090. <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315409002215>
- Meirelles ACO, Ribeiro AC, Silva CPN and Soares Filho AA (2010). Records of guiana dolphin, *Sotalia guianensis*, in the state of Ceará, northeastern Brazil. *LAJAM* 8: 97-102. <http://dx.doi.org/10.5597/lajam00157>
- Monteiro-Filho ELA, Monteiro LR and Reis SF (2002). Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: A morphometric tridimensional analysis. *J. Mammal.* 83: 125-134. [Genetics and Molecular Research 16 \(2\): gmr16029607](http://dx.doi.org/10.1644/1545-</p></div><div data-bbox=)

- [1542\(2002\)083<0125:SSASDI>2.0.CO;2](#)
- NCBI (2016) BLAST homepage & search pages. NCBI Handout Series. Available at [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf]. Last updated on March 18, 2016.
- Perrin WF (2017). World Cetacea Database. Available at [http://www.marinespecies.org/cetacea]. Accessed August 8, 2016.
- Phipps M, Ishihara A, Kanda N and Suzuki H (1998). A preliminary report on DNA sequence analysis of whale meat and whale meat products collected in Japan. *TRAFFIC Bull.* 17: 91-94.
- Pompa S, Ehrlich PR and Ceballos G (2011). Global distribution and conservation of marine mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 13600-13605. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1101525108>
- Reilly SB, Bannister JL, Best PB, Brown M, et al. (2008). *Balaenoptera musculus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. e.T2477A9447146. Available at: [http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T2477A9447146.en.].
- Rendell L and Whitehead H (2001). Culture in whales and dolphins. *Behav. Brain Sci.* 24: 309-324, discussion 324-382. <http://dx.doi.org/10.1017/S0140525X0100396X>
- Sholl TGC, Nascimento FF, Leoncini O, Bonvicino CR, et al. (2008). Taxonomic identification of dolphin love charms commercialized in the Amazonian region through the analysis of cytochrome *b* DNA. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 88: 1207-1210. <http://dx.doi.org/10.1017/S002531540800043X>
- Torres-Florez JP, Hucke-Gaete R, LeDuc R, Lang A, et al. (2014). Blue whale population structure along the eastern South Pacific Ocean: evidence of more than one population. *Mol. Ecol.* 23: 5998-6010. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12990>
- Truchon MH, Measures L, L'Hérault V, Brêthes JC, et al. (2013). Marine mammal strandings and environmental changes: a 15-year study in the St. Lawrence ecosystem. *PLoS One* 8: e59311. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059311>
- Tsai LC, Lee JC, Shen LL and Hsieh HM (2013). Identification of the seized meats products for suspected Cetacea. *Forensic Sci. J.* 12: 9-14.
- Viricel A and Rosel PE (2012). Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Mar. Mamm. Sci.* 28: 37-62. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.2010.00460.x>
- Visser F, Curé C, Kvadsheim PH, Lam FPA, et al. (2016). Disturbance-specific social responses in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *Sci. Rep.* 6: 28641. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28641>