



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



Programa de Pós-Graduação - Mestrado
Recursos Aquáticos e Pesca

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CECEN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA -
PPGRAG**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS BIVALVES DA FAMÍLIA VENERIDAE
Rafinesque, 1815 (MOLLUSCA, BIVALVIA) NA ZONA COSTEIRA AMAZÔNICA
(ILHA DE UPAON-AÇU, MARANHÃO, BRASIL).**

São Luís – 2021

Ana Karolina Ribeiro Sousa

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS BIVALVES DA FAMÍLIA VENERIDAE
Rafinesque, 1815 (MOLLUSCA, BIVALVIA) NA ZONA COSTEIRA AMAZÔNICA
(ILHA DE UPAON-AÇU, MARANHÃO, BRASIL).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

Co-orientador: Prof. Dr. Icaro Gomes Antonio

São Luís – 2021

Sousa, Ana Karolina Ribeiro.

Identificação molecular dos bivalves da Família Veneridae, Rafinesque, 1815 (Mollusca, Bivalvia) na Zona Costeira Amazônica (Ilha de Upaon-Açu, Maranhão, Brasil) / Ana Karolina Ribeiro Sousa. – São Luís, 2021.

44 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

Ana Karolina Ribeiro Sousa

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS BIVALVES DA FAMÍLIA VENERIDAE
Rafinesque, 1815 (MOLLUSCA, BIVALVIA) NA ZONA COSTEIRA AMAZÔNICA
(ILHA DE UPAON-AÇU, MARANHÃO, BRASIL).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Profa. Dra. Veronica Maria de Oliveira
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
2º Examinador

Profa. Dra. Maria Claudene Barros
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
3º Examinador

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a benção de realizar mais uma etapa importante da minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr. Elmary da Costa Fraga, pela orientação competente e paciente, apontando caminhos para o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pelos ensinamentos, por todo apoio e pela disponibilidade.

Ao Professor Ícaro Gomes Antonio, que sempre acompanhou minha vida acadêmica, apresentando o estudo dos moluscos como questão de pesquisa relevante na engenharia de pesca.

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Recursos Aquáticos e Pesca por todos os ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científica do Maranhão - FAPEMA pela concessão de bolsa.

Aos meus familiares, por me apoiarem incondicionalmente nesse momento e sempre, principalmente a minha mãe Irenilde Silva Ribeiro e minha irmã Ana Claudia Ribeiro Muniz Viégas.

Ao grupo do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos – FISIOMAR, pela ajuda de sempre.

Ao grupo do laboratório de Genética e Biologia Molecular - GENBIMOL, pela ajuda fundamental na construção do trabalho.

Aos amigos que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida.

Aos amigos de mestrados, minha turma querida, obrigada pela parceria. Em especial Aleff Paixão França.

À todos que contribuíram direta e indiretamente, muito obrigada.

“In every life we have some trouble but when you worry, you make it double. Don't worry, be happy.”

(Bobby McFerrin)

Lista de Figuras

Figura 1. Conchas das espécies de Veneridae.....	15
Figura 2. Mapa de Setorização da Zona Costeira do Estado do Maranhão (ZCEM): 1=Golfão maranhense, 2= Litoral oriental, 3= Litoral ocidental 4= Baixada maranhense, 5=Parcel Manuel Luís.....	20
Figura 3. Composição de nucleotídeos baseada em sequências do gene COI dos sarnambis <i>Tivela</i> sp, <i>Anomalocardia flexuosa</i> e <i>Leukoma</i> sp.....	24
Figura 4. Árvore filogenética de haplótipos utilizando o método de Neighbor-Joining e algoritmo Kimura-2-parâmetros, baseada em sequências do gene COI em sarnambis das espécies <i>Anomalocardia flexuosa</i> , <i>Leukoma</i> sp e <i>Tivela</i> sp. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). (SAR = Raposa, SAO = São Luis SAA = São José de Ribamar, SAP = Paço do Lumiar e GB = Genbank)	29

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de amostras de Veneridae obtidas por ponto de coleta entre outubro de 2018 e julho de 2019 na zona costeira amazônica.....	20
Tabela 2: Diversidade molecular de <i>Anomalocardia flexuosa</i> , <i>Leukoma</i> sp e <i>Tivela</i> sp...	25
Tabela 3: Percentual de similaridade genética obtida por comparações de sequências no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para os sarnambis <i>Tivela</i> sp, <i>Leukoma</i> sp e <i>Anomalocardia</i> sp (<i>sn</i> – sinonímia de <i>Anomalocardia flexuosa</i>).....	26
Tabela 4: Divergência genética (K2P) intra e interespecífica dos sarnambis <i>Anomalocardia flexuosa</i> (A), <i>Leukoma</i> sp (B) e <i>Tivela</i> sp (C).....	27
Tabela 5: Matriz de distância genética (K2P) entre as espécies de sarnambi obtidas a partir de sequências do gene COI (SAR = Raposa, SAO = São Luis SAA = São José de Ribamar, SAP = Paço do Lumiar e GB = Genbank).....	28

RESUMO

No Brasil 40 espécies da família Veneridae são conhecidas popularmente como marisco, bergigão, vôngole, maçanim, chumbinho e sarnambi. A identificação destes táxons baseado apenas em caracteres morfológicos tem gerado incertezas taxonômicas. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo identificar molecularmente as espécies de sarnambi encontradas na zona costeira amazônica. Foi aplicada a metodologia DNA *Barcoding*, na qual utiliza-se um fragmento do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI). As amostras foram obtidas durante o período de 2018-2019 em áreas de praia e mangue nos quatro municípios da Ilha de Upaon-Açu, Maranhão, sendo registrados e identificados morfológicamente. O DNA foi isolado usando-se o protocolo kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega. O isolamento e amplificação do gene foram realizados através da PCR utilizando-se *primers* universais. Os produtos das PCRs foram sequenciados e a análise dos dados foi realizada em softwares específicos. No sequenciamento de 48 amostras foram obtidos fragmentos do gene COI para *Anomalocardia flexuosa* com 656 pb, *Tivela* sp com 647pb e 653pb para *Leukoma* sp. As médias de divergências genéticas intraespecíficas mostraram valores de 0,63% para *A. flexuosa*, 0,65% para *Tivela* sp. e 0,16% para *Leukoma* sp. A árvore filogenética agrupou as três espécies em clados diferentes e fortemente suportados com 100% de bootstrap. Os percentuais de divergência apresentaram valores altos e similaridade inferior a 96% no comparativo entre *Tivela* sp. e *Tivela mactroides*, espécie mais próxima disponível no BOLDSYSTEMS e apesar de pertencerem ao mesmo clado exibem uma diferenciação maior que 4,5%, indicando a ocorrência de uma nova espécie, por apresentar diferenças morfológicas e distância genética da espécie *T. mactroides*. O DNA *barcoding* confirmou quanto à identificação do sarnambi *A. flexuosa* em sinonímia com *Anomalocardia brasiliiana*. A espécie *Leukoma* sp foi identificada molecularmente até nível de gênero, devido a carência de dados para esse táxon na plataforma. No entanto, suas características morfológicas apontam para *Leukoma pectorina*. Sequência do gene COI dessa espécie ainda não foi incluída na plataforma BOLDSYSTEMS, sendo este estudo pioneiro na caracterização molecular deste táxon. Portanto nossa abordagem com DNA *barcoding* mostrou-se eficiente e evidenciou a ocorrência de uma nova espécie para o gênero *Tivela*.

Palavras-chave: Sarnambi, DNA *barcoding*, Morfologia, Maranhão.

ABSTRACT

In Brazil, 40 species of the Veneridae family are popularly known as seafood, bergigão, congole, maçanim, chumbinho and sarnambi. The identification of these taxa based only on morphological characters has generated taxonomic uncertainties. In this sense, the present work aimed to molecularly identify the species of sarnambi found in the coastal zone of the Amazon. The DNA Barcoding methodology was applied, in which a fragment of the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene is used. The samples were obtained during the period 2018-2019 in areas of beach and mangrove in the four municipalities of the Island of Upaon-Açu, Maranhão, being registered and identified morphologically. DNA was isolated using Promega's Wizard Genomic DNA Purification protocol kit. The isolation and amplification of the gene were performed through PCR using universal primers. The PCR products were sequenced and data analysis was performed using specific software. In the sequencing of 48 samples, fragments of the COI gene were obtained for *Anomalocardia flexuosa* with 656 bp, *Tivela* sp with 647 bp and 653 bp for *Leukoma* sp. The means of intraspecific genetic divergences showed values of 0.63% for *A. flexuosa*, 0.65% for *Tivela* sp. and 0.16% for *Leukoma* sp. The phylogenetic tree grouped the three species in different clades and strongly supported with 100% bootstrap. The divergence percentages showed high values and similarity below 96% in the comparison between *Tivela* sp. and *Tivela mactroides*, the closest species available in BOLDSYSTEMS and although they belong to the same clade, they show a differentiation greater than 4.5%, indicating the existence of a new species, for presenting morphological differences and genetic distance of the species *T. mactroides*. DNA barcoding confirmed the identification of the *A. flexuosa* sarnambi in synonymy with *Anomalocardia brasiliiana*. The species *Leukoma* sp was identified molecularly down to the genus level, due to the lack of data for this taxon on the platform. However, its morphological characteristics point to *Leukoma pectorina*. The sequence of the COI gene of this species has not yet been included in the BOLDSYSTEMS platform, and this study is a pioneer in the molecular characterization of this taxon. Therefore, our approach with DNA barcoding proved to be efficient and showed the occurrence of a new species for the genus *Tivela*.

Keywords: Sarnambi, DNA barcoding, Morphology, Maranhão.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVO GERAL	13
2.1.	Objetivos específicos	13
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1.	Classificação Taxonômica da família Veneridae	14
3.1.1.	Gênero <i>Anomalocardia</i> Schumacher, 1817.....	15
3.1.2.	Gênero <i>Leukoma</i> E. Römer, 1857.....	15
3.1.3.	Gênero <i>Tivela</i> Link, 1807	16
3.2.	DNA <i>barcoding</i>	16
4.	METODOLOGIA.....	18
4.1.	Caracterização da área de estudo.....	18
4.2.	Material Biológico	19
4.3.	Identificação molecular	20
4.3.1.	Extração do DNA.....	20
4.3.2.	Amplificação do gene COI por PCR.....	20
4.3.3.	Sequenciamento do DNA	21
4.4.	Análise de Dados	21
5.	RESULTADOS	23
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

A família Veneridae pertencente ao grupo Mollusca é composta por bivalves cosmopolitas, típicos de águas rasas, infaunais e filtradores (RIOS, 1994; DENADAI et al., 2006; MIKKELSEN et al., 2006; HUBER, 2010; CHEN et al., 2011; ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015). É representada por doze subfamílias e 50 gêneros, que reúnem aproximadamente 500 espécies vivas. Essa diversidade de espécies está associada à grande variedade de habitats, como praias arenosas e enlameadas, manguezais e fundos arenosos em ambientes de corais (CANTERA, 1991; CANAPA et al., 1996; DENADAI et al., 2006). No Brasil, foram registradas 40 espécies de Veneridae, pertencentes a sete subfamílias e a 25 gêneros (ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015).

Ao longo dos anos, estudos vêm sendo realizado para elucidar as dúvidas taxômicas dos Veneridae (CANAPA et al., 1996; KAPPNER e BIELER, 2006; MIKKELSEN et al., 2006; HUBER, 2010; CHEN et al., 2011; BIELER et al., 2013; BIELER et al., 2014; ROCHA, 2016), entretanto existem áreas no Brasil pouco exploradas (ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015). As principais características diagnósticas desses organismos estão presentes na charneira das conchas dos venerídeos, como: a variedade de tamanhos, forma e posição dos dentes cardinais, presença e forma dos dentes laterais anteriores, e ninfa (DENADAI et al., 2006).

A diversidade morfológica e ecológica dessa família é grande, devido às relações sistemáticas dos organismos não são completamente definidas (NEVESSKAJA, 2009). Algumas questões como sinonímia, presença de linhagens paralelas e táxons novos ao longo dos estudos acabam tornando desafiador à construção de uma sistemática baseada na evolução do grupo (NEVESSKAJA, 2009; HUBER, 2010; BIELER et al., 2013). Considerando que as características morfológicas e ecológicas não são claras para identificação taxômica, os caracteres genéticos podem fornecer indicadores precisos para identificar um organismo (WILSON et al., 1985).

Em estudo realizado no Maranhão, Mattews et al., (1977) identificaram morfologicamente quatro espécies de venerídeos dos gêneros: *Anomalocardia*, *Chione*, *Tivela* e *Pitar*. Essas espécies são conhecidas popularmente no Brasil por diversos nomes, tais como marisco, bergigão, vôngole, maçanim e chumbinho (BOEHS et al., 2008; LUZ e BOEHS, 2011), variando de acordo com cada região do país, no litoral amazônico são conhecidas como sarnambi (MONTELES et al., 2010; FIGUEREDO, 2014).

A exploração dos Veneridae nas praias, mangue e/ou bancos de mariscagem é comum nas diferentes regiões do Brasil (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014; SILVA, 2015;

ANTONIO et al., 2019; FUNO et al., 2019). Essa atividade vem sendo de grande importância para comunidades de pescadores que comercializam esse recurso com o intuito de complementar a renda da família e/ou subsistência (MONTELES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010; FIGUEREDO, 2014; FREITAS et al., 2019).

A redução severa na abundância e densidade dos organismos pode alterar a estrutura genética das populações, prejudicando o potencial de recuperação desses estoques (FAO, 2018). Embora haja um grande interesse econômico por moluscos marinhos, sobretudo os bivalves, os estudos realizados ainda são escassos quando comparados ao número de espécies existentes. A maior parte dessas espécies é desprivilegiada em termos de dados biológicos básicos (ALBUQUERQUE, 2010), incluindo-se aspectos genéticos.

Contradições entre os diferentes estudos morfológicos realizados dificultam a identificação de espécies venerídeos, afetando demais estudos ecológicos com esses organismos (CANAPA et al., 1996; DENADAI et al., 2006; MYKKELSEN et al., 2006). Pesquisas genéticas de identificação e caracterização populacional, avaliação de estoque de moluscos bivalves vêm sendo realizados utilizando o gene Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) com a finalidade de auxiliar na identificação precisa das espécies (RODRIGUES et al., 2010; LEMER et al., 2014; FERNANDES et al., 2018; LOPES et al., 2018; LOPES, et al., 2019). Portanto, objetivou-se neste trabalho identificar molecularmente as espécies Veneridae de ocorrência na zona costeira amazônica (Ilha de Upaon-Açu, Maranhão, Brasil).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar via DNA *barcoding* bivalves da família Veneridae na zona costeira amazônica, visando contribuir para sua correta identificação.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar os espécimes de Veneridae utilizando sequências do DNA mitocondrial do gene COI, da zona costeira amazônica.
- Determinar os índices de variabilidade e distância genética dos táxons analisados.
- Analisar padrões de variabilidade e conteúdo informativo do gene COI para os Veneridae estudados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Classificação Taxonômica da família Veneridae

As espécies de Veneridae são moluscos bivalves, comuns no litoral brasileiro, em ambientes com características diversas como praias arenosas e enlameadas, manguezais e fundos de ambientes de corais (RIOS, 1994; DENADAI et al., 2006; ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015).

De acordo com Rios (1994) a família Veneridae (Figura 1) apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- FILO: Mollusca
 - CLASSE: Bivalvia
 - SUBCLASSE: Eutherodonta
 - ORDEM: Venerida
 - FAMÍLIA: Veneridae



Figura 1. Conchas das espécies de Veneridae.

Fonte: Autora, 2020.

As características das conchas são as informações comumente utilizadas para identificação morfológica das espécies de Veneridae, entretanto devido à variedade de cores da parte externa da concha, essa característica não corresponde um bom caractere para identificação de espécies desse grupo (DENADAI et al., 2006; ROCHA, 2016). As conchas são caracterizadas por possuírem paredes espessas, podendo ser lisas ou ornadas com costelas (lamelas), ou com fracas estrias (linhas de crescimento); algumas apresentam também costelas radiais formando um padrão cancelado de ornamentação, outras com espinhos posteriores. Geralmente elas são equilaterais, infladas, possuindo umbos inclinados para o anterior (prosógiro), regularmente fechadas com a extremidade posterior levemente alongada e anterior arredondada. Os dentes dos cardeais são simples ou bi-finos, sendo os cardeais médios comumente mais robustos que os anteriores. Os dentes laterais posteriores estão quase

sempre ausentes, mas os dentes laterais anteriores são variavelmente desenvolvidos ou ausentes. Ninfa calcária, que pode apresentar granulações, serrilhados e, em alguns casos, pode ser bífida ou trífida (AMARAL et al., 2006; DENADAI et al., 2006; KAPPNER e BIELER, 2006; MYKKELSEN et al., 2006).

3.1.1. Gênero *Anomalocardia* Schumacher, 1817

De acordo com Rios (1994) o gênero *Anomalocardia* Schumacher, 1817 apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- FILO: Mollusca
 - CLASSE: Bivalvia
 - SUBCLASSE: Eutherodonta
 - ORDEM: Venerida
 - FAMÍLIA: Veneridae
 - SUBFAMÍLIA: Chioninae
 - GÊNERO: *Anomalocardia*

Problemas com sinonímia é comum com gêneros da Veneridae. Para o gênero *Anomalocardia* identificado por Schumacher em 1817 foram feitas revisões de diversas espécies, verificando divergências e atualizando a sistemática (HUBER, 2010).

Atualmente o gênero possui quatro espécies aceitas (MOLLUSCABASE, 2019), entretanto apenas *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus, 1767) encontra-se no litoral brasileiro (ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015). Essa espécie possui diversas sinonímias, uma das principais e mais conhecida no Brasil é a *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), sendo ainda utilizado em publicações científicas (MAIA et al., 2018; BARBOSA et al., 2018; COSTA et al., 2019).

3.1.2. Gênero *Leukoma* E. Römer, 1857

De acordo com Rios (1994) o Gênero *Leukoma* E. Romer, 1857 apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- FILO: Mollusca
 - CLASSE: Bivalvia
 - ORDEM: Venerida
 - SUBCLASSE: Eutherodonta
 - FAMÍLIA: Veneridae

- SUBFAMÍLIA: Chioninae
 - GENERO: *Leukoma*

Este gênero identificado inicialmente por E. Römer em 1857 possuiu por muito tempo espécies descritas equivocadamente respondendo a diversos gêneros. O gênero *Protothaca* descrito por Dall em 1902 é o exemplo mais conhecido, sendo *Leukoma* considerado um subgênero. Huber (2010) estudando os bivalves marinhos no mundo identificou *Leukoma* colocando-o em nível de gênero, sendo confirmada sinonímia de *Protothaca* por Coan e Valentich-Scott (2012). Gênero *Leukoma* possui 21 espécies aceitas (MOLLUSCABASE, 2019), no Brasil encontram-se as espécies *Leukoma antiqua* (King & Broderip, 1832), *Leukoma pectorina* e *Leukoma subrostrata* (Lamarck, 1818) (ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015).

3.1.3. Gênero *Tivela* Link, 1807

De acordo com Rios (1994) o Gênero *Tivela* Link, 1807 apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- FILO: Mollusca
 - CLASSE: Bivalvia
 - ORDEM: Venerida
 - SUBCLASSE: Eutherodonta
 - FAMÍLIA: Veneridae
 - SUBFAMÍLIA: Meretricinae
 - GENERO: *Tivela*

Esse gênero hoje possui 27 espécies aceitas (MOLLUSCABASE, 2019), no Brasil encontram-se as espécies *Tivela fulminata* (Bory de Saint-Vincent, 1827), *Tivela geijskesi* (Van Regteren Altena, 1968), *Tivela mactroides* (Born, 1778), *Tivela dentaria* e *Tivela zonaria* (Lamarck, 1818) (ROCHA e MATTHEWS-CASCON, 2015). Denadai et al. (2006) descrevem esse gênero ressaltando sobre a falta de consenso entre os autores com relação algumas características, sendo essas diferentes dos padrões habituais dos demais gêneros da Veneridae.

3.2. DNA *barcoding*

O DNA mitocondrial permitiu desvendar diversos aspectos da evolução de organismos e de seus genomas, permitindo a discriminação de espécies e estudos de genética de populações (GOVEIA, 2010).

O código de barras do DNA ou DNA *barcoding*, utiliza sequências parciais de DNA do gene citocromo C Oxidase subunidade I (COI) e permite identificar e designar espécimes desconhecidas e espécies previamente descritas; auxiliando a desvendar a biodiversidade (BOLZAN, 2011). Para abrigar e disponibilizar os códigos de barra de DNA e as informações ligados a eles foi criado uma base de dados integrada (Barcode of Life Data Systems – BOLDSYSTEMS) (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

Pesquisas envolvendo insetos, aves, peixes, moluscos, entre outros organismos têm sido desenvolvidas no intuito de obter marcadores genéticos para identificação destes grupos (HERBET et. al, 2004; PARK et. al, 2011; ZHANG e HANNER, 2012; GUTIÉRREZ et. al, 2014; BINGPENG et. al, 2018) com a finalidade de obter dados referentes ao DNA barcode que irão aprimorar o conhecimento sobre a biodiversidade e sua correta identificação.

Estudo com bivalve *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) foi o primeiro relato de arranjo genético mitocondrial para molusco (HOFFMAN et al., 1992). Hebert et al., (2003), propuseram uma metodologia padrão com propósito de identificar e descrever a biodiversidade global através de uma porção do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). A partir desse estudo com gene COI foi realizado diversas pesquisas com moluscos visando a identificação de espécies e populações em diferentes ambientes, a fim de elucidar as dúvidas quanto à identificação morfológicas das espécies de moluscos (ARRUDA et al., 2009; TURECK, 2010; MELO et al., 2010; MELO et al., 2013; LOPES et al., 2018).

Dúvidas quanto à identificação morfológica dos Veneridae são comuns, havendo muitas inconsistências entre os diferentes estudos realizados, dificultando a identificação e comprometendo estudos ecológicos e sistemáticos das espécies (CANAPA et al., 1996; DENADAI et al., 2006; MYKKELSEN et al., 2006). Portanto, diante do pouco que se sabe sobre a diversidade taxonômica e genética na zona costeira amazônica, devido à baixa produção bibliográfica (CARDOSO et al., 2018), torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que elucidem as incertezas de identificação desses organismos.

4. METODOLOGIA

4.1. Caracterização da área de estudo

A zona costeira amazônica no Brasil compreende os estados do Amapá, Pará e Maranhão. O litoral maranhense possui o segundo maior litoral do Brasil com aproximadamente 640 km de extensão (entre a foz dos Rios Gurupi e Parnaíba). Devido a sua grande extensão e sua diversidade fitográfica diferenciada o litoral é dividido em cinco setores (Figura 2):

(1) Golfão maranhense – caracterizado como um complexo estuarino, onde deságuam os afluentes dos rios Mearim, Itapecuru e Munim, entre outros menos expressivos;

(2) Litoral oriental - é marcado por uma linha de costa retilínea, recortando restingas, cordões de dunas fixas e móveis, manguezais, praias, baías, ilhas, enseadas e sistemas deltáicos, estuarinos, já possuindo as primeiras características da Região Nordeste;

(3) Litoral ocidental - conhecido como a região das “reentrâncias maranhenses”, exibindo importantes manguezais e profundos estuários, características bem definidas da região amazônica;

(4) Baixada maranhense - é representada por terras baixas, planas e inundáveis, caracterizadas por campos, matas de galeria, manguezais e bacias lacustres;

(5) Parque Estadual Marinho do Parcel Manuel Luís - é uma região recifal coralina, quase totalmente submersa, com pequenos afloramentos de algas durante a baixamar (MMA, 1996), que ocorre a 49 milhas da costa (EL-ROBRIN et al, 2018).

A ilha de Upaon-Açu se localiza entre dois grandes sistemas estuarinos que são as baías de São Marcos do lado esquerdo e de São José do lado direito, na região central do Golfão Maranhense (Setor 1). Localizam-se na ilha os municípios de São Luís, Raposa, São José de Ribamar e Paço do Lumiar, que formam a Região Metropolitana de São Luís (IBGE, 2002).

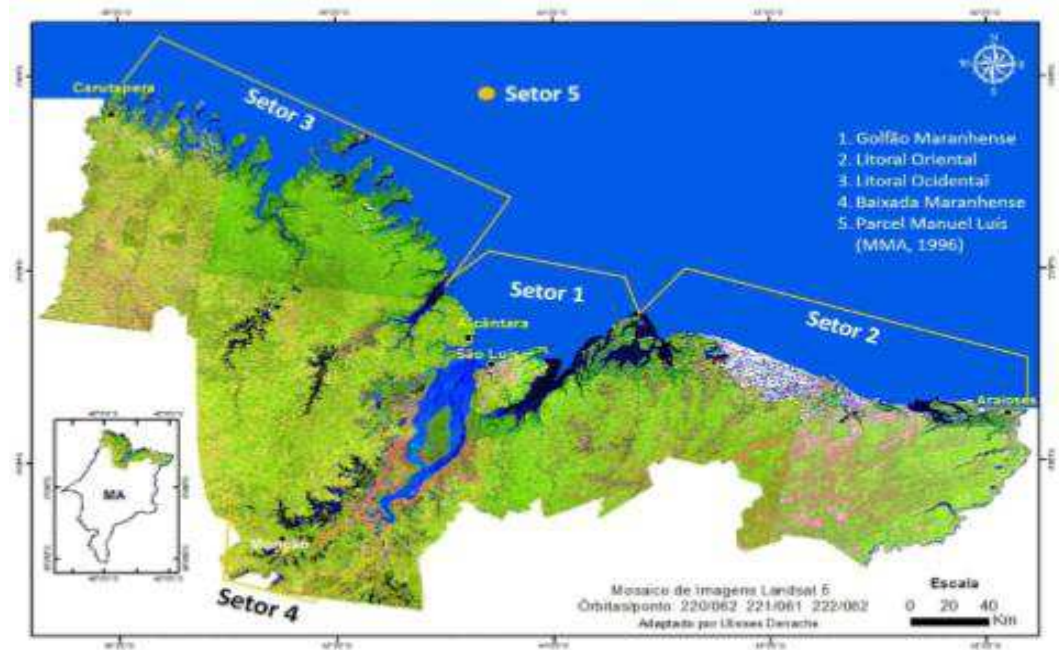


Figura 2. Mapa de Setorização da Zona Costeira do Estado do Maranhão (ZCEM): 1= Golfão maranhense, 2= Litoral oriental, 3= Litoral ocidental 4= Baixada maranhense, 5= Parcel Manuel Luís. Fonte: EL-ROBRIN et al., (2018).

4.2. Material Biológico

As amostras foram obtidas entre outubro de 2018 e julho de 2019 em quatro pontos na zona costeira amazônica. Foram coletados indivíduos na praia do Olho D'água em São Luís, no estuário do município de Raposa, no estuário no povoado de Timbaúba em Paço do Lumiar e na praia do Araçagi em São José de Ribamar, totalizando 89 amostras (Tabela 1).

Tabela 1: Número de amostras de Veneridae obtidas por ponto de coleta entre outubro de 2018 e julho de 2019 na zona costeira amazônica.

LOCALIDADE	Nº DE INDIVÍDUOS	GEORREFERÊNCIA		HABITAT
		S	W	
São Luís	20	2° 47' 7349"	44° 22' 6065"	PRAIA
Raposa	20	2° 42' 7112"	44° 07' 0463"	MANGUE
Paço do Lumiar	29	2° 51' 9051"	44° 06' 8797"	MANGUE
São José de Ribamar	20	2° 46' 0676"	44° 18' 0514"	PRAIA
Total	89	-	-	-

As coletas foram realizadas de forma manual e aleatória em uma área aproximada de 5 m². Os organismos foram levados ao Laboratório de Fisiologia, Cultivo e Reprodução de Organismos Marinhos (FISIOMAR) na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) onde foi realizado o processamento do material biológico.

O músculo adutor foi removido e preservado em etanol a 100% e mantido a 20°C negativo até a extração do DNA. As amostras foram posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular no Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC/UEMA) para realização das demais etapas.

4.3. Identificação molecular

4.3.1. Extração do DNA

O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega seguindo as instruções do fabricante, adaptado para microtubos de 1,5 ml. As etapas consistiram na retirada de um fragmento de 20 mg tecido. Em seguida foi preparada a solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), em quantidade proporcional as amostras. Misturada a solução, foi levada ao freezer por 5 minutos. Foi usado 300 µl da solução preparada para cada um dos tubos e foram acrescentados 15 µl de proteinase K e deixado às amostras em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido.

Após a degradação do tecido foi adicionado 10 µl de RNase e levados à estufa a 37° C por 30 minutos. Foi adicionado posteriormente 150 µl do reagente Protein Precipitation e agitado no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes. Foi colocado no freezer por cinco minutos, centrifugou-se em seguida por 10 minutos a 15.000 RPM. Foi adicionado 600 µl de isopropanol em um novo tubo e acrescentado o sobrenadante dos tubos retirados da centrifuga, após foi centrifugado novamente por 10 minutos a 15.000 rpm.

Foi descartado o isopropanol e colocado o tubo aberto sobre papel absorvente. Em seguida foi adicionado 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA, e centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm. Descartado o álcool tomando cuidado para não remover o pellet. Posteriormente foi colocado o tubo aberto na estufa por 10 minutos e acrescentado 50 µl de solução DNA rehydration, ficando em temperatura ambiente por 24 horas, aproximadamente.

O DNA foi visualizado através da eletroforese utilizando gel de agarose a 1% corado com Green e sob luz ultravioleta.

4.3.2. Amplificação do gene COI por PCR

A amplificação de sequências do gene de COI do DNA mitocondrial foi obtida com os iniciadores LCOCI1490 e HCOCI2198 desenhados por Folmer et al. (1994). Sendo utilizado as seguintes quantidades das soluções:

- 2,5 µl de buffer 10x;

- 0,5 µl de MgCl₂
- 4 µl de DNTPs
- 0,2 µl de taq DNA polimerase (5 U/µl - Invitrogen)
- 0,25 para cada primer (0,25 µl do primer LCOCI1490 e 0,25 µl do primer HCOCI2198)
- 1 µl de DNA da amostra
- 16,8 de água destilada estéril para completar o volume final da reação

O volume da PCR foi de 25 µl. A solução foi levada ao um termociclador onde a reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 ° C por 3 min; 35 ciclos de 95° C durante 1 min (Desnaturação); 48° C durante 1 min (Anelamento); 72 ° C por 1,5 min (Extensão); e uma extensão final a 72 ° C durante 7 min. Os resultados das PCRs foram observados em eletroforese utilizando gel de agarose 1%, corado com Green e sob luz ultravioleta.

4.3.3. Sequenciamento do DNA

Os produtos das PCRs foram purificados utilizando-se o kit ExoSap-IT® e utilizados em uma reação de sequenciamento utilizando-se o Kit “Big Dye TM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas em placas utilizando-se um termociclador com o programa descrito abaixo:

- Desnaturação inicial a 96 ° C por 10 min;
- 25 ciclos, sendo 96°C por 50 segundos (Desnaturação);
- 50°C por 5 segundos (Hibridização);
- 60°C por 4 minutos (Extensão).

A reação de sequenciamento foi precipitada com EDTA/Acetato de sódio/etanol e analisados em sequenciadores de DNA automático (ABI 3.500).

4.4. Análise de Dados

O alinhamento das sequências foi realizado com o Clustal W (THOMPSON et al., 1994). As edições das sequências foram feitas usando o editor de sequências BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999). O programa MEGA X versão 10.1 (KUMAR et al., 2018) foi utilizado para verificar a composição nucleotídica, matriz de distância genética e análises filogenéticas na qual utilizou-se o modelo Kimura-2-parâmetros e o método de agrupamento de vizinhos (SAITOU e NEI, 1987). Para verificar a significância dos agrupamentos utilizou-se a análise

de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Para a análise da diversidade haplotípica foi utilizado o programa DnaSP v5 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

Foram incorporados ao banco de dados sequências do GenBank: *Tivela mactroides* (DQ184805), *Tivela stultorum* (DQ184806) de Mikkelsen et al., (2006), *Protothaca mcgintyi* (DQ458490) de Kapner e Bieler (2006), *A. brasiliiana* (FJ481182) de Arruda et al., (2009). A espécie *Calypptogena magnifica* (AY191982) de Hurtado et al., (2003), utilizada como grupo externo.

A identificação molecular a partir do gene COI foi realizada por comparação de sequências do presente estudo com dados disponíveis na plataforma bioinformática BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de três espécies de sarnambi na área estudada. Um total de 48 sequências de um fragmento de gene COI foram obtidos, sendo as sequências da espécie *Anomalocardia flexuosa* com 656 pb, *Tivela* sp com 647pb e *Leukoma* sp com 653 pb.

A média da composição nucleotídica do fragmento analisado da *A. flexuosa* foi de 22,9% Adenina (A), 14,8% Citosina (C), 21% Guanina (G) e 41,3% Timina (T), estes valores estão dentro do esperado para a espécie. Para *Tivela* sp a maior porcentagem da média da composição das sequências foi de T e G. Para a *Leukoma* sp obteve 21,1% Adenina, 14,8% Citosina, 21% Guanina e 42,9% Timina (Figura 3).

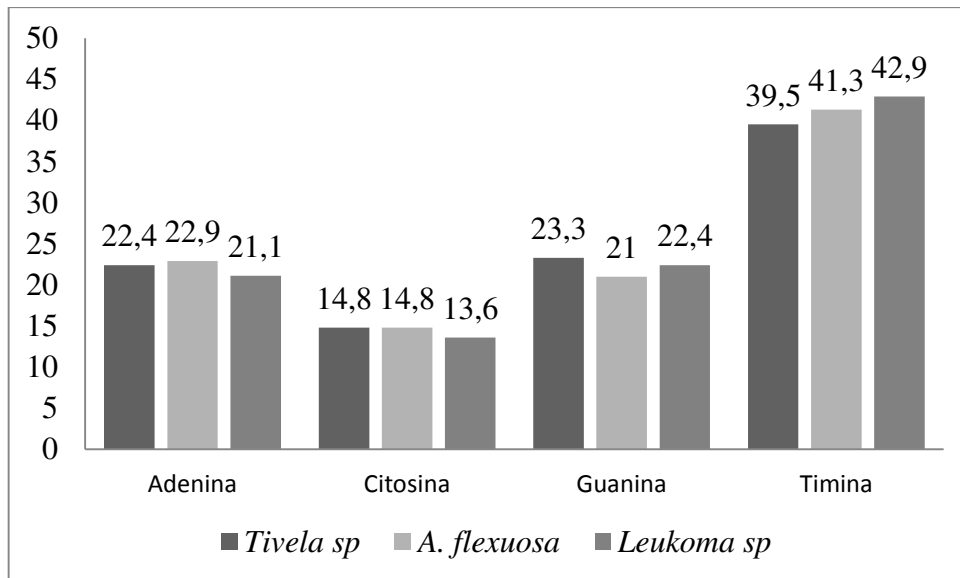


Figura 3. Composição de nucleotídeos baseada em sequências do gene COI dos sarnambis *Tivela* sp, *Anomalocardia flexuosa* e *Leukoma* sp.

Um total de 20 sequências de *A. flexuosa* obteve-se doze haplótipos com uma diversidade haplotípica (h) de 0,900 e diversidade nucleotídica (π) de 0,006 (Tabela 2). Quando analisado isoladamente cada população foi observado que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as amostras de Paço do Lumiar com $h=0,9333$, em Raposa foi de $h = 0,9121$. Dentre os doze haplótipos encontrados, os haplótipos H3 e H4 foram os mais frequentes, ocorrendo nas duas populações com frequência de três e seis vezes, respectivamente. Foram observados sete haplótipos exclusivos para a população de Raposa (H6 a H12) e três para população de Paço do Lumiar (H1, H2 e H5).

Para *Tivela* sp foram obtidas 14 sequências e 10 haplótipos com uma diversidade haplotípica (h) de 0,890 e diversidade nucleotídica (π) 0,006 (Tabela 2). Não houve compartilhamento de haplótipos por localidade. Foram observados quatro haplótipos

exclusivos para a população de São Luís (H7, H8, H9 e H10) e seis para população de São José de Ribamar (H1, H2, H3, H4, H5, H6). O haplótipo H2 foi o mais frequente ocorrendo cinco vezes.

Para *Leukoma* sp foi obtido 14 sequências com cinco haplótipos diversidade haplotípica (h) de 0,5055 e diversidade nucleotídica (π) 0,001 (Tabela 2). O haplótipo H2 foi o mais frequente, ocorrendo dez vezes.

Tabela 2: Diversidade molecular de *Anomalocardia flexuosa*, *Leukoma* sp e *Tivela* sp.

POPULAÇÕES	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				h	π
<i>Anomalocardia flexuosa</i>	20	12	24	0,900	0,006
<i>Leukoma</i> sp	14	5	22	0,505	0,001
<i>Tivela</i> sp	14	10	4	0,890	0,006

N = número amostral NH = número de haplótipos S = sítios polimórficos h = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica

As sequências de COI obtidas foram submetidas a plataforma BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) com a finalidade de obter a identificação molecular. A porcentagem de identificação das espécies no BOLDSYSTEMS para o gênero *Anomalocardia* variou de 99,31 a 99,83% de similaridade para espécie *A. brasiliiana* sinônima da *A. flexuosa*, para o gênero *Tivela* 94,18% a 95,65% de similaridade com a espécie *T. mactroides*. O gênero *Leukoma* alcançou apenas 85,16% à espécie mais próxima *Leukoma metodon* (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual de similaridade genética obtida por comparações de sequências no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para os sarnambis *Tivela* sp, *Leukoma* sp e *Anomalocardia* sp (*sn* – sinonímia de *Anomalocardia flexuosa*)

Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Similaridade (%)
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR1)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,48
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR5)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,83
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR10)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,83
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR12)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,31
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR14)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,48
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR15)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,48
<i>Anomalocardia</i> sp (SAR17)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,83
<i>Anomalocardia</i> sp (SAP24)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,65
<i>Anomalocardia</i> sp (SAP25)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,48
<i>Anomalocardia</i> sp (SAP26)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,65
<i>Anomalocardia</i> sp (SAP27)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,65
<i>Anomalocardia</i> sp (SAP28)	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^{sn}	99,83
<i>Tivela</i> sp (SAO1)	<i>Tivela mactroides</i>	94,18
<i>Tivela</i> sp (SAO2)	<i>Tivela mactroides</i>	94,90
<i>Tivela</i> sp (SAO3)	<i>Tivela mactroides</i>	95,35
<i>Tivela</i> sp (SAO8)	<i>Tivela mactroides</i>	95,01
<i>Tivela</i> sp (SAA1)	<i>Tivela mactroides</i>	95,17
<i>Tivela</i> sp (SAA3)	<i>Tivela mactroides</i>	95,49
<i>Tivela</i> sp (SAA4)	<i>Tivela mactroides</i>	95,52
<i>Tivela</i> sp (SAA5)	<i>Tivela mactroides</i>	95,65
<i>Tivela</i> sp (SAA9)	<i>Tivela mactroides</i>	95,49
<i>Tivela</i> sp (SAA18)	<i>Tivela mactroides</i>	95,33
<i>Leukoma</i> sp (SAP1)	<i>Leukoma metodon</i>	84,05
<i>Leukoma</i> sp (SAP2)	<i>Leukoma metodon</i>	84,70
<i>Leukoma</i> sp (SAP4)	<i>Leukoma metodon</i>	84,98
<i>Leukoma</i> sp (SAP9)	<i>Leukoma metodon</i>	85,16
<i>Leukoma</i> sp (SAP17)	<i>Leukoma metodon</i>	84,46

Quando avaliadas a divergência entre as sequências de sarnambis da mesma subfamília (Chioninae), *A. flexuosa* x *Leukoma* sp a média de divergência interespecífica revelou valor de 32,2%, inferior à divergência entre as espécies de subfamília diferente (Chioninae x

Meretricinae) como no caso de *Tivela* sp x (*A. flexuosa* x *Leukoma* sp) (Tabela 4). As médias de divergências genéticas intraespecíficas mostraram valores de 0,63 para *A. flexuosa*, 0,65% para *Tivela* sp e 0,16% para *Leukoma* sp, valores este apenas entre as espécies coletadas. Sendo verificados de forma individual, os percentuais de divergência apresentaram padrões altos no comparativo das sequências obtidas do gênero *Tivela* com a sequência da espécie *Tivela mactroides* disponível no Genbank, valores que variam entre 4,7 e 6,3% (Tabela 5).

Tabela 4: Divergência genética (K2P) intra e interespecífica dos sarnambis *Anomalocardia flexuosa* (A), *Leukoma* sp (B) e *Tivela* sp (C).

Categoria	Identificação molecular	N	Divergência K2P (%)
			Média
Intraespecífica	<i>Anomalocardia flexuosa</i> ^A	20	0,63
	<i>Leukoma</i> sp ^B	14	0,16
	<i>Tivela</i> sp ^C	14	0,65
Interespecífica	AB	-	32,2
	AC	-	33,8
	BC	-	36,4

Tabela 5: Matriz de distância genética (K2P) entre as espécies de sarnambi obtidas a partir de sequências do gene COI (SAR = Raposa, SAO São Luis SAA = São José de Ribamar, SAP = Paço do Lumiar e GB = Genbank)

Espécies	% Distância Genética																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1-SAA1 <i>Tivela_sp_H1</i>	-																														
2-SAA3 <i>Tivela_sp_H2</i>	0,2	-																													
3-SAA4 <i>Tivela_sp_H3</i>	0,2	0	-																												
4-SAA5 <i>Tivela_sp_H4</i>	0,4	0,2	0,2	-																											
5-SAA 9 <i>Tivela_sp_H5</i>	0,6	0,4	0,4	0,6	-																										
6-SAA18 <i>Tivela_sp_H6</i>	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	-																									
7-SAO2 <i>Tivela_sp_H7</i>	0,7	0,6	0,6	0,7	0,9	0,7	-																								
8-SAO3 <i>Tivela_sp_H8</i>	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	0,4	0,7	-																							
9-SAO8 <i>Tivela_sp_H9</i>	0,4	0,6	0,6	0,7	0,9	0,7	1,1	0,7	-																						
10-SAO1 <i>Tivela_sp_H10</i>	1,9	1,7	1,7	1,9	2,1	1,9	2,3	1,9	2,3	-																					
11- <i>Tivela mactroides</i> GB	5,1	4,9	4,9	4,7	4,9	5,1	5,5	5,1	5,5	6,3	-																				
12-SAP24 <i>A_flexuosa_H1</i>	37,2	36,9	36,9	37,2	36,9	37,2	37,2	37,2	37,5	38,4	36,2	-																			
13-SAP25 <i>A_flexuosa_H2</i>	36,3	35,9	35,9	36,3	35,9	36,3	36,3	36,3	36,6	37,4	36,5	2,1	-																		
14-SAP26 <i>A_flexuosa_H3</i>	35,0	34,7	34,7	35,0	34,7	35,0	35,0	35,0	35,3	36,2	35,3	2,1	0,7	-																	
15-SAP27 <i>A_flexuosa_H4</i>	35,0	34,7	34,7	35,0	34,7	35,0	35,0	35,0	35,3	36,2	35,3	2,1	0,7	0,0	-																
16-SAP28 <i>A_flexuosa_H5</i>	35,9	35,6	35,6	35,9	35,6	35,9	35,9	35,9	36,3	37,1	36,2	2,1	0,4	0,7	0,7	-															
17-SAR1 <i>A_flexuosa_H6</i>	35,0	34,7	34,7	35,0	34,7	35,0	35,0	35,0	35,3	36,2	35,3	2,3	0,9	0,2	0,2	0,9	-														
18-SAR5 <i>A_flexuosa_H7</i>	36,6	36,3	36,3	36,6	36,3	36,6	36,6	36,6	36,9	37,8	35,6	2,1	0,7	1,1	1,1	0,4	1,3	-													
19-SAR10 <i>A_flexuosa_H8</i>	36,6	36,3	36,3	36,6	36,3	36,6	36,6	36,6	36,9	37,8	36,2	1,7	0,7	1,1	1,1	0,4	1,3	0,4	-												
20-SAR12 <i>A_flexuosa_H9</i>	35,0	34,7	34,7	35,0	34,7	35,0	35,0	35,0	35,3	36,2	35,9	2,5	1,1	0,4	0,4	1,1	0,6	1,5	1,5	-											
21-SAR14 <i>A_flexuosa_H10</i>	35,0	34,7	34,7	35,0	34,7	35,0	35,0	35,0	35,3	36,2	35,6	2,3	0,9	0,2	0,2	0,9	0,4	1,3	1,3	0,4	-										
22-SAR15 <i>A_flexuosa_H11</i>	35,3	35,0	35,0	35,3	35,0	35,3	35,3	35,3	35,6	36,5	35,6	2,3	0,9	0,2	0,2	0,9	0,4	1,3	1,3	0,2	0,4	-									
23-SAR17 <i>A_flexuosa_H12</i>	35,9	35,6	35,6	35,9	35,6	35,9	35,9	35,9	36,3	37,1	35,6	2,1	0,7	0,7	0,7	0,4	0,9	0,4	0,4	1,1	0,9	0,9	-								
24- <i>Anomalocardia brasiliiana</i> GB	36,3	35,9	35,9	36,3	35,9	36,3	36,3	36,3	36,6	37,4	35,9	0,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,7	1,5	1,1	1,9	1,7	1,7	1,5	-							
25-SAP1 <i>Leukoma_sp_H1</i>	37,4	37,0	37,0	36,7	37,0	37,4	38,0	37,4	37,7	39,8	37,4	31,0	33,1	32,5	32,5	32,8	32,2	32,8	32,8	32,4	32,4	32,7	32,2	31,6	-						
26-SAP2 <i>Leukoma_sp_H2</i>	37,0	36,7	36,7	36,4	36,7	37,0	37,7	37,0	37,4	39,5	37,0	30,7	32,8	32,2	32,2	32,5	31,9	32,5	32,5	32,1	32,1	32,4	31,9	31,3	0,2	-					
27-SAP4 <i>Leukoma_sp_H3</i>	37,7	37,4	37,4	37,0	37,4	37,7	38,3	37,7	38,0	40,2	37,7	31,0	33,1	32,5	32,5	32,8	32,2	32,8	32,8	32,4	32,4	32,7	32,2	31,6	0,6	0,4	-				
28-SAP9 <i>Leukoma_sp_H4</i>	37,4	37,0	37,0	36,7	37,0	37,4	38,0	37,4	37,7	39,8	37,4	31,0	33,1	32,5	32,5	32,8	32,2	32,8	32,8	32,4	32,4	32,7	32,2	31,6	0,7	0,6	0,2	-			
29-SAP17 <i>Leukoma_sp_H5</i>	37,4	37,0	37,0	36,7	37,0	37,4	38,0	37,4	37,7	39,8	37,4	31,0	33,1	32,5	32,5	32,8	32,2	32,8	32,8	32,4	32,4	32,7	32,2	31,6	0,4	0,2	0,2	0,4	-		
30- <i>Protothaca mcgintyi</i> GB	42,1	42,1	42,1	42,4	42,4	42,4	43,1	42,4	42,1	43,7	41,8	35,9	38,8	37,4	37,4	38,4	37,4	37,8	37,8	37,4	37,4	37,7	37,8	36,2	25,7	25,4	26,0	25,7	25,7	-	

A árvore filogenética foi gerada baseada no método de agrupamento de vizinhos (NJ), através do algoritmo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) revelando a formação de clados fortemente suportados com 100% de bootstrap para os três táxons identificados neste estudo (Figura 7).

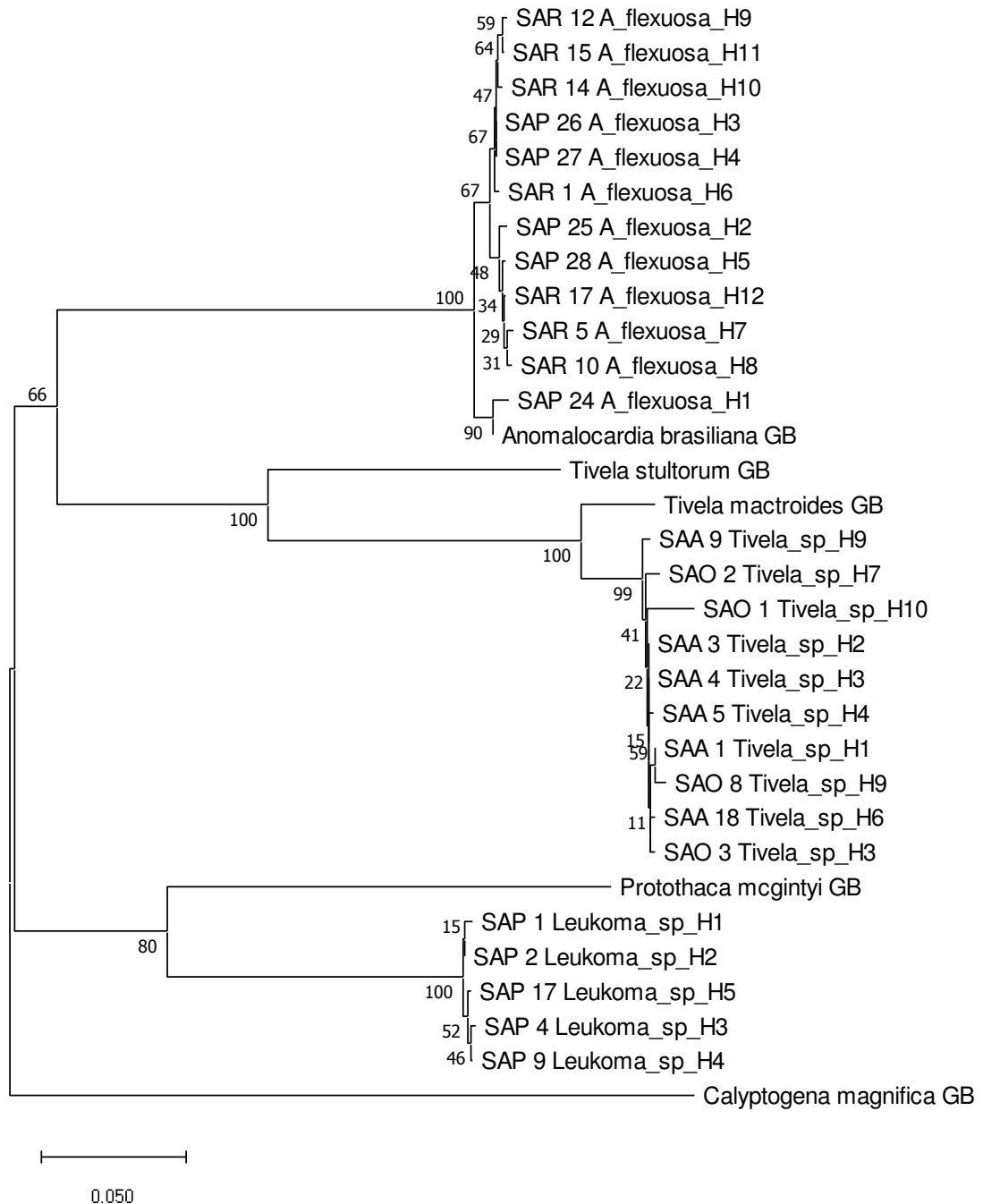


Figura 4. Árvore filogenética de haplótipos utilizando o método de Neighbor-Joining e algoritmo Kimura-2-parâmetros, baseada em sequências do gene COI em sarnambis das espécies *Anomalocardia flexuosa*, *Leukoma* sp e *Tivela* sp. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). (SAR = Raposa, SAO = São Luis, SAA = São José de Ribamar, SAP = Paço do Lumiar e GB = Genbank).

Os resultados observados mostraram um agrupamento de *A. flexuosa* e *A. brasiliana*, corroborando com a divergência intraespecífica e índice de similaridade para afirmar que ambas são a mesma espécie. *Leukoma* sp não agrupou com a espécie do mesmo gênero já plotada no BOLDSYSTEMS *Protothaca mcgintyi*, não possuindo estudos moleculares com a espécie na plataforma. Para *Tivela* sp de acordo com a similaridade no BOLDSYSTEMS a sequência mais próxima foi de *Tivela mactroides* (DQ184805), essa sequência é a única da espécie disponibilizada no Genbank. As sequências de *Tivela* sp apesar de pertencerem ao mesmo clado exibem uma diferenciação maior que 4,5% com a espécie *T. mactroides*.

6. DISCUSSÃO

A utilização do gene Citocromo oxidase subunidade I permitiu inferir quanto a identificação de três táxons analisados. Este marcador se mostrou como uma ferramenta poderosa em estudos filogenéticos, elucidando incertezas taxonômicas do grupo moluscos bivalves, fornecendo informações sobre sua sistemática (KAPPNER e BIELER, 2006; MIKELSEN et al., 2006; ARRUDA et al., 2009; TURECK, 2010; MELO et al., 2010; MELO et al., 2013; LOPES, et al., 2018; LOPES, et al., 2019).

A média da composição nucleotídica do fragmento de gene COI analisado para *A. flexuosa* exibiu valores dentro do esperado para a espécie. Arruda et al. (2009) em estudos de DNA Barcode com *Anomalocardia brasiliiana* (sinônima de *A. flexuosa*) encontrou maior porcentagem de Timina e Adenina. Para *Tivela* sp a porcentagem da composição nucleotídica foi semelhante à da espécie *Tivela mactroides* com destaque para Timina e Guanina por maiores porcentagens (MIKELSEN et al., 2006). Para *Leukoma* sp os valores da composição também mostraram-se de acordo com espécies do mesmo gênero (KAPPNER e BIELER, 2006).

A diversidade haplotípica de *A. flexuosa* na zona costeira amazônica apresentou valores altos para cada população analisada (Raposa e Paço do Lumiar). Valores elevados de diversidade haplotípica são comuns para a espécie, resultado semelhante foi observado em populações de *A. brasiliiana* estudadas Arruda et al., (2009). A divergência intraespecífica das duas espécies apresentam valores inferiores a 1%, indicando ser o mesmo status taxonômico.

Espécies Veneridae são planctônicas em seu estágio larval (RIOS, 1994) essa condição faz que sejam geneticamente semelhantes em regiões extensas, embora não necessariamente em toda a sua extensão, em caso de barreira natural ou artificial (OLIVEIRA et al., 2005; ARRUDA et al., 2009). O que possivelmente leva a semelhança genética entre as populações da espécie estudada *A. flexuosa* e *A. brasiliiana* em diferentes áreas (ARRUDA et al., 2009).

A identificação molecular da espécie *A. flexuosa* a partir da comparação com sequencias depositadas na plataforma BOLDSYSTEMS confirmou o status taxonômico mostrando altos índices de similaridade genética com *A. brasiliiana*, onde apresentaram valores superiores a 99%. O agrupamento robusto na árvore filogenética e a distância genética abaixo de 3% corroboram para condição de sinonímia entre *A. flexuosa* e *A. brasiliiana*.

O Consortium for the Barcode of Life (CBOL) delimita que o valor de corte para identificação molecular de espécie é de 2 a 3% de divergência genética. Se a sequência de DNA de um exemplar diferir menos que 3% ou obter um índice de similaridade superior a 97% no BOLDSYSTEMS da sequência de uma das espécies já conhecidas, ele será

identificado como pertencente àquela espécie (HEBERT et al., 2003; SOLÉ-CAVA e WÖRHEIDE, 2007). Estas condições ocorreram apenas com a espécie *Anomalocardia flexuosa*.

Os valores de corte e o agrupamento da árvore filogenética nos permitiu identificar os táxons *Tivela* sp e *Leukoma* sp no nível de gênero. Os valores baixos de similaridade para *Leukoma* sp dá-se por a espécie no litoral maranhense não estar plotado no banco de dados BOLDSYSTEMS da espécie em estudo.

Com base nas descrições morfológicas realizadas por Rios (1994), Amaral et al. (2006), Denadai et al. (2006), as amostras estudadas da espécie *Leukoma* sp tratam-se de *Leukoma pectorina*. Esta espécie possui como características umbos subcentrais anteriores, baixos e angulosos. Partes externas das valvas tem escultura formada por costelas radiais baixas, estreitas, cruzadas por costelas comarginais baixas, delgadas, formando ligeira ondulação nos intercruzamentos. Margem interna livre denticulada. Ninfa estreita, lisa. Cicatriz do músculo adutor posterior ovalado, grande; cicatriz do músculo adutor anterior oval-alongado. Seio palial raso, característico do gênero. Na valva direita possui dente cardinal anterior laminar-curto, paralelo à margem dorsal; dente cardinal mediano forte, trapezoidal, dente cardinal posterior forte, trapezoidal-alongado, levemente bífido, maior que os demais da mesma valva. Na valva esquerda possui dente cardinal anterior acuminado, mais alto e alongado que os demais na mesma valva; dente cardinal mediano quadrangular, forte, levemente bífido; dente cardinal posterior laminar-alongado, baixo e paralelo à ninfa. Valva esquerda com escudo largo, com declive acentuado e delimitado por uma longa carena. Essas características são presente em todas as amostras analisadas no presente estudo.

Para *Tivela* sp de acordo com a similaridade no BOLDSYSTEMS a espécie mais próxima foi de *T. mactroides* (GB). A espécie *Tivela* sp de ocorrência na zona costeira amazônica são identificadas morfológicamente como *T. mactroides* (MATTEWS et al., 1977; CAMPELO et al, 2017). Entretanto os valores de divergência e similaridade observados não permitem considerar a mesma espécie, pois os espécimes analisados nesse estudo formaram um forte agrupamento em um clado diferente na árvore filogenética apontando para outra espécie.

Os dados morfológicos de *Tivela* sp apontam para existência de uma nova espécie. Esta espécie possui como características uma concha trigonal, rígida e lisa. Perióstraco com aspecto de verniz com leves ondulações de linhas de crescimento. Valvas espessas, com margem anterior arredondada e margem posterior alongada. Coloração externa varia de totalmente creme, a marrom com faixas de coloração mais escura, radiais, que se alargam em

direção à margem livre. Região do umbo mais clara que a margem ventral. Coloração interior branca porcelanizada. Margem livre lisa. Umbos prosógiro. Lúnula cordiforme longa delimitada por estrias. Possui uma charneira com quatro dentes cardinais na valva esquerda e cinco dentes cardinais na valva direita, possuindo dentes laterais em ambas as valvas.

Tivela sp difere de *T. mactroides* por ter linha palial bem marcada e longa, ligado a sua extremidade ao seio palial formando um ângulo pontiagudo. O seio palial é moderadamente raso e levemente circular, possui os dentes cardinais espessos e robustos. A linha palial da *T. mactroides* é pouco aparente em alguns casos com algumas interrupções na linha e seus dentes cardinais são menos espessos (AMARAL et al., 2006). Na valva direita possui uma charneira com dois dentes laterais anteriores limitando a fosseta de encaixe para o lateral anterior da valva oposta. Valva esquerda possui dente lateral anterior trigonal, laminar, possuindo na sua base pequenas fossetas de encaixe dos dentes laterais da valva oposta. Essas características não são observadas na espécie *T. mactroides* descrita por AMARAL et al., 2006.

Denadai et al. (2006) estudando a morfologia de espécies da Família Veneridae no litoral de São Paulo fez uma redescrição para espécie *T. mactroides*, as características encontradas pelos autores são semelhantes a da *Tivela* sp, sugerindo que os autores equivocaram-se na identificação morfológica e que trata-se da mesma espécie.

Todos os táxons identificados foram encontrados por Matthews et al. (1977) em levantamento dos moluscos na Ilha de São Luís. Entretanto houve alguns equívoco na identificação morfológica de alguns deles. A mais evidente é *Leukoma pectorina* que foi identificada como *Chione pectorina* (espécie com nomenclatura não existente). O gênero *Chione* é pertencente à subfamília Chioninae, mesma subfamília de *L. pectorina*, possuindo algumas características semelhantes entre os dois gêneros que pode justificar o equívoco na identificação realizada pelos autores.

Em estudo de bioprospecção de invertebrados bênticos em alguns municípios da Ilha de São Luís (CAMPELO et al., 2017) foram encontrados e identificados morfológicamente a espécie *Tivela mactroides* e o gênero *Anomalocardia*. Com resultados deste estudo é possível afirmar que a espécie deste gênero, encontrados nos estuários da Ilha de Upaon-Açu, é *A. flexuosa*.

Venerídeos são parte importante da cadeia alimentar no ambiente costeiro e marinho, servindo de alimentos de diversos crustáceos e aves, além de uma fonte de renda para diversas comunidades de pescadores e marisqueiros (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014; SILVA, 2015; ANTONIO et al., 2019; FUNO et al., 2019). Entretanto ações humanas

vem afetando o habitat (praias, mangues, estuários) que estão sendo poluídos e/ou desmatados (SILVA, 2015; FREITAS et al., 2019).

O uso da caracterização molecular e a identificação correta de estoques bivalves são importantes para seu manejo com a finalidade de conhecer o potencial genético e mostrar a importância de programas de conservação dessas populações em ambientes distintos (ARRUDA et al., 2009). Estudos ecológicos, genéticos, morfológicos e populacionais com organismos da família Veneridae faz-se necessários na zona costeira amazônica para conhecimento das espécies e seu potencial de cultivo com intuito de amenizar os impactos sobre os estoques e preservar a diversidade genética local.

7. CONCLUSÃO

O cenário genético observado para amostras de *Anomalocardia flexuosa* permitiu inferir quanto a sua identificação na zona costeira amazônica, o que confirmou a sua sinonímia com a espécie *Anomalocardia brasiliiana*.

Os resultados da identificação morfológica e molecular indicou a existência de uma nova espécie, *Tivela sp.* Essa espécie pode estar sendo estudada equivocadamente como outras espécies do gênero *Tivela*, portanto faz-se necessário estudos ecológicos, moleculares e morfológicos para identificar com clareza esta nova espécie no litoral brasileiro.

A espécie identificada através de suas características morfológicas como *Leukoma pectorina* não possui sequências inclusas na plataforma BOLDSYSTEMS. É possível afirmar, a partir da identificação molecular, que seu gênero é *Leukoma*. Sendo este estudo pioneiro na caracterização molecular desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. C. P. **Novas opções de cultivo de moluscos bivalves marinhos no Brasil *Pteria hirundo* (Linnaeus,1758) e *Cyrtopleura costata* (Linnaeus,1758)**. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina. 218p. 2010.

AMARAL, A. C. Z.; RIZZO, A.E.; ARRUDA, E.P. **Manual de identificação dos invertebrados marinhos da Região Sudeste-Sul do Brasil**. Vol. 1. Edusp, São Paulo. 2006.

ANTONIO, I.G.; FUNO, I. C. S.; LOPES, L. M. F.; MOREIRA, H. Marisqueiras do Paço do Lumiar-MA: Caracterização sociambiental e da atividade de mariscagem. *In*: FIGUEREDO, M. B.; FREITAS, J. (Org.) **Aspectos socioeconômicos e ambientais de comunidades pesqueiras do Estado do Maranhão**. 1ª Ed. São Luís: Eduema, 2019. P 102-111

ARRUDA, C. C. B.; BEASLEY, C. R. VALLIOTO, M.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C. H. Significant genetic differentiation among populations of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791): a bivalve with planktonic larval dispersion. **Genetics and Molecular Biology**, 32,2 423 – 430. 2009.

BARBOSA, I. D. S.; BRITO, G. B.; SANTOS, G. L.; SANTOS, L. N.; TEIXEIRA, L. S. G.; ARAUJO, R. G. O.; KORN, M. G. A. **Multivariate data analysis of trace elements in bivalve molluscs: characterization and food safety evaluation**. Food Chemistry. 2018.

BIELER, R.; MIKKELSEN, P. M.; GIRIBET, G. Bivalvia—A Discussion of Known Unknowns. **American Malacological Bulletin**, 31(1), 123–133. 2013.

BIELER, R.; MIKKELSEN, P. M.; COLLINS, T. M.; GLOVER, E. A.; GONZÁLEZ, V. L.; GRAF, D. L.; GIRIBET, G. Investigating the Bivalve Tree of Life – an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. **Invertebrate Systematics**, 28(1), 32. 2014.

BINGPENG, X.; HESHAN, L.; ZHILAN, Z.; CHUNGUANG, W.; YANGUO, W.; JIANJUN, W. **DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait**. PLoS ONE 13(6):e0198109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>. 2018.

BOEHS, G.; ABSHER, T.; CRUZ-KALEB, A. C. Ecologia populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (BIVALVIA, VENERIDAE) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, 34(2): 259 - 270, 2008.

BOLZAN, A. R. **DNA Barcode de drosophilídeos micófagos pertencentes aos gêneros Hirtodrosophila Mycodrosophila e Zygothirica**. Dissertação. Universidade Federal Santa Maria. Biodiversidade Animal, 2011.

CAMPELO, C. M. A., OLIVEIRA V. M., MOCHEL, F. R., LIMA, L. G., LUVIZOTTO-SANTOS, R. Bioprospecção de Macroinvertebrados Bênticos para Ensaio Ecotoxicológicos de Sedimentos Marinhos e Estuarinos. **Boletim Do Laboratório De Hidrobiologia**. Vol. 27: 33-42, 2017.

CANAPA, A.; MAROTA, I.; ROLLO F.; OLMO E.; Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and paleontological data. **Journal of Molecular Evolution** 43: 517-522. 1996.

CANTERA, J. R. Shallow-water venerid clams (Bivalvia: Veneridae) from the pacific coast of Colombia. **The Veliger** 34: 78-84. 1991

CARDOSO, R. L.; CAVALCANTE, A. N.; TORRES, H. S.; NUNES, K. B.; FERREIRA, C. F. C; CARVALHO-NETA, R. N. F. **Avaliação do conhecimento sobre a diversidade de peixes, crustáceos e moluscos nas águas marinhas do Estado do Maranhão, Costa Nordeste do Brasil**. Cienc. Anim. Bras., Goiânia, v.19, 1-12, e-49880, 2018.

CHEN, J.; LI, Q.; KONG, L.; ZHENG, X. Molecular phylogeny of venus clams (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) with emphasis on the systematic position of taxa along the coast of mainland China. **Zoologica Scripta**, 40, 260–271. 2011.

COAN, E. V.; SCOTT, P. V.; BERNARD, F. R. Bivalve Seashells of Western North America. **Museum of Natural History**, Santa Barbara. 2000.

COAN, E. V.; VALENTICH-SCOTT, P. **Bivalve seashells of tropical West America. Marine bivalve mollusks from Baja California to northern Peru**. Vol 2, 1258 pp. 2012.

COSTA, A. L. B.; LIMA, L. G.; PARISE, C. K.; SANTOS, J. H. S.; SANTOS, A. L. S.; CARVALHO NETO, F. C. Reconstituição Paleoambiental do Quaternário no Estuário do Rio Santo Antônio, Ilha do Maranhão – Brasil. **Revista Geociências**, v. 38, n. 1, 2019.

DENADAI, M. R.; ARRUDA, E. P.; DOMANESCHI, O.; AMARAL, C. Z. Veneridae (Mollusca, Bivalvia) da costa Norte do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, 6(3):1-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032006000300011>. 2006.

EL-ROBRINI, M.; SANTOS, J. H. S.; LIMA, L. G.; SANTOS, M. C. F. V.; SOUZA, U. D. V.; Maranhão. In: Dieter Mueher (Org). **Panorama da Erosão Costeira no Brasil**. 167-239p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/gestao-territorial/gerenciamento-costeiro/procosta2>. 2018.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; DALTRO, A. C. S.; SILVA, I. P.; BERNARDES, F. de S. Indicadores socioeconômicos e percepção ambiental de pescadores em São Francisco do Conde, Bahia. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 459 – 470, 2014.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap**. *Evolution* 39:783-791. 1985.

FERNANDES, M. R.; SALGUEIRO, F.; MIYAHIRA, I. C.; CAETANO, H. S. mtDNA analysis of *Mytilopsis* (Bivalvia, Dreissenidae) invasion in Brazil reveals the existence of two species. **Hydrobiologia** 817: 97 – 110. 2018.

FIGUEREDO, M.B. **Análisis Comparativo de la gestión pesqueira entre el litoral de Maranhão Brasil y de Galicia – España**. Tese. Biología Ambiental. Pag 215. 2014.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotech** 3:294-299. 1994.

FREITAS, J.; CAVALCANTE, R. C. C.; COELHO, A. V.; OLIVEIRA, C. A.; FIGUEREDO, M. B. Levantamento socioeconômico dos pescadores da Comunidade Arraial, Zona Rural do Município de São Luís, Maranhão, Brasil. *In*: FIGUEREDO, M. B.; FREITAS, J. (Org.) **Aspectos socioeconômicos e ambientais de comunidades pesqueiras do Estado do Maranhão**. 1ª Ed. São Luís: Eduema, 2019. P. 12-24.

FUNO, I. C. S. A.; MONTELES, J. S.; MARINHO, Y. F.; SANTOS, G. M.; ANTONIO, I. G. Conhecimento tradicional: saberes e fazeres das marisqueiras do município de Raposa-Maranhão. *In*: FIGUEREDO, M. B.; FREITAS, J. (Org.) **Aspectos socioeconômicos e ambientais de comunidades pesqueiras do Estado do Maranhão**. 1ª Ed. São Luís: Eduema, 2019. P. 112-133.

GOVEIA, C. O. **Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila***. Dissertação. Ciência da Saúde. Belo Horizonte, 2010.

GUTIERREZ M. A. C.; VIVERO R.J.; VELEZ, I.D.; PORTER C.H.; URIBE, S. DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. **PLoS ONE** 9(1): e85496. doi:10.1371/journal.pone.0085496. 2014.

HALL, T. A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucleic Acids Symp Ser 41:95-98. 1999.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond.** 270: 313-321. 2003.

HEBERT, P. D. N., PENTON, E. H., BURNS, J. M., JANZEN, D. H., HALLWACHS, W. **Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator***. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817. 2004.

HOFFMAN, R.J.; BOORE, J.L.; BROWN, W.M.; A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel *Mytilus edulis*. ***Genetics***; 131: 397-412. 1992.

HUBER, M. **Compendium of bivalves. A full-color guide to 3'300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research**. Suíça, ConchBooks, 901 p. [CD-ROM]. 2010.

HURTADO, L. A.; MATEOS, M., Lutz, R. A.; VRIJENHOEK, R. C. (2003). Coupling of Bacterial Endosymbiont and Host Mitochondrial Genomes in the Hydrothermal Vent Clam *Calyptogena magnifica*. ***Applied and Environmental Microbiology***, 69(4), 2058–2064.

KAPPNER, I.; BIELER, R. Phylogeny of Venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. ***Mol. Phylogen. Evol.*** in press. 2006.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. ***Molecular Biology and Evolution*** 35:1547-1549. 2018.

LEMER, S.; BUGE, B.; BEMIS, A., GIRIBET, G.; First molecular phylogeny of the circumtropical bivalve family Pinnidae (Molusca, Bivalvia): Evidence for high levels of cryptic species diversity. ***Molecular Phylogenetics and Evolution*** 75: 11 -23. 2014.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. ***Bioinformatics***, v. 25, n.11, p. 1451-1452. jun. 2009.

LOPES, R. G. P. S.; ANTONIO, I. G; TCHAIKA, L. BARROS, M.C.; FRAGA, E.C. Molecular identification of native oysters on the coast of Maranhão, Brazil. ***Boletim do Instituto de Pesca***, [S.l.], v. 44, n. 4, p. 2725-2729, dec. 2018. ISSN 1678-2305.

LOPES, R. G. P. S.; ANTONIO, I. G.; TCHAIKA, L. BARROS, M.C.; FRAGA, E.C. Marcadores moleculares confirmam a ocorrência da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) no litoral maranhense. *In*: Silva-Neto, B. R. (Org.) **Inventário de recursos genéticos**. Atena Editora. ISBN 978-85-7247-486-3 DOI 10.22533/at.ed.863191807. 155-166p. 2019.

LUZ J. R.; G. BOEHS. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 7, p. 679-686. 2011.

MAIA, A. M. L. R.; MEDEIROS, E.; HENRY-SILVA, G. G. Distribution and density of the bivalve *Anomalocardia brasiliiana* in the estuarine region of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. Vol. 78. Nº1. 32-40f. 2018.

MATTEWS, H.R.; FERREIRA-CORREIA, M.M.; SOUSA, N.R.; Levantamento da fauna aquática da Ilha de São Luís (Estado do Maranhão, Brasil) I: Mollusca. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**;1(1):9-22. 1977.

MINISTÉRIO DE MEIO AMBIENTE. Programa Nacional de Gerenciamento Costeiro – PNGC. **Perfil dos Estados Litorâneos do Brasil: Subsídios à Implantação do Programa Nacional de Gerenciamento Costeiro**. Coordenações Estaduais do Gerenciamento Costeiro. Brasília, Programa Nacional do Meio Ambiente: 301p. 1996.

MELO, A. G. C.; VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P. M.; REECE, K. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v. 33, n. 3, p.564–572, 2010.

MELO, M. A. D.; SILVA, A. R. B.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil: a useful tool for application in oyster culture and stock management. **Aquaculture international**, v. 21, n. 6, p. 1325-1332. dez. 2013.

MIKKELSEN, P.M.; BIELER, R.; KAPPNER, I.; RAWLINGS, T.A. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 148(3):439-521. 2006.

MOLLUSCABASE. **Gênero:** Tivela. Página inicial. Disponível em: <<http://www.molluscabase.org/aphia.php?p=search>>. Acesso em: 12 de dez. de 2019.

MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. A; CASTRO, A. C. L. Caracterização da pesca artesanal nos municípios de Humberto de Campos e Primeira Cruz – Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 23:65-74. 2010.

NEVESSKAJA, L. A. Principles of systematics and the system of bivalves. **Paleontol. Journal**, v..43, n.1, p.3- 13, 2009

OLIVEIRA M. E. G. C., RUSSO C. A. M., LAZOSKI C, VIANNA P. R. F. G., SOLÉ-CAVA A. M. Genetic variation and population structure of Neotropical mud-mussels (*Mytella* spp). **Genet Mol Res** 4:197-202. 2005.

PARK, D-S.; FOOTTIT, R.; MAW, E.; HEBERT, P.D.N.; **Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera)**. **PLoS ONE** 6(4): e18749. doi:10.1371/journal.pone.0018749. 2011.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **Barcoding. Bold: The Barcode of Life Data System** (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*. 7: 355-364. 2007.

ROCHA, V. P.; MATTHEWS-CASCON, H. Distribution patterns inference of the family Veneridae (Mollusca, Bivalvia) in Brazil through secondary database. **Neotropical Biology and Conservation** 10(3):123-131. 2015.

ROCHA, V. P. **Filogenia morfológica e molecular e aspectos biogeográficos da família Chioninae (Bivalvia: Veneridae)**. Tese de doutorado. Instituto de Ciências do Mar. Universidade Federal do Ceará. 121f. 2016

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2.ed. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 492 p.

RODRIGUES, A. M. L.; BORGES-AZEVEDO, C. M.; HENRY-SILVA, G. G. Aspectos da biologia e ecologia do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae). **Revista Brasileira de Biociências**, 8 (4): 377-383. 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987.

SILVA, L. K. T. **Pesca artesanal entre mudanças socioambientais: estudo de caso na APA Bonfim – Guaráira/RN-Brasil**. Dissertação (Mestrado). Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 111f. 2015.

SOLÉ-CAVA, A. M.; WÖRHEIDE, G. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges: a controversial discussion. In: CUSTÓDIO, M. R.; LÔBO-HAJDU, G.; HAJDU, E.; MURICY, G. (Eds.). **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 603-612, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 22, p. 4673-4680. nov. 1994.

TURECK, C. R. **Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsídio ao cultivo**. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.; GYLLESTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE RD, STONELDNG M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol J Linn Soc** 26:375-400. 1985.

ZHANG, J.; HANNER, R. Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea. **PLoS ONE** 7(2): e30621. doi:10.1371/journal.pone.0030621. 2012.