UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Esclarecendo as relações filogenéticas e diversificação dos bivalves da Superfamília Mytiloidea (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia)

GABRIEL BAUTZ DALBEM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Esclarecendo as relações filogenéticas e diversificação dos bivalves da Superfamília Mytiloidea (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia)

Gabriel Bautz Dalbem

Dissertação submetida ao Programa de Pósgraduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Valéria Fagundes

Esclarecendo as relações filogenéticas e diversificação dos bivalves da Superfamília Mytiloidea (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia)

Dissertação submetida ao Programa de Pósgraduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 30 de Junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Fagundes - Presidente
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Cecília Waichert Monteiro – Membro Interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Teofania Heloisa Dutra Amorim Vidigal – Membro Externo Universidade Federal de Minas Gerais

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê." (Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

À Dr^a. Valéria Fagundes, pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses anos. Obrigado por me cobrar, por exigir e por me mostrar sempre o melhor caminho não só no desenvolvimento desse trabalho, mas durante toda minha formação como profissional.

À Dr^a. Mercia Barcellos da Costa por toda a ajuda. Seu amor pela profissão e por tudo que faz serviram de inspiração para minhas buscas. Obrigado por ajudar na minha formação.

Aos amigos do LGA: Rosana Abrante Nunes, Silva Ramira, Mariana Xavier, Arturo Martinelli, Victor Colombi, Fernanda Zaidan, Lucas Vianna, Eduardo Loyola, Marina Monjardim, Cristina Dornelas, Débora Dalvi, Ana Heloísa Carvalho e Thaís Volpi, obrigado pela ajuda e por sempre estarem presentes na construção desse conhecimento. A amizade de vocês é muito especial.

Aos amigos do LAMAB pelos momentos de descontração e discussões científicas pós almoço.

A Iago Ornellas e Débora De Nadai Dalvi, vocês são parte significativa desse projeto, fizeram vários momentos durante esses anos se tornarem inesquecíveis.

Aos professores do PPGBAN por terem contribuído e compartilhado conhecimento e amizade. Vocês foram parte crucial da minha formação.

À Juliana Justino, por toda ajuda, paciência e pelo exemplo de profissional dedicado.

E por fim agradeço incondicionalmente à minha família, sem vocês nada disso aqui aconteceria, obrigado pelo apoio, pelo amor incondicional, e por me incentivar e me dar força para seguir em frente. Essa etapa é uma conquista nossa, amo vocês.

Sumário

1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	3
2.1. Amostra	3
2.2. Extração, amplificação e sequenciamento	3
2.3. Análise dos dados	4
3. Resultados	5
4. Discussão	7
4.1. Mytiloidea, um grupo monofilético	7
4.2. Mytilidae, uma família e sete subfamílias	8
4.2.1. Perninae	9
4.2.2. Crenellinae	10
4.2.3. Septiferinae	10
4.2.4. Mytilinae	11
4.2.5. Brachidontinae	12
4.2.6. Dacrydiinae	12
4.2.7. Lithophaginae	13
4.3. Modiolidae, de rios a mares profundo	13
4.3.1 Bathymodiolinae	14
4.3.2. Modiolinae	14
4.3.3. Limnoperninae	15
4.3.4. Uma nova subfamília em Modiolidae?	16
4.4. Surgimento, irradiação e convergências morfológicas de Mytiloidea	17
5. Conclusão e implicações futuras	20
6 Referências	21

Resumo

A superfamília Mytiloidea Rafinesque, 1815 foi descrita originalmente com apenas uma família: Mytilidae Rafinesque, 1815. Posteriores revisões da classificação original sugerem que Mytiloidea possa ser subdividida em mais de uma família. Entretanto, não existe, até hoje, consenso sobre a organização interna dessa superfamília, bem como testes filogenéticos para entender a relação dos clados representantes. Nesse sentido, buscamos através de ferramentas moleculares testar e revisar a validade das classificações dentro de Mytiloidea, utilizando um marcador mitocondrial (COI) e dois nucleares (ITS1 e 18s) para inferir as relações evolutivas entre os grupos de Mytiloidea. As inferências filogenéticas recuperam o monofiletismo de Mytiloidea. Os agrupamentos sugeridos pelos estudos morfológicos previamente sugeridos para as famílias e subfamílias de Mytiloidea foram recuperados como parafiléticos. Baseado nas relações evolutivas recuperadas no presente estudo propomos que Mytiloidea é composta por duas famílias: Mytilidae e Modiolidae, sendo a primeira dividida em sete subfamílias (Mytilinae, Perninae, Brachidontinae, Septiferninae, Crenellinae, Dacrydiinae e Lithophaginae) e a segunda em quatro (Modiolinae, Bathymodiolinae, Limnoperninae e Aulacominae). A divergência entre as duas famílias é de 37%. Entre subfamílias de Mytilidae variaram de 16-42%, e entre as subfamílias de Modiolidae variaram de 9-25%. Mytiloidea é um grupo muito antigo, o que possivelmente contribui para o acumulo de muitas mutações e consequentemente para os altos valores de divergência encontrados. Diversas características dentro do grupo são tratadas como sendo fruto de convergências evolutivas, o que ao longo do tempo gerou classificações inconsistentes dos grupos internos. Sugerimos aqui que algumas dessas características tratadas como convergências, são retenções de caracteres ancestrais. A partir da visão filogenética proposta aqui, uma nova visão da história evolutiva de Mytiloidea pode ser abordada.

1. Introdução

A superfamília Mytiloidea Rafinesque, 1815 é representada pelos moluscos bivalves popularmente conhecidos como mexilhões, um grupo que apresenta grande plasticidade ecológica e ocupa nichos que variam desde ambientes dulcícolas até fossas abissais (Distal, 2000; Plazzi et al., 2011; Morton, 2015). Os fósseis mais antigos de Mytiloidea datam da era Paleozóica, com surgimento dos primeiros grupos no Cambriano (Scarlato e Starobogatov, 1978; Morton, 2015), enquanto que os grupos viventes têm registros mais recentes de cerca de 420 mya (The Paleobiology Database, http://paleodb.org)

Mytiloidea foi morfologicamente descrita por Rafinesque (1815) com apenas uma família, Mytilidae. Porém, a organização dessa superfamília sofreu diversas modificações. Na primeira revisão, Soot-Ryen (1969) incluiu Mysidellidae, uma família extinta, e dividiu Mytilidae em 4 subfamílias (Mytilinae, Crenellinae, Lithophaginae e Modiolinae), como cicatriz do músculo adutor, posição e característica da lúnula, entre outras características morfológicas associadas diretamente à concha.

Desde então, vários trabalhos se propuseram a revisar ou reclassificar o grupo, inserindo ou dividindo Mytiloidea em várias famílias, subfamílias, grupos fósseis e viventes, baseando-se em dados morfológicos, principalmente da concha. Os autores, no entanto, não justificaram a inclusão ou exclusão de grupos nas novas classificações apresentadas, sendo muitas vezes questionadas por se tratar, basicamente, de uma visão subjetiva de cada autor. Como exemplo, a família fóssil Mysidellidae, incluída em Mytiloidea na primeira revisão do grupo (Soot-Ryen, 1969), não foi mencionada nas revisões de Scarlato e Starobogatov (1979a, 1979b). Em revisões posteriores (Amler, 1999), Mysidellidae foi mantida em Mytiloidea, mas, desde 2011, foi relocada para a superfamília Ambonychioidea (Carter et al., 2011), e assim mantida desde então.

Dentre as famílias viventes, inúmeras foram as mudanças na classificação ao longo do tempo. A subfamília Crenellinae foi considerada uma subfamília de Mytilidae por Soot-Ryen (1969) e Bieler e Mikkelsen (2006). Porém, outros autores a consideraram com status de família, com três subfamílias (Crenellinae, Arcuatulinae, Limnoperninae) por Scarlato e Starobogatov (1979a, 1979b) ou com duas subfamílias (Crenellinae e Musculinae), por Carter et al. (2011). A família Lithophagidae também sofreu diversas alterações na sua classificação. Scarlato e Starobogatov (1979a, 1979b) consideraram como uma família valida subdividida em três subfamílias (Lithophaginae, Botulinae e Modiolinae), enquanto Bieler e Mikkelsen (2006) e Carter et al. (2011) a consideram como subfamília de Mytilidae. A família Septiferidae Scarlato e Starobogatov 1979 foi descrita com uma única subfamília, Septiferninae; desce à categoria de subfamília de Mytilidae por (Bieler e Mikkelsen, 2006); e posteriormente sobe ao nível de família, com duas subfamílias Septiferninae e Lithophaginae por Carter et al. (2011). Outro táxon que sofreu diversas modificações na classificação Jfoi Modiolinae, considerada como subfamília de Lithophagidae (Scarlato e Starobogatov, 1979a, 1979b) ou de Mytilidae (Bieler e Mikkelsen, 2006; Carter et al., 2011).

O único consenso dentro de Mytiloidea é a família Mytilidae, que em todas as revisões manteve o nível de família. Entretanto, a composição dessa suposta família

sofreu diversas modificações, com quatro subfamílias (Mytilinae, Perninae, Adulinae e Brachidontinae) por Scarlato e Starobogatov (1979a, 1979b); oito subfamílias, (Mytilinae, Bathymodiolinae, Crenellinae, Dacrydiinae, Limnoperninae, Lithophaginae, Modiolinae e Septiferninae) por Bieler e Mikkelsen (2006) ou cinco subfamílias (Mytilinae, Arcuatulinae, Bathymodiolinae, Lithophaginae e Modiolinae) por Carter et al. (2011).

Apesar dos vários esforços, os métodos e critérios utilizados para gerar as classificações de Mytiloidea produziram visões distintas dos grupos (Morton, 2015), além da falta de um estudo que tentasse recuperar as relações e validade dos grupos, sob um contexto filogenético. São poucos os exemplos na literatura de trabalhos que testaram a monofilia de Mytiloidea, e entre os disponíveis foram utilizados poucos gêneros.

Distel (2000) foi pioneiro em utilizar a filogenética molecular para entender as relações evolutivas de Mytiloidea e confirma o monofiletismo de Mytiloidea e não resolveu as relações das linhagens internas. Esse trabalho recebeu diversas críticas (Chichvarkhin, 2002) por utilizar apenas seis dos cerca de 30 gêneros reconhecidos e um gene nuclear (subunidade 18S do DNA ribossomal).

A fim de resolver as relações evolutivas de vários grupos de bivalves Plazzi et al. (2011) utilizaram a sequência de quatro genes mitocondriais e confirmaram o monofiletismo de Mytiloidea, a posicionaram como basal na subclasse Pteriomorphia, mas não resolveram as relações internas de Mytiloidea ou a validade das famílias e subfamílias.

Alguns trabalhos focaram na definição das relações filogenéticas entre grupos menores da superfamília, e não tiveram como objetivo mostrar uma visão global das relações filogenéticas dos gêneros e famílias de Mytiloidea. Por outro lado, tais trabalhos foram uteis para resolver incongruências e permitiu abordagens robustas em alguns grupos pontuais de taxonomia complexa, cujas relações tinham sido pouco esclarecidas com estudos morfológicos.

Em seu estudo para definir as relações evolutivas dos mexilhões de mar profundo, Samadi et al. (2007) utilizaram quatro marcadores mitocondriais e nucleares e embora falharam em recuperar as relações entre os gêneros *Bathymodiolus*, *Gigantidas*, *Idas* e *Adipicola*, confirmaram que se trata de um grupo monofilético. Miyazaki et al. (2010), por sua vez, utilizaram dois genes mitocondriais e recuperaram que os gêneros *Bathymodiolus* e *Gigantidas* são parafiléticos. O paralelismo desses gêneros também foi confirmado por Rift et al. (2012) que utilizaram dados morfológicos e moleculares.

No único estudo que tenta resolver a posição do gênero *Perna*, Wood et al. (2006) utilizaram três marcadores molecular (dois genes nucleares e um mitocondrial) e três gêneros (*Perna*, *Aulacomya* e *Mytilus*) e confirmaram o monofiletismo do gênero, irmão de *Mytilus*. Para o gênero *Brachidontes*, Trovant et al. (2014) recuperaram os *Geukensia* e *Ischadium* como irmãos de *Brachidontes*. Contudo, o foco em grupos específicos nesses trabalhos não permite uma visão global das relações filogenéticas dos gêneros e famílias de Mytiloidea.

Recentemente, diante de tantas incertezas na classificação de Mytiloidea, Morton (2015) se propôs em revisar a classificação de diversos grupos, embora não tenha se preocupado em testar a validade filogenética dos possíveis táxons. Esta nova classificação

foi baseada em um novo caráter morfológico, a relação entre a localização do pericárdio e as posições e arranjos das unidades do músculo posterior retrator do bisso, e definiu quatro famílias: Mytilidae (Mytilinae, Brachidontinae, Botulinae, Adualinae, Lithophaginae e Septiferinae), Modiolidae, Musculidae (Modiolinae, Arcuatulinae, Bathymodiolinae e Limnoperninae) e Crenellidae (Crenellinae e Dacrydiinae). O autor ainda sugere que alguns grupos de Mytiloidea tenham características morfológicas convergentes, o que pode ser responsável pelas diversas classificações equivocadas e a ausência de dados filogenéticos (morfológicos e moleculares) que objetivam esclarecer as relações evolutivas de Mytiloidea, bem como de consenso no uso e interpretação de dados morfológicos, tornam a classificação dos grupos internos de Mytiloidea extremamente controversa.

Nesse sentido, o presente estudo pretendeu responder algumas questões abertas, como (1) o monofiletismo de Mytiloidea é confirmado em um estudo mais abrangente? (2) os grupos propostos por Morton (2015) são válidos sob um enfoque filogenético? (3) a relação entre a localização do pericárdio e as posições e arranjos das unidades do músculo pode ser confirmada como é um caráter diagnóstico dos grupos ou fruto de convergência? Para tanto, foram utilizadas as sequências disponíveis de três genes (um mitocondrial e dois nucleares) de 22 gêneros de Mytiloidea para realizar a análise mais abrangente até o momento em um contexto filogenético.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra

O presente estudo utilizou 185 sequências obtidas do Genbank, sendo 91 do gene Citocromo oxidase subunidade 1 (COI), com 431-681 pb, 37 sequências de ITS1 (*Internal transcribed spacer 1*) com 299-689 pb e 57 sequências de 18S (RNA ribossomal 18S) com 415-1813 pb (Anexo 1). Além disso, foram geradas as sequências de dois exemplares de *Perna perna*, provenientes de Vitória – ES e Búzios – RJ), totalizando 42 espécies e 22 de aproximadamente 50 gêneros que já foram descritos. O grupo externo foi composto por sequências obtidas do Genbank de oito gêneros de três subclasses: Pteriomorphia: *Ostrea e Crassostrea* (Ostreoidea), *Isognomon* (Pterioidea), *Pecten* (Pectinoidea); Palaeoheterodonta: *Venustaconcha* e *Elliptio* (Unionoidea); Heterodonta: *Venerupis* (Veneroidea) e *Astarte* (Crassatelloidea). Segundo Plazzi et al. (2011), Ostreoidea, Pterioidea, Pectinoidea, são superfamílias de Pteriomorphia, proximamente relacionadas com Mytiloidea; Heterodonta é grupo irmão de Pteriomorphia e Palaeoheterodonta é grupo irmão de Pteriomorphia e Palaeoheterodonta é grupo irmão de Pteriomorphia.

2.2. Extração, amplificação e sequenciamento

Dois espécimes de tiveram o DNA foi extraído a partir de amostras de brânquias, conservadas em etanol 70%, seguindo o protocolo de extração salina padrão salino (SDS/NaCl/Proteinase K) descrito por Bruford et. al. (1992). O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com BlueJuice® (Invitrogen, EUA) e Gel Red. e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scietific). O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) foi amplificado por meio da Reação em Cadeia

da Polimerase (PCR) em um termociclador (Gene AMP® PCR System 9700) utilizando os primers LCO1490 e HCO2198 (Folmer et al., 1994) gerando um fragmento de cerca de 700 pb. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo: 2,5 µl de tampão, 1,5 μl de MgCl₂ (50mM), 0,4 μl de dNTP (10mM), 0,3 μl de cada primer (10 μM), 0,1 μl de Taq (5U/μl) e 1,0 μl de DNA molde. O perfil da PCR seguiu as etapasofreu algumas alterações a fim de eliminarem-se as bandas inespecíficas: (1) desnaturação da dupla fita do DNA a 94° C por dois minutos 120 seg (pré-desesnaturação); (2) 28 ciclos de 94°C por um minuto60 seg (desnaturação), 54°C por um minuto60 seg (anelamento), 72° C por um minito e 45 segundos 105 seg (elongação); (3) um período de extensão final a 72° C por cinco 5 minutos. Para verificar o sucesso da amplificação pela PCR, 2μL de cada produto de PCR amplicon foi misturado com 1 µl de BlueJuice® (Invitrogen, EUA) e, acrescido de Gel Red, foi e submetido a uma eletroforese em gel de agarose 2 % a 90 V por 50 minutos. Os amplicons foram purificados utilizando o Kit ExoSAP-IT® (USB Corporation), conforme o protocolo do fabricante. Os produtos da PCR foram sequenciados no Núcleo de Genética Aplicado à Conservação da Biodiversidade (NGACB) no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em um sequenciador automático ABI 3500 (Aplied Biosystems). Esses sequenciamentos utilizaram o kit Big Dye v3. 1 (Applied Biosystems) e os mesmos primer forwards da PCR em um sequenciador automático, ABI 3500 (Aplied Biosystems). As sequências geradas foram submetidas à ferramenta BLAST para verificar se as mesmas correspondiam ao grupo de interesse.

2.3. Análise dos dados

As sequências do COI foram alinhadas no programa Geneious através do ClustalX v2.0 (Larkin et al., 2007), utilizando-se valores padrões nos parâmetros de alinhamento, juntamente com o alinhamento manual para a conferência de possíveis incongruências na matriz de dados. O grau de saturação das sequências foi analisado através do programa DAMBE 5.0.23 (Xia e Xie, 2001) através do teste de Xia (Xia et al., 2003). As sequências de ITS1 e 18S foram alinhadas utilizando a ferramenta de alinhamento MAFFT (v.7; http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html) usando o parâmetro Q-INS-i. Foram geradas matrizes independentes para cada gene, e as extremidades contendo inconsistências foram eliminadas. Em seguida, foi gerada uma matriz concatenada com os três genes e uma matriz individual para cada gene. Totalizando quadro matrizes de dados.

Para as hipóteses filogenéticas com base em critérios de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB), o modelo evolutivo mais adequado para cada análise foi determinado pelo JModeltest v0.1 (Posada, 2008). As árvores da análise de ML foram geradas através da plataforma RaxML (Stamatakis 2014), na plataforma CIPRES (https://www.phylo.org/portal2). As árvores obtidas pela Inferência Bayesiana (IB) foram construídas pelo programa Mr.Bayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As cadeias de Markov foram conduzidas com 10 milhões de gerações com *burn-in* de 25%, amostrando a cada cem gerações e utilizando o modelo evolutivo proposto pelo Jmodeltest (Posada, 2008).

A diferenciação genética entre os grupos e dentro deles foi avaliada a partir dos cálculos de diferenças par-a-par entre as sequências do gene COI (estatística-Φ), utilizando-se o modelo de Kimura 2-parâmetros (K2P), com correção de gama e testada com 10.000 permutações no programa MEGA 6.

3. Resultados

As matrizes, por gene, foram formadas por 37 sequências com 1197 pb da região ITS1 e 57 sequências com 2010 pb do gene 18S. Para o gene COI, devido à retirada da terceira posição do códon por causa de saturação, as 91 sequências com 765 pb foram resumidas a 508 pb. A matriz com todos os dados concatenados resultou em 92 sequências com 3715 pb. O melhor modelo evolutivo para cada conjunto de dados (COI, ITS1 e 18S) foram GTR+G, GTR+G e K80, respectivamente. As análises se basearam nas árvores com dados concatenados e, como a topologia nas análises de ML e IB foram semelhantes, todas as figuras serão representadas com as árvores de IB.

Em todas as reconstruções filogenéticas a superfamília Mytiloidea foi recuperada como monofilética (Figura 1), com alto suporte (ML=91-99%, IB= 99-100%).

Levando em consideração a formação dos agrupamentos monofiléticos na árvore com dados concatenados e a divergência genética do gene COI, foi possível verificar a formação de dois agrupamentos em Mytiloidea, sendo o grupo A com 25% e o grupo B com 11% de divergência interna média. Os dois grupos divergem entre si em 37%. A divergência dos grupos A e B com cada grupo externo foi de 44% e 42%, respectivamente, com o grupo externo 1 (Pteriomorphia), e de 46% e 38%, respectivamente, com o grupo externo 2 (não Pteriomorphia).

O grupo A apresentou sete subclados, chamados de A1 a A7, com divergência genética variando de 16 a 42% (Anexo 2). As divergências dentro de cada subgrupo variaram de 5 % (A4), 7% (A1), 9% (A2 e A5) e 22% (A3), e devido ao baixo número amostral não foi possível calcular as divergências dentro dos grupos A6 e A7.

O grupo B está organizado em 4 subgrupos, compostos por representantes, ecologicamente diversos, com representantes de ambientes dulcícolas e estuarinos (*Limnoperna* e *Xenostrobus*) até gêneros altamente especializados de regiões profundas do oceano (*Bathymodiolus*, *Gigantidas*, *Adipicula*, *Idas*). As relações filogenéticas entre os subgrupos não foram bem estabelecidas. Os valores de divergência encontrados variaram de 9-25%, já as divergências internas dos grupos foram de 3% (B1), 8% (B2), 16% (B3) e 8% (B4).

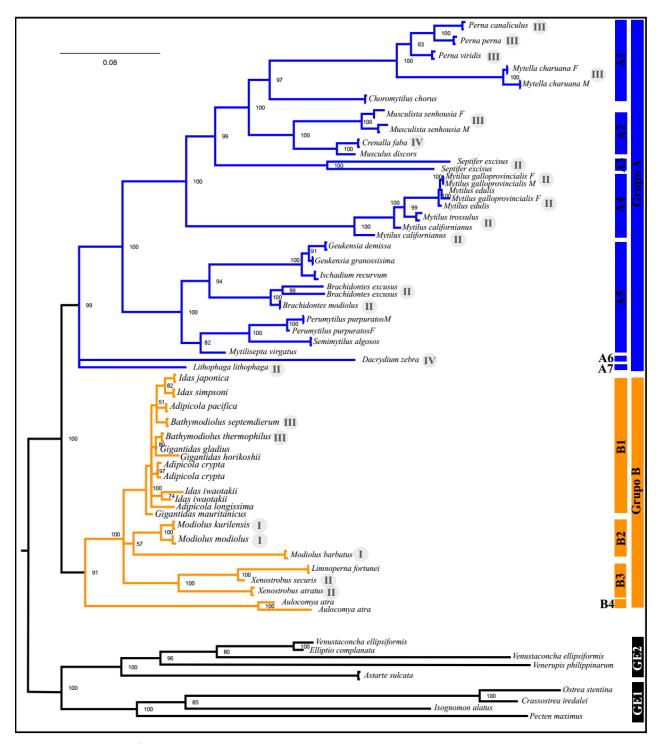


Figura 1 – Árvore filogenética Bayesiana da superfamília Mytiloidea baseada em três marcadores moleculares. Os números nos ramos representam a probabilidade à posteriori de cada ramo. O grupo externo GE1 representa a subclasse Pteriomorphia e GE2 as demais subclasses. No círculo cinza está indicada a classificação proposta por Morton (2015): I - Modiolidae, II - Mytilidae, III - Musculidae e IV – Crenellidae.

4. Discussão

4.1. Mytiloidea, um grupo monofilético.

Mytiloidea é um grupo muito antigo, com fósseis datando de mais de 400 mya (Morton, 2015), e os ramos da arvore são longos, revelando um grande acúmulo de mutações entre os grupos. Mesmo diante da recuperação do monofiletismo de Mytiloidea, a superfamília Pteriomorphia foi recuperada como parafilética.

Em uma visão mais ampla, o monofiletismo de Bivalve é aceito pela maioria dos autores, entretanto, a relações internas na classe ainda geram discussões (Combosch e Giribet, 2015). Exemplo disso, é a subclasse Pteriomorphia, cujo *status* monofilético é controverso (Combosch e Giribet, 2015). Filogeneticamente, Pteriomorphia, foi recuperada como monofilética por Plazzi et al. (2011), porém, nesse estudo, para esse monofiletismo ser confirmado, alguns grupos de outras subclasses foram inclusos em Pteriomorphia.

Dentro de Pteriomorphia, Mytiloidea foi recuperada por Plazzi et al. (2011) como monofilética e basal na subclasse, analisando para isso apenas os gêneros *Mytilus*, *Modiolus*, *Lithophaga* e *Musculista*. Além dessa grande abordagem de Plazzi et al. (2011), em todos os outros trabalhos com foco na filogenética molecular de representantes de Mytiloidea, o monofiletismo da superfamília foi confirmado (Distel, 2000; Miyazaki et al., 2004, 2010; Owada e Hoeksema, 2011; Samandi et al., 2007; Trovante et al., 2014), muito embora, em sua maioria, poucos gêneros foram analisados, não fornecendo robustez ao dado. O presente estudo utilizou o maior número de gêneros do grupo em um trabalho de filogenética, com 22 gêneros, representando o monofiletismo de Mytiloidea com os dados mais robustos até o momento.

Como o gene COI é utilizado na ferramenta de *Barcode of life* (Hebert et al., 2003), sua utilização é válida para conhecimento da diversidade entre grupos. Os valores de divergência do COI têm sido utilizados como parâmetros para orientar a delimitação de níveis taxonômicos. No presente estudo, a divergência genética do gene COI de 37% entre os grupos A e B é dado inédito na literatura, e bastante superior aos 17% encontrado para separação ao nível de família em moluscos gastrópodes (Kulsantiwong et al., 2013).

Desse modo, diante da composição dos dois grupos obtidos, podemos considerar que cada um desses grupos representa duas famílias distintas: Mytilidae e Modiolidae. A família Mytilidae corresponderia ao grupo A, que contém *Mytilus*, com divergência de 37% em relação à Modiolidae, grupo B, que contém *Modiolus*.

Mytilidae sempre foi reconhecida como uma família válida nos estudos de Mytiloidea, variando os gêneros que compõem a família a depender do autor e de quais caracteres morfológicos foram analisados (Carter et al., 2011; Morton, 2015; Scarlato e Starobogatov, 1979a). Nesses estudos os autores consideram a maioria dos gêneros do grupo com a morfologia semelhante à *Mytilus*, com presença de dentes no ligamento das conchas, o formato da concha, e por possuírem fixação através do bisso (Huber, 2010), reforçando a classificação da família Mytilidae, e que, no presente estudo, se organiza em sete grupos distintos, com alto suporte e níveis de divergência que variam de 16 a 42%.

Mesmo tendo sido considerada válida por todos os autores, a organização interna de Mytilidae sofreu diversas alterações dependo do autor e dos caracteres analisados, representada por várias subfamílias por ser a única família em Mytiloidea (Bieler et al., 2010; Soot-Ryen, 1969) ou por ter vários arranjos distintos, por ser uma dentre outras famílias de Mytiloidea (Scarlato e Starobogatov, 1979a; Morton, 2015).

Modiolidae, por sua vez, não foi considerada válida na maioria dos últimos trabalhos que revisaram Mytiloidea (Carter et al., 2011; Scarlato e Starobogatov, 1979a). Embora, a maioria dos autores reconheçam que alguns gêneros (ex. *Limnoperna*, *Modiolus*, *Bathymodiolus*) sejam morfologicamente distintos da maioria das espécies que compõem Mytilidae e com semelhanças morfológicas com *Modiolus*, esses gêneros foram classificados como Mytilidae (Bieler et al., 2010; Carter et al., 2011). Morton (2015), em contrapartida, foi um dos poucos a considerar Modiolidae como um grupo válido. Os representantes de Modiolidae no presente estudo estão organizados em quatro grupos distintos.

4.2. Mytilidae, uma família e sete subfamílias

Baseados nas análises filogenéticas, propomos pela primeira vez Mytilidae composta por sete subfamílias: Mytilinae, Perninae, Crenellinae, Septiferinae, Brachidontinae, Dacrydiinae e Lithophaginae. Exceto Dacrydiinae que ocorrem em águas mais profundas e Lithophaginae, essencialmente animais com hábito de furadores de pedra, os demais têm como características serem filtradores marinhos, de regiões de água rasa.

Considerando que *Mytilus* está no subgrupo A4, este pode ser reconhecido como subfamília Mytilinae. Analogamente, foi possível classificar os demais subgrupos pela presença dos gêneros-tipo: Perninae Scarlato e Starobogatov 1979 para o subgrupo A1 com *Perna*,; Crenellinae Gray, 1840 para o subgrupo A2 com *Crenella*; Septiferninae Scarlato e Starobogatov 1979 para o subgrupo A3 com *Septifer*; Brachidontinae F. Nordsieck, 1969 para o subgrupo A5 com *Brachidontes*; Dacrydiinae Ockelmann, 1983 para o subgrupo A6 com *Dacrydium* e Lithophaginae H. Adams & A. Adams, 1857 para o subgrupo A7 com *Lithophaga* (Figura 2).

Entretanto, confrontando a organização filogenética aqui obtida com as proposições morfológicas dos grupos representados, é difícil associar sinapomorfias morfológicas a cada clado, já que os estudos que se propuseram a analisar os caracteres morfológicos não apresentam consenso quanto ao caráter morfológico que melhor distingue cada grupo (Morton, 2015; Scarlato e Starobogatov, 1979a). À luz da filogenética, todas as organizações de gêneros que compõem as subfamílias definidas por caráteres morfológicos formam grupos parafiléticos.

Morton (2015) não reconhece Perninae como subfamília de Mytilidae, e insere Crenellinae e Dacrydiinae na família Crenellidae. Para o autor, Crenellinae e Dacrydiinae são grupos irmãos e compõem uma família distinta (Crenellidae). No presente estudo não há suporte para considerá-las irmãs, uma vez que Crenella (Crenellinae) é grupo irmão de Perninae, enquanto que Dacrydiinae é grupo mais basal no grupo.

Ainda, Morton (2015) considera duas outras subfamílias, Botulinae (gênero *Botula*) e Adulinae (gênero *Adula*) dentro de Mytilidae, porém representantes desses grupos não foram testados no presente estudo, o que nos leva a considerar que há possibilidade de que Mytilidae possa ter outras subfamílias filogeneticamente validas.

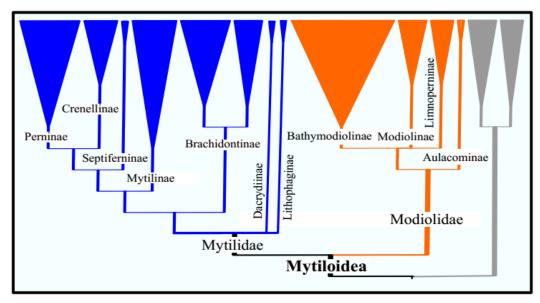


Figura 2 . Representação das divisões de Mytiloidea em duas famílias e suas subfamílias.

4.2.1. Perninae

Perninae é formada pelos gêneros monofiléticos *Perna*, *Mytella e Choromytilus*, recuperando *Perna* como irmão de *Mytella e Choromytilus* basal aos dois. A divergência genética dentro de *Perna* foi de 2% (*P. perna* x *P. canaliculus*) a 5% (*P. canaliculus* x *P. viridis*), enquanto que entre *Perna* e *Mytella* variaram de 5% (*P. viridis* x *M. charuana*) até 11% (*P. canaliculus* x *M. charuana*). A divergência entre *Choromytilus* e *Perna* variou de 7-9% e entre *Choromytilus* e *Mytella* de 7-12%. Perninae é distinto dos demais grupos de Mytilidae por 16 a 41% (Anexo 2).

Perninae foi considerada subfamília apenas por Scarlato e Starobogatov (1979a), enquanto os demais autores posicionam os representantes da subfamília em outros agrupamentos: *Perna* e *Mytella* como gêneros de Musculinae (Morton, 2015); *Perna* em Mytilinae (Huber, 2010) e *Mytella* em Arcuatulinae (Huber, 2010).

Embora seja consenso quanto ao monofilestismo do gênero *Perna* (Woods et al., 2007, presente estudo), Uliano-Silva et al. (2015) recuperam o gênero *Perna* como parafilético ao utilizar dados de mitogenômica. Morton (2015) recuperou *Perna* como um clado antigo, datando de 200 Mya e entender a história evolutiva de grupos tão antigos pode ser difícil.

Um dado inédito do presente estudo, no entanto, foi encontrar a relação de gêneros irmãos entre *Perna* e *Mytella*. Além do fato de que em várias revisões morfológicas (Huber, 2010; Scarlato e Starobogatov, 1979a) os dois gêneros não foram considerados como pertencentes à mesma subfamília. Além disso, no gênero *Mytella* é observado o

fenômeno da dupla herança uniparental, conhecido como DUI (Souza et al., 2014), enquanto que em *Perna* esse fenômeno não é observado (Weber et al., 2009, presente estudo, dados não apresentados). Assim, fica evidente que grupos filogeneticamente próximos e antigos, podem acumular diferenças significativas, tanto morfológicas quanto fisiológicas, dado o caminho evolutivo distinto ser bastante longo.

4.2.2. Crenellinae

Crenellinae é formada por *Musculus*, *Crenella e Musculista*, recuperando os dois primeiros como irmãos e *Musculista* basal em relação a eles, sendo reconhecido aqui como a subfamília Crenellinae. *Crenella e Musculus* são mais relacionados entre si, com 4% de divergência, enquanto que *Crenella e Musculista* apresentam 11-13% de divergência e *Musculista* e *Musculus* mostram 12-15%. Crenellidae difere das demais subfamílias de Mytilidae por 25-42% de divergência (Anexo 2).

A relação próxima entre *Crenella* e *Musculus* já foi relatada em alguns trabalhos (Distel, 2000; Huber, 2010), todos dentro de Crenellinae. No entanto, Carter et al. (2011) consideraram *Musculus* em uma subfamília distinta (Musculinae) e irmã de Crenellinae, ambas na família Crenellidae. Morton (2015) por sua vez, considera *Musculus* e *Crenella* em famílias distintas (Musculidae e Crenellidae).

Morfologicamente *Crenella* e *Musculus* possuem semelhanças como o fato da concha ser oval ou dorso-ventralmente alongadas, o que é considerado por alguns trabalhos suficiente para agrupar esses clados como grupos irmãos (Carter et al., 2011; Huber, 2010). Ecologicamente, em geral ocupam a zona sublitoral (Huber, 2010), o que contribui para corroborar as relações filogenéticas aqui recuperadas.

O gênero *Musculista*, em contrapartida, embora relacionado com Crenellinae por Scarlato e Starobogatov (1979a), não é classificado por outros autores como pertencente à essa subfamília. Carter et al. (2011) consideram *Musculista* incluso em Arcuatulinae, subfamília de Mytilidae, enquanto Morton (2015) sugere que *Musculista* seja relacionado com as subfamílias Limnoperninae e Bathymodiolinae. Por não haver consenso quanto aos critérios morfológicos que classificam *Musculista*, entendemos que seu posicionamento filogenético aqui apresentado pode auxiliar na busca de sinapomorfias para o grupo morfologicamente não relacionado, mas que compartilham uma história evolutiva comum.

4.2.3. Septiferinae

Septiferinae é composto por *Septifer excisus*, que foi recuperado como monofilético com alto suporte, ramos profundos, e basal em relação aos grupos Perninae e Crenellinae, divergindo dos demais por 28-35% (Anexo 2).

A subfamília Septiferninae tem sido inserida em duas famílias distintas, Septiferidae (Scarlato e Starobogatov, 1979a; Carter et al., 2011) e Mytilidae (Morton, 2015). Septiferidae é reconhecida devido às diferenças morfológicas, principalmente na presença de um septo interno na concha, distinto de todos outros grupos; enquanto que sua inserção em Mytilidae é graças às relações do músculo adutor com a cavidade

pericárdica. Como o presente estudo posiciona filogeneticamente *Septifer* dentro de Mytilidae, não há suporte para validar a família Septiferidae.

Filogeneticamente, o comprimento dos ramos de Septiferninae indica o grande acúmulo de mutações, corroborado pelos valores de divergência altos com os grupos filogeneticamente mais próximos. *Septifer* possui características evolutivas que podem ter possibilitado o sucesso do grupo e Seed e Richardson (1998) discutem sobre as modificações fisiológicas e morfológicas que garante a capacidade desse gênero ocupar ambientes muito exposto à energia das ondas, o que provavelmente trouxe modificações importantes para o grupo, distinta dos grupos próximos.

4.2.4. Mytilinae

Mytilinae é formada exclusivamente pelo gênero monofilético *Mytilus*, embora tenha apresentado algumas espécies parafiléticas (*M. californianus*, *M. edulis e M. galloprovincialis*). A divergência entre Mytilinae e os demais grupos em Mytilidae foi de 25-42% (Anexo 2). O gênero *Mytilus* é encontrado no registro fóssil datando de 202-427 mya (Morton, 2015; The Paleobiology Database), o mais antigo dentre os gêneros de Mytiloidea.

Historicamente, alguns dos grupos que compõem Mytiloidea são reconhecidos como tendo forma de *Mytilus* (Huber, 2010; Owada, 2007). Em geral esses grupos são reconhecidos como sendo a família Mytilidae. A idade do gênero *Mytilus* no registro fóssil, corrobora a ideia de que a irradiação de Mytilidae ocorreu a partir de um ancestral *Mytilus*.

A semelhança morfológica de algumas espécies de Mytiloidea com o gênero *Mytilus* fez com que diversos autores classificassem outros gêneros dentro de Mytilinae. Huber (2010) considerou o gênero *Perna* relacionado com *Mytilus*. Newell (1969) sugeriu que o gênero *Hormomya* (=*Brachidontes*) também fizesse parte da subfamília Mytilinae, divisão que já havia sido recuperada como parafilética (Distel, 2000) e foi reforçada no presente estudo.

Contudo, as relações aqui obtidas, indicaram a não validade filogenética de algumas relações morfologicamente já sugeridas. Morton (2015) sugere que as semelhanças morfológicas e ecológicas de alguns grupos dentro de Mytiloidea sejam frutos de convergências. Especificamente em Mytilidae, Morton (2015) sugere que a ocupação do mesmo ambiente (costões rochosos) por *Brachidontes*, *Mytilus* e *Septifer* seja fruto de convergência e que a adaptação desses grupos a essa forma de vida tenha levado a convergência morfológica.

Além da possibilidade de muitas características morfológicas em Mytilidae serem fruto de convergências ou de retenção de caracteres ancestrais (assunto trato a frente), há evidências de que a irradiação morfológica e ecológica foi rápida em Mytilidae, pois verifica-se o surgimento de grupos, como Lithophaginae, com características morfológicas e ecológicas derivadas (animais cavadores de rocha), cujo registro fóssil datando de 229-359 mya (Morton, 2015), pouco tempo depois do surgimento de *Mytilus*.

Desse modo, as relações filogenéticas baseadas em dados moleculares reforçam, desde trabalhos pioneiros como Distel (2000) até o presente estudo, que as semelhanças

morfológicas de alguns grupos com *Mytilus*, e consequentemente, Mytilinae, são fruto de convergências e não estão relacionadas com uma história evolutiva compartilhada. Além disso, em ambos trabalhos (Distel, 2000; presente estudo) Mytilinae é recuperada como monofilética apenas com o gênero *Mytilus*.

4.2.5. Brachidontinae

Esta subfamília é composta por *Brachidontes*, *Ischadium*, *Geukensia*, *Perumytilus*, *Semimytilus* e *Mytilisepta*, sendo todos os gêneros monofiléticos, com divergência intergenérica variando de 2 a 15%. *Mytilisepta virgata* foi basal aos gêneros *Perumytilus* e *Semimytilus*, com distância de 10% com *Semimytilus* e de 6-11% com *Perumytilus*. A distância entre *Perumytilus* e *Semimytilus* é de 4-9%. *Brachidontes* é grupo irmão de *Geukensia* e *Ischadium*, com distância intergenérica de *Ischadium* de 15 a 4% e de *Geukensia* de 12 a 8%. *Geukensia* e *Ischadium* divergem entre si por 4-2%.

Brachidontinae sempre foi considerada uma subfamília de Mytilidae, tanto baseado em caracteres associados a concha (Scarlato e Starobogatov, 1979a; Soot-Ryen, 1969), caracteres de morfologia interna (Morton, 2015) e por dados de sequência de DNA (Trovant et al., 2015; Distel, 2000, presente estudo).

Historicamente, *Brachidontes*, *Geukensia*, *Ischadium*, *Perumytilus* foram considerados morfologicamente relacionados por possuírem características da ornamentação da concha como, nervuras radiais, triangulares, além de características associadas aos dentes do ligamento (Trovant et al., 2015).

Outros dois gêneros têm um passado de classificações taxonômicas incerto. Semimytilus foi classificado morfologicamente como Mytilinae, contudo, a ausência de dentes no ligamento da concha, característica amplamente utilizada para classificação morfológica, gera controvérsias sobre as relações de parentesco do gênero (Huber, 2010). Mytilisepta foi considerado um gênero de Septiferinae por diversos autores (Scarlato e Starobogatov,1979a; Huber, 2010), sendo Mytilisepta virgatus um sinônimo de Septifer virgatus (World Register of Marine Species). Contudo, Trovant et al. (2015) já haviam recuperado Mytilisepta em Brachidontinae e distante do gênero Septifer.

Reforçamos assim, a validade de Brachidontinae como uma subfamília de Mytilidae, e estabelecemos uma relação filogenética entre esse grupo e os demais, possibilitando o entendimento futuro das relações evolutivas do grupo.

4.2.6. Dacrydiinae

Dacrydiinae é representada por *Dacrydium zebra*, e embora não tenha sido obtido o suporte na relação basal desse grupo, foi possível recuperá-lo dentro de Mytilidae, com valores de divergência para os demais grupos de Mytilidae de 39-48%. Originalmente a subfamília Dacrydiinae Ockelmann, 1983 foi descrita com somente um gênero, e embora tenha sido usada apenas uma espécie de *Dacrydium* no presente estudo, esse grupo se posicionou com alto suporte (IB=99%) em Mytilidae. As características morfológicas como a ausência de concha nacarada e a ausência do segundo ligamento na concha permitem a identificação dos *Dacrydium*.

Os autores que consideraram Dacrydiinae uma subfamília válida (Ockelmann, 1983; Morton, 2015; Bieler et al., 2010) sugeriram a relação desse grupo com a subfamília Crenellinae. Ockelmann (1983), além de descrever morfologicamente a subfamília Dacrydiinae, também indica peculiaridades ecológicas do grupo, principalmente a ocorrência de algumas espécies em profundidades de até 40m, hábito diferente dentro de Mytilidae. No registro fóssil, *Dacrydium* é um grupo recente, datando de 66-72 mya (Morton, 2015, The Paleobiology Database). Contudo, sua posição filogenética basal a grupos muito antigos como Mytilinae sugere que *Dacrydium* descenda de uma linhagem mais antiga não amostrada, ou que já tenha sido extinta. Ainda é possível observar que, filogeneticamente, a profundidade dos ramos desse clado indica um grande acumulo de mutações, corroborando a ideia de que Dacrydiinae descenda de uma linhagem mais antiga.

4.2.7. Lithophaginae

Lithophaginae é composta por *Lithophaga lithophaga*, e embora sua relação em relação às demais subfamílias de Mytilidae não tenha sido esclarecida, o suporte para sua inclusão família é alto (IB=99%). Os valores de divergência de Lithophaginae para as demais subfamílias variaram de 31-42% (Anexo2).

O gênero *Lithophaga*, pertencente à subfamília Lithophaginae, possui o hábito mais distinto dentro de Mytilidae, sendo reconhecidos como animais cavadores de pedra e de corais mortos (Morton 2015), característica compartilhada com o gênero *Leiosolenus* (gênero não amostrado nesse trabalho). Além do habito diferente do restante de Mytilidae, esses gêneros possuem a concha alongada e diferente do "padrão" *Mytilus*. Contudo, mesmo diante de diferenças significativas, esses gêneros costumeiramente foram classificados em Mytilidae, exceto por Scarlato e Starobogatov (1979a), que consideraram Lithophagidae como uma família válida para agrupar esse grupo.

Owada et al. (2006) identificaram que *Lithophaga* e *Leiosolenus* são monofiléticos, embora não sejam gêneros irmãos. Assim, em uma proposta hipotética de se incluir os moluscos com hábitos de cavadores de pedra em um único grupo, a subfamília Lithophaginae seria recuperada como parafilética. Assim, abortando a proposta, Lithophaginae é composta apenas do gênero *Lithophaga*, como recuperado no presente estudo, e *Leiosolenus* seria recuperado como possivelmente uma nova subfamília em Mytilidae.

4.3. Modiolidae, de rios a mares profundo

No presente estudo, Modiolidae está sendo proposta pela primeira vez como uma família com quatro subfamílias, cada qual formada por um agrupamento monofilético, com alto suporte (IB=91-100%), muito embora não tenha sido possível recuperar as relações hierárquicas entre os grupos. A subfamília Modiolinae G. Termier & H. Termier, 1950 foi recuperada por conter *Modiolus* no subgrupo B2; Bathymodiolinae Kenk e B.

R. Wilson, 1985 é reconhecida por conter *Bathymodiolus*; Limnoperninae Scarlato e Starobogatov, 1979a é reconhecida por conter *Limnoperna* no subgrupo B3, e o subgrupo B4 contém *Aulacomya*, gênero que não é tipo de nenhuma subfamília já descrita (Figura 2).

Similar ao observado em Mytilidae, as classificações morfológicas são, na maioria, parafiléticas quando comparadas com a recuperação filogenética aqui apresentada, sendo difícil associar qualquer possível sinapomorfia morfológica.

Morton (2015), por exemplo, não reconhece a presença de Limnoperninae e Bathymodiolinae dentro de Modiolidae, considerando apenas Modiolinae como subfamília válida. Ainda, Morton (2015) levanta dúvidas sobre o monofiletismo de *Modiolus* indicando que algumas espécies do gênero possam estar mais próximas de outros gêneros (*Modiolus striatulus* mais próximo dos gêneros *Perna* e *Musculista* do que de outros *Modiolus*).

Muito embora a classificação de Modiolidae proposta por Morton (2015) não apresente as mesmas subfamílias como as que foram recuperadas no presente estudo, para ele Bathymodiolinae e Limnoperninae são classificadas como sendo subfamílias próximas, dentro de outra família (Musculidae).

4.3.1 Bathymodiolinae

Em Bathymodiolinae foram agrupados os gêneros *Bathymodiolus*, *Adipicula*, *Idas* e *Gigantidas* com alto suporte, embora a relação interna entre eles não tenha sido esclarecida. Filogeneticamente, é um grupo com pouca divergência (9 a 25% dos demais grupos de Modiolidae) e com ramos curtos.

Os quatro gêneros do grupo correspondem aos animais de mar profundo, colonizadores de ossos e que tem relação simbiótica com microrganismos (Miyazali et al., 2010; Samadi et al., 2007). Morfologicamente, possuem semelhanças ao gênero *Modiolus* (Huber, 2010) e é reconhecido em diversos trabalhos como um grupo válido (Bieler et al., 2010; Carter et al., 2011; Morton, 2015).

Em seu estudo, Miyazali et al. (2010) recuperaram a subfamília com alguns gêneros parafiléticos, sendo a idade do grupo de cerca de 20 mya. Morton (2015) também mostrou que esse grupo é recente quando comparado com outros grupos como Modiolinae e Mytilinae, o que explica a pouca divergência dentro do grupo e os ramos tão curtos.

4.3.2. Modiolinae

Modiolinae é composta exclusivamente pelo gênero *Modiolus*, recuperado como monofilético, embora não seja possível determinar se filogeneticamente ele é mais relacionado com o grupo Bathymodiolinae ou Limnoperninae. A divergência entre Modiolinae e Limnoperninae foi de 17%, enquanto que entre Modiolinae e Bathymodiolinae foi de 9%.

Diversos autores já consideravam esse grupo como uma subfamília válida (Scarlato e Starobogatov 1979a; Bieler et al., 2010; Carter et al., 2011). Segundo Morton (2015), alguns representantes de *Modiolus* foram inseridos em grupos distintos, sugerindo que uma revisão do gênero fosse realizada.

No presente estudo, *Modiolus* não foi recuperado como parafilético, como proposto por Morton (2015), entretanto o baixo suporte observado, indica que é necessária a revisão dos critérios apresentados por Morton (2015) e uma ampla revisão do gênero, baseado em caracteres moleculares e morfológicos para solucionar o *status* do gênero. *Modiolus*, assim como *Mytilus*, possui um amplo e antigo registro fóssil, com exemplares datando de cerca de 420 mya (Morton, 2015).

4.3.3. Limnoperninae

Em Limnoperninae, os gêneros *Limnoperna* e *Xenostrobus* foram recuperados como irmãos e, embora não seja possível estabelecer as relações de parentesco desse grupo com Bathymodiolinae e Modiolinae, a subfamília foi recuperada como monofilética.

Xenostrobus se mostrou parafilético, com *X. securis* mais próximo de *L. fortunei* do que de *X. atratus*. *L. fortunei* diverge de *X. atratus com* 24%, enquanto que a divergência entre *X. atratus* e *X. securis* é de 8%. Esse grupo apresenta ramos longos, o que indica um grupo antigo que acumulou uma grande quantidade de mutações ao longo do tempo. A distância de Limnoperninae para o grupo B4 foi de 25%.

Depois da ser descrita por Scarlato e Starobogatov (1979a), todas as posteriores revisões de Mytiloidea consideraram Limnoperninae como uma subfamília válida (Bieler et al., 2010; Carter et al., 2011; Morton, 2015). Contudo, as subfamílias irmãs de Limnoperninae nunca foram consenso. Scarlato e Starobogatov (1979a) consideraram Limnoperninae como subfamília irmã de Crenellinae, ambas inclusas em Crenellidae. Carter et al. (2011), por sua vez, consideraram-na subfamília irmã de Septiferninae, em Septiferidae.

Apenas na classificação de Morton (2015) Limnoperninae foi considerada próxima às subfamílias Modiolinae e Bathymodiolinae, como recuperado no presente estudo, sugerindo a proximidade de grupos que irradiaram para habitats incomuns em Mytiloidea, como a água doce em Limnoperninae e o mar profundo em Bathymodiolinae. Segundo Morton (2015), a capacidade de ocupar esses ambientes pode estar relacionada à modificações principalmente nos caracteres relacionados à morfologia interna que desempenha mudanças fisiológicas.

O gênero *Xenostrobus* foi recuperado como parafilético no presente estudo. Quando descrito pela primeira vez, *Xenostrobus securis* (Lamarck, 1819) foi considerado como sendo *Limnoperna securis* (Lamarck, 1819). Embora *L. securis* não seja considerado válido, alguns trabalhos ainda utilizam essa nomenclatura (Adarraga e Martínez, 2011). A recuperação filogenética aqui apresentada, indica que o gênero *Xenostrobus* seja parafilético, sendo *X. securis* espécie irmã de *Limnoperna fortunei*. Contudo, também baseados em dados moleculares, Colgan e Costa (2013) recuperaram *Xenostrobus* como monofilético, mas com relações internas do gênero pouco resolvidas.

Diante dessa incongruência entre os dados aqui recuperados e os apresentados por Colgan e Costa (2013), sugerimos que as relações dentro desse clado sejam analisadas em trabalhos com amostragem mais ampla e específicos pra o grupo.

4.3.4. Uma nova subfamília em Modiolidae?

Aulacomya atra foi recuperado como um grupo monofilético, basal às demais subfamílias de Modiolidae com suporte baixo de IB=91 e ML=52. A composição do gênero Aulacomya é motivo de discussão.

A princípio, Beu et al. (1997) indicaram que o gênero *Aulacomya* compreendia apenas *A. atra*, que se comportava como uma espécie em anel no hemisfério sul. Apenas anos depois (Beu, 2004), considerou que as diferenças morfológicas entre os grupos de cada localidade seriam suficientes para reconhecer espécies distintas. Atualmente são aceitas quatro espécies: *A. atra*, *A. maoriana*, *A. Capensis* e *A. regia* (Huber, 2010).

Historicamente, o gênero já foi considerado sinônimo de *Mytilus: Mytilus atra* Molina, 1782; *Mytilus decussatus* Lamarck, 1819 e *Mytilus diluculum* Mörch, 1874 (World Register of Marine Species). Embora ausente da maioria dos trabalhos que revisaram morfologicamente Mytiloidea, alguns trabalhos consideram o gênero pertencente *Aulacomya* à família Mytilidae (Diez et al., 2011). Os grandes trabalhos de revisão e classificação morfológica não revisaram as possíveis relações de *Aulacomya* com os demais grupos de Mytiliodea (Morton, 2015).

Uma possível contribuição para a classificação morfológica de *Aulacomya* veio de Kafanov e Drozdov (1998) que analisaram a morfologia do espermatozóide de alguns gêneros de Mytiloidea, afim de propor uma classificação para o grupo. Tais autores sugeriram que *Aulacomya* fosse um gênero pertencente a subfamília Modiolinae.

Entretanto, a subfamília Modiolinae proposta por Kafanov e Drozdov (1998) era composta por gêneros como *Choromytilus*, *Brachidontes*, *Septifer* e *Modiolus*, o que baseado nos dados filogenéticos aqui apresentados seria um grupo parafilético. Outras subfamílias propostas no mesmo trabalho também são parafiléticas quando comparadas como sugerido no presente estudo e possui poucas similaridades com outros estudos morfológicos, indicando que a estrutura do espermatozóide não fornece caráter homólogo para a classificação de Mytiloidea.

Assim, morfologicamente, nenhum trabalho conseguiu indicar de forma robusta a relação de *Aulacomya* com outros grupos, enquanto aqueles que classificaram *Aulacomya* em algum grupo foram baseados em caracteres não sinapomorficos.

Cariotipicamente, *Aulacomya atra* difere de outros grupos em Mytiloidea. Quiévreux (1984) descreve o cariótipo dessa espécie como tendo 2n= 26, sendo todos os cromossomos acrocêntricos e telocêntricos. Essa morfologia cariotípica de *Aulacomya atra* é muito diferente dos outros grupos de Mytiloidea, como por exemplo de *Perna perna* que possui 2n = 28 com cromossomos metacêntricos e acrocêntricos (Jacobí et al., 1990), do gênero *Mytilus* que apresenta um 2n=28 conservado nas espécies do grupo e com a maioria dos cromossomos sendo cromossomos metacêntricos, submetacêntrico e de *Xenostrobus securis* que apresenta um 2n=30 com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

Assim, diante das relações filogenéticas aqui obtidas, da alta divergência do gene COI e da falta de características morfológicas de incluam *Aulacomya* dentro de um grupo válido, indicamos que esse gênero pertence à uma subfamília não descrita, sugerimos o reconhecimento de Aulacominae dentro de Modiolidae.

4.4. Surgimento, irradiação e convergências morfológicas de Mytiloidea

Diversos autores (Kafanov e Drozdov, 1998; Morton, 2015) discutem a possibilidade de que *Modiolus* provavelmente é o gênero vivente mais próximo do ancestral de toda superfamília Mytiloidea, e que todos os grupos viventes irradiaram de um animal com forma de *Modiolus*.

Essa ideia era corroborada pelo registro fóssil, no qual animais com forma de *Modiolus* são bem antigos, datando de até 416 mya (Morton, 2015). Contudo, o registro fóssil também apresenta animais com forma de *Mytilus*, em datas similares ou até mais antigas (possivelmente até 427 mya), causando incertezas sobre qual a forma do ancestral da superfamília Mytiloidea. As duas famílias aqui estabelecidas, Mytilidae e Modiolidae, possivelmente representam o fruto da diversificação a partir desses depois tipos morfológicos.

Contudo, alguns gêneros dentro de Mytilidae e Modiolidae apresentam características morfológicas derivadas, e em alguns casos caraterísticas possivelmente convergentes, o que em classificações exclusivamente morfológicas pode levar a criação de grupos parafiléticos.

Exemplo disso, o gênero *Lithophaga* que no presente estudo aqui foi recuperado como Mytilidae, e que possuem características da concha tão derivadas que para Owada (2006) poderia representar uma terceira subdivisão morfológica, a dos animais com forma de *Lithophaga*. Entretanto, os estudos filogenéticos sugerem que essa forma derivada ocorreu devido à uma evolução morfológica e fisiológica rápida, à partir de um ancestral Mytilidae, ideia corroborada pela presença de *Lithophaga* no registro fóssil a cerca de 320-359 mya (Morton, 2015).

Outro problema recorrente em análises morfológicas de Mytiloidea é a possibilidade de vários caracteres serem frutos de convergências evolutivas e não representarem características homólogas. Dados morfológicos são amplamente utilizados para a classificação de diversos grupos, sendo responsáveis pela maior parte do conhecimento filogenético. Entretanto, caracteres morfológicos podem ser influenciados por convergências evolutivas (Scotland et al., 2003).

Morton (2015) apresenta algumas convergências evolutivas observadas por ele entre os gêneros de Mytiloidea, como por exemplo o mesmo hábito de "fazer ninhos" presente nos gêneros *Musculista* e *Amygadalum*, a já citada semelhança morfológica e ecológica dos gêneros *Mytilus*, *Brachidontes* e *Septifer*, a semelha da concha de *Fungiacava eilatensis* (gênero com habito semelhante a *Lithophaga*) com o gênero *Crenella*, dentre outros.

Em estudos morfológicos, essas características tratadas com convergências, podem ter influenciado classificações que propunham a proximidade entre gêneros que, filogeneticamente, não são grupos irmão.

Entretanto, sugerimos aqui que algumas dessas características tratadas como convergências possam ser retenções de caracteres ancestrais. Como ficou evidente, Mytiloidea é um grupo muito antigo, com muitas espécies ocupando nichos semelhantes e distribuídos por todo o globo.

A família Mytilidae, por exemplo, existe no registro fóssil a muito tempo, mantendo a mesma forma em diversos grupos viventes até hoje. Como sugerido por Morton (2015) se a forma dos gêneros *Mytilus*, *Septifer* e *Brachidontes* está diretamente relacionada ao hábito, possivelmente o ancestral *Mytilus* (fóssil mais antigo encontrado) também apresentavam a forma de vida semelhante. Desse modo, o surgimento a vida em costão rochoso, fixação com bisso e compartilhamento de caracteres morfológicos da concha para essa forma de vida são retenções da característica do ancestral. Antes de uma visão filogenética robusta, como a apresentada aqui, era difícil determinar quais relações seriam retenções de caracteres ou convergências.

Ainda assim, algumas características dentro de Mytiloidea realmente parecem ser fruto de convergências, como por exemplo, a redução da musculatura encontrada nos gêneros *Crenella* e *Dacrydium*, a semelhança de *Fungiacava eilatensis* com Crenella, evidenciado em Owada e Hoeksema (2011) e até mesmo as relações do músculo adutor com a cavidade pericárdica (figura 1).

Desse modo, a visão filogenética aqui apresentada, possibilita uma grande reinterpretação de Mytiloidea.

Tabela 1. Comparação entre as principais propostas de classificação de Mytiloidea e a sugestão de classificação proposta aqui. S= clado aceito, N= clado não aceito. * representa os grupos que não foram examinados nesse estudo.** indica a nova subfamília proposta nesse trabalho.

	Scarlato e Starobogatov (1979a)	Bieler et al., 2010	Carter et al.,	Morton, 2015	Presente estudo
Famílias	4	1	3	4	2
Mytilidae	S	S	S	S	S
Modiolidae	N	N	N	S	S
Septiferidae	S	N	S	N	N
Crenellidae	S	N	S	S	N
Musculidae	N	N	N	S	N
Lithophagidae	S	N	N	N	N
Subfamílias	11	8	9	12	10
Arcuatulinae	(Crenellidae)	N	(Mytilidae)	(Musculidae)	N
Adulinae	(Mytilidae)	N	N	(Mytilidae)	N*
Bathymodiolinae	N	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Musculidae)	(Modiolidae)
Botulinae	(Lithophagidae)	N	N	(Mytilidae)	N*
Brachidontinae	(Mytilidae)	N	N	(Mytilidae)	(Mytilidae)
Crenellinae	(Crenellidae)	(Mytilidae)	(Crenellidae)	(Crenellidae)	(Mytilidae)
Dacrydiinae	N	(Mytilidae)		(Crenellidae)	(Mytilidae)
Limnoperninae	(Crenellidae)	(Mytilidae)	(Septiferidae)	(Musculidae)	(Modiolidae)
Lithophaginae	(Lithophagidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)
Modiolinae	(Lithophagidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Musculidae)	(Modiolidae)
Musculinae	N	N	(Crenellidae)	N	N
Mytilinae	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)
Perninae	(Mytilidae)	N	N	N	(Mytilidae)
Septiferinae	(Septiferidae)	(Mytilidae)	(Septiferidae)	(Mytilidae)	(Mytilidae)
Aulacominae**	N	N	N	N	(Modiolidae)

5. Conclusão e implicações futuras

Mytiloidea é monofilético e dividido em duas possíveis famílias Mytilidae, Modiolidae. A classificação morfológica sozinha, mostrou-se mais uma vez insuficiente para entender a evolução do grupo, e nesse sentido de análises moleculares são uma importante ferramenta para ajudar a compreender a história evolutiva do grupo. Contudo, as incertezas nas relações de alguns grupos possivelmente só serão resolvidas com a utilização de abordagens mais amplas e com estudos que integrem abordagens moleculares modernas com estudos morfológicos. Morfologicamente, o desafio será encontrar caracteres homólogos, como o observado aqui, a morfologia interna pode representar um caminho mais fácil para solucionar esse desafio.

Dentre todas as informações evolutivas apresentadas aqui, algumas podem ter grande influências em novos estudos, como por exemplo as relações evolutivas de *Limnoperna*, o parentesco de *Perna* e *Mytella* e o rápida evolução morfológica de alguns grupos. A possibilidade de diversas características compartilhadas dentro de Mytiloidea serem frutos de retenção de caracteres ancestrais e não convergências evolutivas também podem influenciar em como a história evolutiva do grupo será abordada.

A partir desse trabalho, esperamos que novos passos sejam dados com a finalidade de resolver problemas que ainda permanecem insolúveis.

6. Referências

- Adarraga, I., Martínez, J., 2012. First record of the invasive brackish water mytilid Limnoperna securis (Lamarck, 1819) in the Bay of Biscay. Aquat. Invasions 7, 171–180. doi:org/10.3391/ai.2012.7.2.003.
- Amler, M.R.W., 1999. Synoptical classification of fossil and Recent Bivalvia. Geol. Palaeontol. 33, 237–248.
- Beu, A.G., Griffin, M., Maxwell, P.A., 1997. Opening of Drake Passage gateway and Late Miocene to Pleistocene cooling reflected in Southern Ocean molluscan dispersal: evidence from New Zealand and Argentina. Tectonophysics 281, 83–97. doi:10.1016/S0040-1951(97)00160-1.
- Beu, A.G., Alloway, B. V, Pillans, B.J., Naish, T.R., Westgate, J.A., 2004. Marine Mollusca of oxygen isotope stages of the last 2 million years in New Zealand. Part 1: Revised generic positions and recognition of warm-water and cool-water migrants. J. R. Soc. New Zeal. 34, 111–265. doi:10.1080/03014223.2004.9517766.
- Bieler, R., Mikkelsen, P., 2005. Bivalvia a look at the branches. Zoological Journal of the Linnean Society 148, 223–235. doi: 10.1111/j.1096-3642.2006.00255.x.
- Bieler, R., Carter, J.G. & Coan, E.V., 2010. Classification of bivalve families. In: Bouchet, P. & Rocroi, J.-P. (Eds), Nomenclator of bivalve families. Malacologia 52(2), 1–184. doi: dx.doi.org/10.4002/040.052.0201.
- Bruford, M. W., Hanotte O., Brokfield, J. F. Y., Burke, T., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting,. In: A. R. Hoelzel (ed.) Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. New York: Oxford University Press. 225-269.
- Carter, J.G., Altaba, C.R., Anderson, L.C., Araujo, R., Biakov, A.S., Bogan, A.E., Campbell, D.C., Campbell, M., Jin-hua, C., Cope, J.C.W., Delvene, G., Dijkstra, H.H., Zong-jie, F., Gardner, R.N., Gavrilova, V.A., Goncharova, I.A., Harries, P.J., Hartman, J.H., Hautmann, M., Hoeh, W.R., Hylleberg, J., Bao-yu, J., Johnston, P., Kirkendale, L., Kleeman, K., Hoppka, J., Kriz, J., Machado, D., Malchus, N., Márquez-Aliaga, A., Masse, J.-P., McRoberts, C.A., Middelfart, P.U., Mitchell, S., Nevesskaja, L.A., Özer, S., Pojeta, J., John, Polubotko, I.V., Pons, J.m., Popov, S., Sánchez, T., Sartori, A.F., Scott, R.W., Sey, I.I., Signorelli, J.H., Silantiev, V.V., Skelton, P.W., Thomas, S., Waterhouse, J.B., Wingard, G.L., Yancey, T., 2011. A synoptical classification of the Bivalvia (Mollusca). Palaeontol. Contrib. 4, 1–47.

- Chichvarkhin, A.Y., 2002. Re: Phylogeny and taxonomy of marine mussels: comments on the paper by Distel (2000). Mol. Phylogenet. Evol. 22, 330–2. doi:10.1006/mpev.2001.1066.
- Colgan, D.J., Costa, P., 2013. Invasive and non-invasive lineages in Xenostrobus (Bivalvia: Mytilidae). Molluscan Research 33:4, 272-280. doi: 10.1080/13235818.2013.826574.
- Combosch, D.J., Giribet, G., 2015. Clarifying phylogenetic relationships and the evolutionary history of the bivalve order Arcida (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia). Mol. Phylogenet. Evol. 94, 298–312. doi:10.1016/j.ympev.2015.09.016.
- Diez, M.E., Radashevsky, V.I., Orensanz, J.M., Cremonte, F., 2011. Spionid polychaetes (Annelida: Spionidae) boring into shells of molluscs of commercial interest in northern Patagonia, Argentina. Ital. J. Zool. 78, 497–504. doi:10.1080/11250003.2011.572565.
- Distel, D.L., 2000. Phylogenetic Relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA Data Suggest Convergence in Mytilid Body Plans. Mol. Phylogenet. Evol. 15, 25–33. doi:10.1006/mpev.1999.0733.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.

 Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294-297.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Huber, M., 2010. Compendium of Bivalves. ConchBooks, Hackenheim, pp. 542 550.
- Jacobi, C.M., Rosenberg, C., Vianna-Morgante, A.M., 1990. The Karyotype of the Brown Mussel Perna perna (L.) (Bivalvia: Mytilidae). Rev. Brasil. Genet 13, 4, 669-673.
- Kafanov, A.I. & Drozdov, A.L., 1998. Comparative sperm morphology and phylogenetic affinity of Recent Mytilidae (Bivalvia). Malacologia 39, 1–2.
- Kulsantiwong, J., Prasopdee, S., Ruangsittichai, J., Ruangjirachuporn, W., Boonmars, T., Viyanant, V., Pierossi, P., Hebert, P.D.N., Tesana, S., 2013. DNA barcode identification of freshwater snails in the family bithyniidae from Thailand. PLoS One 8, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0079144.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., Mcgettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007.

- Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- Miyazaki, J.I., de Oliveira Martins, L., Fujita, Y., Matsumoto, H., Fujiwara, Y., 2010. Evolutionary process of deep-sea Bathymodiolus mussels. PLoS One 5, e10363. doi:10.1371/journal.pone.0010363.
- Miyazaki, J.I., Shintaku, M., Kyuno, A., Fujiwara, Y., Hashimoto, J., Iwasaki, H., 2004. Phylogenetic relationships of deep-sea mussels of the genus Bathymodiolus (Bivalvia: Mytilidae). Mar.
- Morton, B., 2015. Evolution and adaptive radiation in the Mytiloidea (Bivalvia): clues from the pericardial–posterior byssal retractor musculature complex. Molluscan Res. 35, 227–245. doi:10.1080/13235818.2015.1053167.
- Newell, N. D.,1969. Classification of bivalvia. In "Treatise on Invertebrate Paleontology" (R. C. Moore, Eds.), Part N, Vol. 1, Mollusca 6, Bivalvia. Geol. Soc. Am. and the Univ. Press of Kansas, pp. 205-224.
- Ockelmann, K., W., 1983. Descriptions of mytilid species and definition of the Dacrydiinae n. subfam. (Mytilacea-Bivalvia). Ophelia 22:1, 81-123. doi:dx.doi.org/10.1080/00785326.1983.10427225.
- Owada, M., 2007. Functional morphology and phylogeny of the rock-boring bivalves Leiosolenus and Lithophaga (Bivalvia: Mytilidae): A third functional clade. Mar. Biol. 150, 853–860. doi:10.1007/s00227-006-0409-y.
- Owada, M., Hoeksema, B.W., 2011. Molecular phylogeny and shell microstructure of Fungiacava eilatensis Goreau et al. 1968, boring into mushroom corals (Scleractinia: Fungiidae), in relation to other mussels (Bivalvia: Mytilidae). Contrib. to Zool. 80, 169–178.
- Pérez-García, C., Morán, P., Pasantes, J.J., 2014. Karyotypic diversification in Mytilus mussels (Bivalvia: Mytilidae) inferred from chromosomal mapping of rRNA and histone gene clusters. BMC Genet. 15, 84. doi:10.1186/1471-2156-15-84.
- Pérez-García, C., Morán, P., Pasantes, J.J., Puertas, M., 2011. Cytogenetic characterization of the invasive mussel species Xenostrobus securis Lmk. (Bivalvia: Mytilidae). Genome 54, 771–778. doi:10.1139/g11-040.
- Plazzi, F., Ceregato, A., Taviani, M., Passamonti, M., 2011. A Molecular Phylogeny of Bivalve Mollusks: Ancient Radiations and Divergences as Revealed by Mitochondrial Genes. PLoS ONE 6(11), e27147. doi:10.1371/journal.pone.0027147.

- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. 25, 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083.
- Ritt, B., Duperron, S., Lorion, J., Sara Lazar, C., Sarrazin, J., 2012. Integrative study of a new cold-seep mussel (Mollusca: Bivalvia) associated with chemosynthetic symbionts in the Marmara Sea. Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap. 67, 121–132. doi:10.1016/j.dsr.2012.05.009.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029.
- Samadi, S., Quéméré, E., Lorion, J., Tillier, A., von Cosel, R., Lopez, P., Cruaud, C., Couloux, A., Boisselier-Dubayle, M.C., 2007. Molecular phylogeny in mytilids supports the wooden steps to deep-sea vents hypothesis. Comptes Rendus Biol. 330, 446–456. doi:10.1016/j.crvi.2007.04.001.
- Scarlato, O.A., Starobogatov, Y.I., 1978. Phylogenetic Relations and the Early Evolution of the Class Bivalvia. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 284, 217–224. doi:10.1098/rstb.1978.0064.
- Scarlato, O.A., Starobogatov, Ya.I., 1979a. The system of the suborder Mytileina (Bivalvia).

 Molljuski. Osnoynye rezultalty ikh izuchenija 6, 22–25.
- Scarlato, O.A.; Starobogatov, Ya.I., 1979b. General evolutionary patterns and the system of the class Bivalvia. Trudy Zoologicheskogo Instituta 80, 5–38.
- Scotland, R.W., Olmstead, R.G., Bennett, J.R., 2003. Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. Syst. Biol. 52, 539–548. doi:10.1080/10635150390223613.
- Seed, R., Richardson, C.A., 1999. Evolutionary traits in Perna viridis and Septifer virgatus. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 239, 273–287.
- Soot-Ryen, T.,1969. Superfamily Mytilacea Rafinesque, 1815.In: Moore, R.C. (Ed.), Treatise on invertebrate paleontology. Part N, Mollusca 6, Bivalvia 1 (of 3). Geological Society of America Inc. and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas, pp. N271–N280.
- Souza, T.O., Alves, F.A. dos S., Beasley, C.R., de Simone, L.R.L., Marques-Silva, N. do S., Santos-Neto, G. da C., Tagliaro, C.H., 2015. Population structure and identification of two matrilinear and one patrilinear mitochondrial lineages in the mussel Mytella charruana. Estuar. Coast. Shelf Sci. 156, 165–174. doi:10.1016/j.ecss.2014.11.009.

- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Thiriot-Quiévreux, C., 1984. Le caryotype d' Aulacomya ater regia (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) des lles Kerguelen. Marine Biology 79, 89-91.
- Trovant, B., Orensanz, J.M.L., Ruzzante, D.E., Stotz, W., Basso, N.G., 2015. Scorched mussels (BIVALVIA: MYTILIDAE: BRACHIDONTINAE) from the temperate coasts of South America: Phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. Mol. Phylogenet. Evol. 82, 60–74. doi:10.1016/j.ympev.2014.10.002.
- Uliano-Silva, M., Americo, J., Bastos, A.S., Furtado, C., Rebelo, M. de F., Prosdocimi, F., 2015.

 Complete mitochondrial genome of the brown mussel Perna perna (Bivalve, Mytilidae).

 Mitochondrial DNA 0, 1–2. doi:10.3109/19401736.2014.989502.
- Weber, L.I., Hildebrand, C.G., Clezar, C., 2009. No evidence of doubly uniparental inheritance in the brown mussel Perna perna from the RFLP analyses of the mitochondrial 16S rDNA.

 Brazilian J. Aquat. Sci. Technol. 13, 51. doi:10.14210/bjast.v13n2.p51-57.
- Wood, A.R., Apte, S., MacAvoy, E.S., Gardner, J.P.A., 2007. A molecular phylogeny of the marine mussel genus Perna (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 44, 685–698. doi:10.1016/j.ympev.2006.12.019.
- Xia, X., 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution. 30, 1720-1728. 10.1093/molbev/mst064.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., Wang, Y., 2003. An index of substitution saturation and its application. Mol. Phylogenet. Evol. 26, 1–7. doi:10.1016/S1055-7903(02)00326-3.

ANEXO 1

Amostras utilizadas neste trabalho com respectivos números de acesso do GenBank.

	COI	ITS	18S
Perna perna 1	Sequência nova	DQ640560	DQ640520
Perna perna 2	Sequência nova	DQ640559	DQ640518
Perna canaliculus 1	DQ917613	DQ640566	DQ640523
Perna canaliculus 2	DQ917608	DQ640565	DQ640521
Perna viridis I	DQ917612	DQ640572	DQ640525
Perna viridis 2	DQ917611	DQ640571	DQ640524
Mytilus edulis 1	DQ917606	AF441001	DQ640511
Mytilus edulis 2	KR084882	AF440966	DQ640511
Mytilus galloprovincialis 1F	KP976300	AY130203	DQ640507
Mytilus galloprovincialis 2F	KU201444	AY130200	JQ611492
Mytilus californianus 1	U68777	-	DQ640514
Mytilus californianus 2	U68776		DQ640513
Mytilus trossulus 1	U68775	AF441060	DQ640516
Mytilus trossulus 2	U68774	AF441059	DQ640515
Choromytilus chorus 1	JF301719	DQ640585	DQ640540
Choromytilus chorus 2	JF301722	DQ640584	DQ640541
Musculista senhousia 1F	AY570041	- -	AB201231
Musculista senhousia 1M	AY570041 AY570051	<u> </u>	AB201231 AB201231
Musculista senhousia 2F	AY570040	-	AF124207
Musculista senhousia 2M	AY570050	-	AF124207
Mytella charuana 1F	JQ685156	JQ734971	DQ310715*
Mytella charuana 1M	JQ685159	JQ734971	DQ310715*
Mytella charuana 2F	JQ685157	JQ734970	DQ310713
Mytella charuana 2M	JQ685158	JQ734970 JQ734970	
Crenalla faba 1	KF644331	3Q134710	
Crenalla faba 2	KF644170		
Seminytilus algosos 1	KC107227		DQ640535
Seminytilus algosos 2	KC107226		DQ640536
Perumytilus purpuratos 1M	KF661973	KC844406	DQ640533
Perumytilus purpuratos 1F	KF661953	KC844406	DQ640533
Perumytilus purpuratos 2M	KF661972	KC844405	DQ640534
Brachidontes excusus 1	AY825216	AY825245	KT318263
Brachidontes excusus 2	AY825215	AY825244	KT318264
Brachidontes modiolus 1	AY621918	AY621961	111310201
Brachidontes modiolus 2	AY621917	AY621960	
Geukensia demissa 1	GQ282990	AY621962	L78853
Geukensia demissa 2	GQ282986		
Geukensia granossisima 1	AY621927	AY621964	
Geukensia granossisima 2	AY621926	AY621963	
Ischadium recurvum 1	AY621932	AY621967	
Ischadium recurvum 2	AY621933		
Limnoperna fortunei 1	AB520626	AB377683	
Limnoperna fortunei 2	AB520627		
Septifer excisus 1	AB076922		
Septifer excisus 2	AB076921		
Mytilisepta virgatus	AB076941		KJ453817
Modiolus barbatus 1	KR084927		
Modiolus barbatus 2	KR084926		
Modiolus modiolus 1	KR084900		AF124210
Modiolus modiolus 2	HM884246		EF526454
Modiolus kurilensis 1	KP243079		
Modiolus kurilensis 2	KP243078		
Idas simpsoni 1	KT216502		KF611731
•			

Idas simpsoni 2	KT216501		
Idas iwaotakii 1	AB257523		KF611729
Idas iwaotakii 2	AB257522		
Idas japonica 1	FJ937078		
Idas japonica 2	FJ937077		
Musculus discors 1	KR084795		AF124206
Gigantidas mauritanicus 1	KU597623		KF611712
Gigantidas crypta 1	AB257516		AB539008
Gigantidas crypta 2	AB257517		KF611714
Gigantidas gladius	AY649802		AY649821
Gigantidas horikoshii	HF545113		
Adipicola pacifica 1	AB539005		AB539009
Adipicola pacifica 2	HF545115		
Adipicola crypta 1	EU702321		
Adipicola crypta 2	EU702320		
Adipicola longissima 1	DQ340792		DQ340798
Bathymodiolus thermophilus 1	GQ473902		AF221638
Bathymodiolus thermophilus 2	GQ473901		AY649829
Bathymodiolus septemdierum 1	KP879563		
Bathymodiolus septemdierum 2	KP879571		
Xenostrobus atratus 1	GQ480327	AB377682	AB594348
Xenostrobus atratus 2	GQ480326		
Xenostrobus securis 1	JF430154	AB377683	EF186014
Dacrydium zebra	AB076945		
Lithophaga lithophaga	AF120644		AF124208
Aulocomya atra 1	JF301757	DQ924558	DQ640542
Aulocomya atra 2	DQ917615.1	DQ924557	DQ640543
Isognomon alatus	KP455069		HQ329331
Ostrea stentina 1	KT317503	DQ640103	AH005582
Ostrea stentina 2	KT317502	DQ640097	
Crassostrea iredalei 1	AB748821	EU073329	EU660790
Astarte sulcata 1	KR084803		KC429351
Astarte sulcata 2	KR084484		AM774480
Pecten maximus	KC429102		JQ611499
Venustaconcha ellipsiformis	KC537303		_
Venustaconcha ellipsiformis 1	EF033296		
Elliptio complanata	KU906090		AF117738
Venerupis philippinarum	HQ703311	GU358291	EU660737

Anexo 2.

titulo

	Perninae	Crenellinae	Septiferinae	Mytilinae	Brachidontinae	Dacrydiinae
Perninae						
Crenellinae	16%					
Septiferinae	28%	30%				
Mytilinae	26%	25%	35%			
Brachidontinae	32%	32%	32%	30%		
Dacrydiinae	41%	39%	48%	40%	36%	
Lithophaginae	40%	42%	42%	41%	33%	31%