



**MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA**

DAVID BRAGA QUINTANILHA

**IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE *Brachidontes exustus*
(LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA, MYTILIDAE) EM DIFERENTES AMBIENTES DO
OCEANO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

**ARRAIAL DO CABO / RJ
2019**

DAVID BRAGA QUINTANILHA

**IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE *Brachidontes exustus*
(LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA, MYTILIDAE) EM DIFERENTES AMBIENTES DO
OCEANO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Costa Fernandes
Coorientadora: Prof. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição.

**ARRAIAL DO CABO / RJ
2019**



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA - IEAPM
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE – UFF
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA - PPGBM

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 28

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Aos vinte e dois dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove, às nove horas e trinta minutos no auditório da Pesquisa I no IEAPM, Arraial do Cabo, RJ realizou-se a prova de Defesa de dissertação, intitulada: “Identificação Genética e Morfológica de *Brachidontes exustus* (LINNAEUS, 1758) (Bivalvia, Mytilidae) em diferentes ambientes do Oceano Atlântico Sul Ocidental” de autoria do Candidato **David Braga Quintanilha**, aluno do Programa em Biotecnologia Marinha, em nível de Mestrado. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores: Dr. Flavio da Costa Fernandes, (IEAPM) – Orientador – Presidente, Dr. Bernardo Antonio Perez da Gama (Universidade Federal Fluminense – UFF) – Membro Interno, Dra. Laura Isabel Weber da Conceição, (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ) – Membro Externo e Dra. Elizabeth de Souza Martins (IEAPM) – Suplente. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o candidato foi **APROVADO** pela Banca Examinadora. Foi concedido um prazo de 30 dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora, apresentar o trabalho em sua redação definitiva, atender ao requisito de publicação estabelecido nas normas do Programa e entregar a documentação necessária para elaboração do Diploma sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca e pelo Candidato.

Prof. Dr. Flavio da Costa Fernandes – IEAPM

Prof. Dr. Bernardo Antonio Perez da Gama– UFF

Profa. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição – UFRJ

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Martins – IEAPM

Assinatura do Candidato:

“Aos meus pais Damião Muniz Quintanilha e Denanci Anunciação Braga Quintanilha, por me ensinarem a importância da honestidade, dedicação, e perseverança em tudo o que se faz na vida.”

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flavio da Costa Fernandes pelo valoroso exercício da orientação. Obrigado por me incentivar a trilhar o caminho da pesquisa e compartilhar o seu conhecimento com leveza e bom humor nos momentos difíceis, além do voto de confiança que possibilitou o crescimento de minha formação acadêmica e científica.

À Dra Laura Isabel Weber da Conceição, minha coorientadora. Não há palavras para expressar a minha gratidão pela parceria e incansável dedicação de seu tempo e atenção na condução do meu trabalho. Muito obrigado por não medir esforços para ajudar-me a vencer as dificuldades que encontrei durante a construção do meu conhecimento ao longo da realização desse trabalho. Obrigado por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar. Seu apoio, confiança, profissionalismo, comprometimento, incentivo e amizade foram imprescindíveis para que eu chegasse até o final do mestrado. Obrigado por tudo!

Ao Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé - NUPEM/UFRJ pela estrutura laboratorial fundamental para realização das análises nessa pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do NUPEM, Allan (Play), Carol, Barbara, Vitor e Lorena, pela receptividade, troca de experiências e agradável convivência em todos os momentos em que dividimos a bancada. Agradeço, especialmente, a Mari pelo apoio, incentivo e disponibilidade, principalmente no momento inicial de minha chegada ao laboratório. Foi muito bacana conhecê-los!

A Aline Karl Araújo do Laboratório de Imagens do NUPEM/UFRJ pelas instruções técnicas, cordialidade e atenção durante a realização das fotografias das conchas dos mexilhões.

A todos do Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM, por contribuírem para minha formação acadêmica e profissional.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Marinha do IEAPM, Sávio, Julia e especialmente a Dra. Caroline Rezende Guerra, que compartilhou comigo sua valorosa experiência em Biologia Molecular e Genética no início das atividades laboratoriais.

Aos colegas do Programa de Biotecnologia Marinha por todos os momentos vividos nesses dois anos e meio, principalmente durante as disciplinas, em especial Bira, Rodrigo e Marcelo Tardelli, um grande amigo nas horas difíceis, solidário nos trabalhos científicos, e parceiro de bons momentos de descontração, conversas e risadas durante todo o mestrado. A sua presença fez dias difíceis ficarem mais leves!

Aos meus familiares e amigos, especialmente os meus pais, por estarem presentes nas minhas lutas, apoiarem as minhas decisões e compreenderem a minha ausência em momentos importantes de nossas vidas. Amo vocês!

À Patrícia de Oliveira Paiva Quintanilha, minha esposa, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos. Obrigado pelo amor, paciência, amizade, dedicação, suporte e compreensão nas fases difíceis dessa jornada, mas também pela vitória conquistada. Te amo!

Aos membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação do meu trabalho e pelos conselhos, sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento da dissertação.

A cada pessoa que direta ou indiretamente contribuiu para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, minha base forte, por me manter perseverante durante todo o Mestrado.

“Faça o teu melhor que puder na condição que você tem, enquanto não se tem condições melhores para fazer melhor ainda”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

Ao longo da costa do Oceano Atlântico ocidental *Brachidontes exustus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Mytilidae) foi registrado em diversos locais, porém incluindo outras espécies como sinônimas. Estudos taxonômicos de *B. exustus* baseados na morfologia da concha atribuíram à variação dos caracteres à plasticidade fenotípica. Esse fato tem dificultado a identificação das espécies e gerado confusão taxonômica. Atualmente, *B. exustus* é um complexo de espécies na Flórida, Golfo do México e por todo o Caribe, mas seu *status* taxonômico continua sem esclarecimento em algumas regiões do Atlântico Ocidental. O presente trabalho busca contribuir para o esclarecimento do *status* taxonômico de populações de mexilhões identificados como *B. exustus* no Atlântico Sul Ocidental, através de uma abordagem molecular e morfológica. Foram estudados exemplares de *B. exustus* de quatro localidades do Atlântico Sul Ocidental (Cartagena, na Colômbia; Salvador na Bahia, Arraial do Cabo, no Rio de Janeiro e na ilha de Fernando de Noronha, em Pernambuco). O estudo morfométrico consistiu numa análise discriminante canônica de cinco medidas da concha (largura, altura, comprimento dorsal anterior e posterior) relativizadas ao comprimento total. Foram utilizadas as raízes canônicas para observar a distribuição dos mexilhões no plano discriminante e avaliar sua discriminação morfológica. Foram obtidas as funções de classificação e avaliados os acertos por espécie. As análises moleculares foram baseadas em sequências parciais dos genes mitocondriais *16S* e *COI*, com as quais foram construídas redes de haplótipos com o programa PopArt e árvores filogenéticas baseadas em máxima verossimelhança e na distância de Tamura-Nei. As distâncias P e Tamura-Nei foram obtidas entre pares de populações e com espécies referências obtidas do GenBank. Para ambas as análises foi aplicado Bootstrap com 1000 repetições, utilizando o programa Mega. Foram geradas sequências do gene do 16S rRNA para as espécies estudadas a serem disponibilizadas no GenBank. Os mexilhões de Cartagena e Salvador foram identificados como *B. exustus* e mostraram baixa distância genética ($0,002 \pm 0,001$) entre eles. Estes mexilhões foram agrupados com a variante de Miami desta espécie na rede de haplótipos e na árvore filogenética baseada no *COI*, com a qual apresentam uma distância de $0,005 \pm 0,002$. A população de Arraial do Cabo (canal) foi agrupada com *B. darwinianus* do Uruguai, com a qual mostra uma baixa distância ($0,006 \pm 0,003$), confirmando pertencer a esta espécie. A população de Fernando de Noronha foi agrupada num clado independente formado por *B. puniceus* de Cabo Verde (na base do clado) e pela variedade de Bahamas de *B. exustus*, mostrando uma distância média entre eles de $0,050 \pm 0,010$ e uma distância com as outras espécies e outras variedades de *B. exustus* superior a 0,220, indicando que a nomeação correta para este clado seja *B. puniceus*. A função discriminante permitiu a separação parcial das espécies identificadas com acertos de no mínimo de 85% dos casos. Podemos concluir que *B. exustus* se estende até Salvador, Brasil, ampliando a distribuição recentemente verificada para a espécie. Confirma-se a ocorrência de *B. darwinianus* nos costões rochosos da Praia do Pontal em Arraial do Cabo, Brasil, na zona entre-marés inferior, na saída de um canal de água salobra. Os mexilhões de Fernando de Noronha correspondem à espécie *B. puniceus*, a mesma presente nas Ilhas de Cabo Verde, Bahamas e Bermudas. A baixa distância genética entre eles e o grau de isolamento de Fernando de Noronha permitem propor que essa população seja denominada de subespécie *B. puniceus noronhensis*.

Palavras-chave: Mitilídeo; COI; 16S; Morfometria; Genética

ABSTRACT

Along the coast of the West Atlantic Ocean, *Brachidontes exustus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Mytilidae) was registered in several localities, but including other species as synonyms. Taxonomic studies on *B. exustus* based on shell morphology attributed variation of these characteristics to phenotypic plasticity. This fact has imposed difficulties on the identification of species and generated taxonomic confusion. At the moment, *B. exustus* corresponds to a species complex found in Florida, Gulf of Mexico and in Caribbean waters, but its taxonomic status still remain without clarification in some regions of the West Atlantic. The present study aims to contribute for the clarification of the taxonomic status of populations of *B. exustus* from the South West Atlantic, through a molecular and morphological approach. Mussels from four localities (Cartagena, in Colombia; Salvador in Bahia, Arraial do Cabo in Rio de Janeiro and Fernando de Noronha archipelago in Pernambuco) were studied. Morphometric study consisted in a Canonical Discriminant Analysis of five shell linear measurements (width, height, anterior and posterior dorsal length) relativized by the total length. Canonical roots were used to observe the distribution of mussels in the discriminant space and to evaluate their morphological discrimination. Classification functions were obtained and the percentage of correct hits were evaluated by species. Molecular analyses were based on partial sequences of the mitochondrial genes *16S* and *COI*, which were used for the construction of haplotype networks with PopArt software and phylogenetic trees based on maximum likelihood and Tamura-Nei distance. The *P*-distance and Tamura-Nei distance were obtained for all pair-wise populations and with sequences of reference species obtained in the GenBank. For these analyses, it was applied 1,000 bootstrap resampling and the MEGA software was used for these purposes. Sequences of the 16S rRNA gene were generated from the studied species, which will be submitted to the Genbank. Mussels from Cartagena and Salvador were identified as *B. exustus* and showed low genetic distance between them (0.002 ± 0.001). These mussels were grouped in the *COI* network and phylogenetic tree together with the Miami form of the species, to which they showed a distance of 0.005 ± 0.002 . The population of Arraial do Cabo stream was clustered with *B. darwinianus* from Uruguay, to which it shows a low distance (0.006 ± 0.003), confirming of belonging to this species. Fernando de Noronha population was grouped in an independent clade formed by *B. puniceus* from Cape Verde (in the base of the clade) and by the Bahamas form of *B. exustus*, showing a mean distance between them of 0.050 ± 0.010 ; and a distance with the other species of *Brachidontes*, here studied, of 0.220, indicating that the correct name of this clade should be *B. puniceus*. The discriminant function allowed the partial segregation of the identified species with correct hits of at least 85% of the cases. It is possible to conclude that *B. exustus* extends its distribution to Salvador, Brazil, expanding the recently verified distribution of the species. It was confirmed the occurrence of *B. darwinianus* in rocky shores of Praia do Pontal in Arraial do Cabo, Brazil, in the lower intertidal zone at the channel output of brackish water. Fernando de Noronha mussels correspond to *B. puniceus*, which is the same species found in Cape Verde, Bahamas and Bermuda Islands. The low genetic distance among them and the degree of isolation of Fernando de Noronha population allow to propose that this population should be named as the subspecies *Brachidontes puniceus noronhensis*.

Key-words: Mytilids; *COI*; *16S*; Morphometry; Genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Áreas de coleta dos espécimes registradas como *Brachidontes exustus* no Atlântico Sul Ocidental.....31
- Figura 2 - Valva esquerda de *Brachidontes* dos diferentes locais de coleta: (A) Cartagena, (B) Salvador, (C) Fernando de Noronha, (D) Arraial do Cabo (Costão marinho) e (E) Arraial do Cabo (Foz do canal).....37
- Figura 3 - Representação esquemática das dimensões lineares da concha em *Brachidontes* (C) comprimento, (A) altura, (L) largura, (CAD) comprimento Anterior Dorsal e (CPD) comprimento posterior dorsal).....38
- Figura 4 - Rede de haplótipos do 16S correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando a posição dos haplótipos mais frequentes de cada grupo. Os haplótipos AC-H1/H2 correspondem à espécie *Brachidontes* (= *Mytilaster*) *solisianus*.....41
- Figura 5 - Árvore filogenética de máxima probabilidade (Maximum Likelihood - distância Tamura-Nei) utilizando os haplótipos do 16S correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental. Os haplótipos AC-H1/H2 correspondem à espécie *Brachidontes* (= *Mytilaster*) *solisianus*.....42
- Figura 6 - Rede de haplótipos do COI correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando a posição dos haplótipos mais frequentes de cada grupo.....46
- Figura 7 - Rede de haplótipos do COI correspondentes a mexilhões das populações estudadas de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando o posicionamento em relação a outras espécies, portanto suas divergências e similaridades com as diferentes variantes de *Brachidontes*.....47
- Figura 8 - Árvore filogenética para o gene COI reconstruída pelo método estatístico Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - distância Tamura-Nei) a partir do

cálculo das distâncias genéticas entre as populações, incluindo sequências recuperadas do GenBank de diferentes espécies e variedades de *Brachidontes*.....49

Figura 9 - Plano discriminante canônico com a dispersão dos mexilhões de acordo com os parâmetros morfológicos definidos pelas raízes canônicas: a) das diferentes localidades, b) das diferentes espécies de mexilhões do gênero *Brachidontes* estudados.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais, data e características do local de coleta de mexilhões do gênero <i>Brachidontes</i> e (N) número de espécimes.....	31
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos marcadores 16S e COI.....	33
Tabela 3 - Componentes utilizados na PCR, volumes utilizados para uma reação e concentração das soluções estoque.....	34
Tabela 4 - Sequências de DNA do GenBank utilizadas para o desenho de <i>primers</i> para outras espécies e variantes de <i>Brachidontes</i> do Atlântico Sul.....	35
Tabela 5 - Parâmetros morfológicos utilizados nas análises morfométricas de <i>Brachidontes</i> coletados em Cartagena, Fernando de Noronha, Salvador e Arraial do Cabo.....	38
Tabela 6 - Tamanhos dos fragmentos obtidos de mexilhões <i>Brachidontes</i> para os genes do 16S rRNA e do COI.....	39
Tabela 7 - Haplótipos do gene do 16S rRNA em <i>Brachidontes</i> e suas frequências nas localidades estudadas.....	40
Tabela 8 - Distância nucleotídica e erro padrão entre pares de populações de <i>Brachidontes</i> do Atlântico Sul Ocidental avaliado sobre 442 pb (regiões com deleções excluídas). Distância-P (abaixo da diagonal) e distância de Tamura-Nei (sobre a diagonal).....	42
Tabela 9 - Haplótipos do gene <i>COI</i> em <i>Brachidontes</i> e suas frequências nas localidades estudadas.....	44
Tabela 10 - Sequências nucleotídicas da região do gene <i>COI</i> obtidas do GenBank e utilizadas para determinar a proximidade das populações estudadas com outras espécies e variantes de <i>Brachidontes</i> do Atlântico Sul.....	45

Tabela 11 – Matriz de distâncias com o erro padrão (SE) para o gene COI entre as populações estudadas, incluindo as sequências de <i>Brachidontes</i> baixadas do GenBank. Abaixo da diagonal a distância $P \pm SE$; acima da diagonal a distância Tamura-Nei $\pm SE$	48
Tabela 12 - Número de indivíduos, faixas de tamanho, médias e desvio padrão das população de <i>Brachidontes</i> estudadas no Atlântico Sul Ocidental.....	50
Tabela 13 - Significância das variáveis na discriminação morfológica dos mexilhões das diferentes localidades estudadas (N=240).....	52
Tabela 14 - Correlações das variáveis relativas nas raízes canônicas da análise discriminante realizada a partir das variáveis relativas dos mexilhões das diferentes localidades estudadas.....	52
Tabela 15 - Significância das raízes canônicas e seus parâmetros obtidas da análise discriminante das variáveis morfológicas relativas dos mexilhões das diferentes localidades estudadas. Teste Qui-quadrado com raízes removidas sucessivamente.....	52
Tabela 16 - Quadrado das Distâncias de Mahalanobis entre os mexilhões das diferentes localidades estudadas em base às características morfológicas (variáveis relativas).....	53
Tabela 17 - Matriz de classificação dos mexilhões das diferentes localidades estudadas de acordo com a análise discriminante. As classificações previstas (colunas) e as observadas (linhas) com a porcentagem de acerto.....	53
Tabela 18 - Funções de classificação segundo a análise discriminante canônica para cada espécie de <i>Brachidontes</i> estudada.....	55
Tabela 19 - Funções de classificação segundo a análise discriminante canônica para cada espécie de <i>Brachidontes</i> estudada. Classificações previstas (colunas), classificações observadas (linhas) e porcentagem de classificações corretas.....	55

Tabela 20 - Características diagnósticas das conchas nas espécies de <i>Brachidontes</i> estudadas.....	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOLD	Barcode of Life Data <i>System</i>
BTS	Baía de Todos os Santos
CAD	Comprimento Anterior Dorsal
COI	Citocromo-c-oxidase, subunidade I
CPD	Comprimento Posterior Dorsal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GPS	Global Positioning System
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
LABGEM	Laboratório de Genética Marinha
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NUPEM	Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade
pb	Pares de Base
ACP	Análise de Componentes Principais
PCI	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico Ribossomal
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
TE	Tris HCl-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) Aminometano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 SISTEMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Brachidontes</i>	18
1.2 ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Brachidontes</i> ATUALMENTE RECONHECIDAS PARA O ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL	21
1.2.1 <i>Brachidontes purpuratus</i> (Lamarck, 1819)	21
1.2.2 <i>Brachidontes rodriguezii</i> (d'Orbigny, 1842)	21
1.2.3 <i>Brachidontes darwinianus</i> (d'Orbigny, 1842)	22
1.2.4 <i>Brachidontes solisianus</i> (d'Orbigny, 1846)	22
1.2.5 <i>Brachidontes exustus</i> (Linnaeus, 1758)	23
1.3 MORFOMETRIA na identificação das espécies de <i>Brachidontes</i>	24
1.4 GENÉTICA MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Brachidontes</i>	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 AMOSTRAGEM E LOCAIS DE COLETA	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE <i>Brachidontes</i>	32
3.2.1 Extração do DNA total	32
3.2.2 Amplificação do DNA	33
3.2.3 Sequenciamento, edição e análise das sequências	34
3.2.4 Desenho de <i>primers</i>	34
3.2.5 Identificação e caracterização molecular das populações de <i>Brachidontes</i> estudadas	35
3.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE <i>Brachidontes</i>	36
4 RESULTADOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE <i>Brachidontes</i> ESTUDADAS BASEADAS NOS GENES DO 16S rRNA E DO COI	39
4.1.1 REGIÃO DO GENE DO 16S rRNA EM <i>Brachidontes</i>	39
4.1.2 ANÁLISE GENÉTICA DA REGIÃO DO COI	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	50

4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	51
5 DISCUSSÃO	56
5.1 <i>Brachidontes exustus</i> , UM COMPLEXO DE ESPÉCIES EM RECONHECIMENTO	56
5.2 Dispersão em longa distância das espécies de <i>Brachidontes</i>	57
5.3 IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES NO ESCLARECIMENTO DE PROBLEMAS TAXONÔMICOS	58
5.4 UMA NOVA ESPÉCIE PARA O ARQUIPÉLAGO DE FERNANDO DE NORONHA ?	60
5.5 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Brachidontes</i>	62
6 CONCLUSÃO	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Brachidontes*

Os mexilhões do gênero *Brachidontes* Swainson, 1840 são moluscos bivalves da família Mytilidae, descritos originalmente por Linnaeus em 1758, na décima edição do *Systema Naturae*. A seguir, é apresentada a classificação taxonômica do gênero:

Filo **Mollusca** (Linnaeus, 1758)

Classe **Bivalvia** (Linnaeus, 1758)

Subclasse **Pteriomorphia** (Beurlen, 1944)

Ordem **Mytiloida** (Férussac, 1822)

Superfamília **Mytiloidea** (Rafinesque, 1815)

Família **Mytilidae** Rafinesque, 1815

Subfamília **Mytilinae** (Rafinesque, 1815)

Gênero ***Brachidontes*** Swainson, 1840

As primeiras descrições das espécies de *Brachidontes* foram feitas unicamente com base em características morfológicas da concha (RIOS, 1994). O gênero *Brachidontes* compreende indivíduos caracterizados por conchas de tamanho pequeno a médio, não ultrapassando os 49 mm de comprimento da concha, ambas as valvas do mesmo tamanho e laterais idênticas, forma alongada e o umbo é terminal ou subterminal voltado para a extremidade anterior da concha (RIOS, 1994). A superfície externa das valvas apresenta-se esculpura por estrias de bifurcação radial ou unilateralmente bifurcadas, de espessura variável, iniciando no umbo e seguindo em direção à região posterior da concha (AGUIRRE *et al.*, 2006). Ainda na face externa, percebe-se linhas concêntricas que representam o crescimento da concha, mas nem sempre evidentes em alguns espécimes (VAN DER MOLEN *et al.*, 2013). O ligamento que controla a abertura e o fechamento das valvas é curto, o resílio (estrutura que juntamente com o tensílio forma o ligamento) é compacto, a dentição é disodonte, com poucos dentes na charneira (TANAKA e MAGALHÃES, 1999). As margens internas das valvas, posterior ao ligamento,

apresentam crenulações, uma série de elevações semelhantes a pequenos dentes (RIOS, 1994).

A maioria dos mexilhões do gênero *Brachidontes* vive na região costeira como constituintes bentônicos da comunidade entre marés ancorados pelo bisco a substratos duros naturais e artificiais (DISTEL, 2000; TANAKA e MAGALHÃES, 2002). Os substratos naturais incluem cascalhos, conchas vazias, lodo e areia compactada, raízes de mangue e costões rochosos (MÁRQUEZ e JIMÉNEZ, 2002; BARBER *et al.*, 2005). Entre os substratos artificiais estão os muros de concreto, paredões de pedras, pilastras de cais, cascos de navios, pedras de aterro e estacas de madeira (LEE e Ó FOIGHIL, 2005; BARBER *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2011). Apesar do comportamento sésil, os mexilhões podem apresentar pequenos deslocamentos ou total desprendimento para se fixarem em outros locais (BARBER *et al.*, 2005). Entretanto, formam camadas ou “bancos de mexilhões” que podem atingir altas densidades e cobrir completamente o substrato quando as condições ambientais como a sedimentação e exposição às ondas são favoráveis (TERRANOVA *et al.*, 2007).

Os indivíduos do gênero *Brachidontes* são animais filtradores, alimentam-se de fitoplâncton e material orgânico em suspensão (ARCHER e MORETTO, 1994; BALBAS *et al.*, 2014). Por isso, os mexilhões apresentam a capacidade de acumular em seus tecidos contaminantes de diversas fontes (RAINBOW, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2007; QUINTAS *et al.*, 2017), como por exemplo, metais pesados (CURTIUS *et al.*, 2003; NAKHLÉ *et al.*, 2006; MARENGONI *et al.*, 2013). Devido à capacidade de bioacumulação e sobrevivência em ecossistemas aquáticos contaminados, esses organismos podem refletir os níveis de poluição do ambiente (LLANES-BAEZA e GONZÁLEZ, 2002), razão pela qual são utilizados como organismos indicadores de variações no ambiente aquático e da qualidade ambiental (FERNANDEZ *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2013).

Os espécimes de *Brachidontes* apresentam reprodução gonocórica (dióica), sexos separados com os gametas femininos e masculinos produzidos por indivíduos distintos. Não há dimorfismo sexual externo e a identificação de indivíduos machos e fêmeas é possível pela observação do tecido gonadal ao microscópio. Geralmente, machos e fêmeas são encontrados na mesma proporção (1:1) e a presença de hermafroditismo é considerada rara (BARBER *et al.*, 2005). De acordo com estes autores, em estudo realizado na Baía de Tampa, na Flórida (EUA), existem dois

períodos de desova durante o ano e a liberação dos gametas depende das condições de temperatura e salinidade da água. Um período de desova ocorre na primavera (hemisfério norte), em conjunto com o aumento da temperatura da água, e outro período no outono (hemisfério norte), com a queda da temperatura da água.

O ciclo de vida de *Brachidontes* se assemelha, em geral, ao de outros mitilídeos. Os ovos fertilizados externamente originam larvas trocóforas planctônicas, que se desenvolvem em larvas véliger de natação livre e, depois, pedivéliger. A fase de vida larvar planctônica persiste por até 40 dias quando ocorre a fixação a um substrato duro por meio da secreção dos filamentos do bisso. Após a fixação, sofrem metamorfose até tornarem-se indivíduos juvenis e posteriormente adultos com a forma de vida bentônica (CAMPOS e RAMORINO, 1980; FIELDS e MOORE, 1983; BARBER *et al.*, 2005).

Algumas espécies do gênero *Brachidontes* podem apresentar ampla tolerância a alterações de salinidade e temperatura, sendo considerados organismos eurihalinos e euritérmicos (BARBER *et al.*, 2005). *Brachidontes* ocupam vários habitats com diversos estilos de vida (AGUIRRE *et al.*, 2006), muitas vezes em estuários (SEED, 1980; BREWSTER-WINGARD *et al.*, 2001) e recifes de ostras (HOESE, 1960; ORTEGA, 1981) onde podem dominar a fauna de moluscos.

As espécies do gênero *Brachidontes* estão amplamente distribuídas em todos os oceanos do mundo (AGUIRRE *et al.*, 2006; VAN DER MOLEN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018). São encontradas no Oceano Índico, exceto na sub-região persa e Malásia (TERRANOVA *et al.*, 2007; MORTON, 2012); no mar vermelho até o sul da costa ocidental da África, e no Mar Mediterrâneo (TERRANOVA *et al.*, 2006; GOTO *et al.*, 2011; MORTON, 2012). Estão presentes ao longo da costa do Oceano Pacífico (TANAKA e MAGALHÃES, 2002; THIEL e ULLRICH, 2002; GOTO *et al.*, 2011; TROVANT *et al.*, 2013; DINESEN e MORTON, 2014). Apresentam extensa distribuição no Oceano Atlântico ao longo de ambas as margens ocidental (AGUIRRE *et al.*, 2006; BERTNESS *et al.*, 2006; LEE e Ó FOIGHIL, 2004, 2005; SILLIMAN *et al.*, 2011; BENNETT, 2009; TROVANT *et al.*, 2013, 2015, 2016) e oriental (LOPES, 2009; PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2011; MORTON, 2012;).

1.2 ESPÉCIES DO GÊNERO *Brachidontes* ATUALMENTE RECONHECIDAS PARA O ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL

O padrão de distribuição dos bancos de *Brachidontes* ao longo da costa do Atlântico Sul Ocidental inclui registros de seis espécies: *B. purpuratus* Lamarck, 1819 (VAN DER MOLEN *et al.*, 2013) [previamente *Perumytilus purpuratus* Olsson, 1961 (AGUIRRE *et al.*, 2006)]; *B. rodriguezii* d'Orbigny, 1842 (SCARABINO *et al.*, 2006); *B. darwinianus* d'Orbigny, 1846; *B. solisianus* d'Orbigny, 1846 (RIOS, 1994; SCARABINO *et al.*, 2006); e *B. exustus* (Linnaeus, 1758) uma espécie que anteriormente acreditava-se ter ampla distribuição ao longo do Atlântico Ocidental (RIOS, 1994).

1.2.1 *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819)

A distribuição geográfica de *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819), atualmente denominado de *Perumytilus purpuratus* (TROVANT *et al.*, 2016), abrange exclusivamente as águas frias da Terra do Fogo e a província de Magalhães no sudoeste do Oceano Atlântico, e se estende para o norte ao longo do Oceano Pacífico, onde é encontrado, tanto no frio temperado como nas águas temperadas quentes, ao longo da costa do Chile até o norte do Peru (TROVANT *et al.*, 2013). A espécie é predominante na fisionomia e estrutura das comunidades dos costões rochosos da região entre-marés e constitui o componente mais visível da comunidade de moluscos, atuando como uma espécie ecologicamente engenheira ao facilitar o aparecimento de novas espécies, aumentando a biodiversidade (ADAMI; *et al.*, 2013). O comprimento máximo de *B. purpuratus* é de 40 mm. A concha apresenta forma alongada, a superfície externa esculpada com estrias radiais evidentes e linhas de crescimento concêntricas. Numerosos dentes são encontrados na charneira. A coloração é roxo, escura para preto, o ângulo dorsal é ausente (AGUIRRE *et al.*, 2006).

1.2.2 *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842)

A espécie *Brachidontes rodriguezii* se estende do Rio Grande do Sul, na costa do Brasil, até os golfos de São José e São Matias, na Patagônia Argentina (RIOS,

1994). A espécie habita águas temperadas, onde coexiste com a espécie *Brachidontes purpuratus* na região entre marés de substratos duros (TROVANT *et al.*, 2013). Esse pequeno indivíduo alcança o tamanho máximo de 50 mm. A concha é oblonga-alongada com finas estrias radiais e linhas de crescimento presentes na superfície externa (RIOS, 1994). O periostraco tem coloração marrom clara e o ângulo dorsal geralmente está presente (AGUIRRE *et al.*, 2006). A superfície interna é lisa de coloração arroxeadá, com a margem posterior crenulada. A cicatriz mediana do músculo retrator do bisso situa-se na frente do ligamento ou além dele. A charneira possui de 5 a 6 pequenos dentes. O umbo subterminal é arredondado (RIOS, 1994).

1.2.3 *Brachidontes darwinianus* (d'Orbigny, 1842)

O mexilhão *Brachidontes darwinianus* ocorre do sudeste do Brasil no Rio de Janeiro, até o norte da Patagônia, na Argentina (AVELAR e NARCHI, 1984b; TANAKA e MAGALHÃES, 1999; TANAKA, 2005 AGUIRRE *et al.*, 2006). É uma espécie comum em estuários e de região entre marés onde vive aderidos a substratos duros, como blocos de granito e gnaisse, em enseadas ou baías, abrigo-se na parte basal das pedras, próximo a regiões de baixa salinidade, como estuários e desembocadura de rios ou riachos (AVELAR e NARCHI, 1984b; NALESSO, 1988; AGUIRRE *et al.*, 2006). Em locais sujeitos a baixas salinidades, *B. darwinianus* substitui *B. solisianus* de forma espacialmente separadas no substrato: *B. darwinianus* é encontrado no médio litoral inferior, enquanto *B. solisianus* é encontrado na parte mediolitoral superior (TANAKA, 2005). O tamanho máximo da espécie é de 46 mm. A concha tem o formato oblongo oval, e a superfície externa, de coloração roxa escura, apresenta estrias radiais evidentes na margem ventral ligeiramente côncava e borda posterior crenulada. O ângulo dorsal é fortemente marcado, levemente deslocado para a margem anterior da concha e o número de dentes é variável na charneira (AVELAR e NARCHI, 1984b; AGUIRRE *et al.*, 2006).

1.2.4 *Brachidontes solisianus* (d'Orbigny, 1846)

Brachidontes solisianus, atualmente denominado de *Mytilaster solisianus* (HUBER, 2010; TROVANT *et al.*, 2013), ocorre ao longo da costa do Brasil até o

Uruguai, com registro no leste do México (AVELAR e NARCHI, 1984a; NALESSO, 1988; RIOS, 1994; TANAKA, 2005; AGUIRRE *et al.*, 2006). A espécie é comum na zona entre marés de costões rochosos expostos em zonas de arrebenção e alcança o comprimento máximo de 20 mm (RIOS, 1994; NALESSO, 1988; TANAKA e MAGALHÃES, 1999). A concha tem valvas de mesmo tamanho e a superfície externa exibe muitas estrias finas (AVELAR e NARCHI, 1984a; TANAKA e MAGALHÃES, 1999). Observam-se numerosos sulcos concêntricos que correspondem às linhas de crescimento (RIOS, 1994). A margem é crenulada na região posterior e alguns espécimes podem exibir o periostraco liso ou erodido de coloração castanha escura (TANAKA e MAGALHÃES, 1999). O ângulo dorsal é muito suave, quase ausente na metade do comprimento da concha, e o umbo é subterminal (AVELAR e NARCHI, 1984a; NALESSO, 1988; TANAKA e MAGALHÃES, 1999). A coloração interna das valvas é púrpura, mais clara na superfície ventral (TANAKA e MAGALHÃES, 1999) e as cicatrizes dos músculos são profundas (RIOS, 1994). Essa é a espécie de *Brachidontes* mais abundante nos costões rochosos do Rio de Janeiro, inclusive em Arraial do Cabo (QUINTANILHA, 2017).

1.2.5 *Brachidontes exustus* (Linnaeus, 1758)

Rios (1994) acreditava que *Brachidontes exustus* (Linnaeus, 1758) apresentava ampla distribuição geográfica na costa do Oceano Atlântico Ocidental, ao registrar essa espécie no sul da Carolina do Norte até a Flórida, Texas, Golfo do México, Bacia Caribenha, na costa do Brasil (incluindo Fernando de Noronha), Santa Helena, Uruguai até Argentina. Nessa extensa distribuição de *B. exustus*, o mesmo autor incluiu as sinonímias dessa espécie (*B. domingensis*, *B. lavalleanus*, *B. darwinianus*, *B. rosaseus* e *Mytilus muelleri*). No entanto, Lee e Ó Foighil, (2004, 2005), descreveram quatro morfoespécies sobre o táxon *B. exustus* distribuídas na Baía da Flórida, Golfo do México e Caribe. Recentemente, Trovant *et al.* (2013, 2014, 2016), não encontraram *B. exustus* no Atlântico Sudoeste, mas revelaram quatro espécies de *Brachidontes* nessa região: *B. solisianus*, *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* e *Perumytilus purpuratus*. Esta última, como citado anteriormente, é a única espécie do gênero *Brachidontes* encontrada nas águas frias e temperadas do sul da América do Sul (ou seja, ao Sul de 41 °S), e encontrada também no Oceano

Pacífico Oriental ao longo da costa do Chile e até o norte do Peru (TROVANT *et al.*, 2016).

A espécie *B. exustus* habita a zona entre marés, onde vive aderido pelo bisso a substratos duros, como costões rochosos, cais e raízes de mangue (SEED, 1980; BENNETT *et al.*, 2011). Foram encontrados exemplares de *B. exustus* com tamanho máximo de 40 mm (AGUIRRE *et al.*, 2006). Os indivíduos são caracterizados por uma fina concha em forma de leque e coloração castanho amarelado a castanho escuro. Apresenta, na margem dorsal, um ângulo evidente deslocado para a região anterior da concha. A superfície externa das valvas é esculpada por numerosas estrias radiais que se divergem para a margem posterior e ventral. Nas margens das valvas existem de 90 a 140 crenulações, elevações semelhantes a dentes finos atrás do ligamento. O umbo é terminal e a cicatriz do músculo retrator do bisso não atinge o ligamento. A extremidade anterior tem de 1 a 4 dentes disodontes na charneira e a face interna das valvas apresenta coloração arroxeadada (RIOS, 1994).

Diversos autores (SEED, 1980; RIOS, 1994, LEE e Ó FOIGHIL, 2004, 2005; AGUIRRE *et al.*, 2006; BENNETT *et al.*, 2011) observaram em *Brachidontes exustus* grande variabilidade dos caracteres da concha o que levou à considerável confusão taxonômica. Devido a esta variabilidade, *B. exustus* e *Brachidontes domingensis* (Lamarck, 1819) foram consideradas espécies separadas pelo gradiente ambiental com *B. exustus*, alcançando a Carolina do Norte, a costa do Texas até as Índias Ocidentais (ilhas do Caribe) e *B. domingensis* com registro em Bermudas, Bahamas, sudeste da Flórida e em todo o Caribe (BENNETT *et al.*, 2011). No entanto, *B. exustus* corresponde a um complexo de espécies ao longo de sua distribuição geográfica (LEE e Ó FOIGHIL, 2004, 2005).

1.3 MORFOMETRIA na identificação das espécies de *Brachidontes*

A classificação taxonômica das espécies do gênero *Brachidontes* tem sido fundamentada nas descrições da morfologia (VAN DER MOLEN *et al.*, 2013). Os padrões de variação morfológica, dentro e entre populações de mexilhões, tem sido utilizados para a comparação dos grupos, abordagem chamada de morfometria tradicional (GOTO *et al.*, 2011). Os dados quantitativos para uma ou mais variáveis morfológicas, como distâncias lineares de comprimento, altura e largura, podem ser utilizados para análises morfométricas multivariadas com o objetivo de diferenciar

morfologicamente as diferentes espécies de *Brachidontes*. O desenvolvimento de métodos de análise multivariada, como a Análise dos Componentes Principais (PCA), a disponibilidade de programas e de pacotes estatísticos, têm permitido uma avaliação da variação integrada do organismo e comparações de suas formas e estruturas (MARTINS, 2008).

Aguirre *et al.* (2006) não conseguiram diferenciar as espécies *B. rodriguezii*, *B. darwinianus* e *B. purpuratus*, e conseqüentemente, sugeriram que *B. rodriguezii* e *B. darwinianus* sejam sinônimas de *B. purpuratus*. Por outro lado, no caso de *B. exustus* da Flórida e Caribe, a variação de parâmetros morfológicos, como a espessura da concha, disposição e largura das estrias em ambas as valvas, indicou que este táxon pode corresponder a várias espécies ainda não identificadas e reconhecidas (BENNETT *et al.*, 2011). Lee e Ó Foighil (2005) não conseguiram identificar a espécie por morfologia somente, porém revelaram por estudo molecular que *B. exustus* é um complexo de espécies na Baía da Flórida. A descoberta deste complexo de espécies abre a possibilidade de uma biodiversidade escondida dentro do gênero *Brachidontes* (BENNETT *et al.*, 2011). Isto pode estar acontecendo para a região do Atlântico Sul Ocidental, pelo que se faz necessário o estudo destas populações num nível genético-molecular para reconhecer possíveis diferenças entre populações (LEE; Ó FOIGHIL, 2004).

1.4 GENÉTICA MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brachidontes*

Como a taxonomia do gênero *Brachidontes* tem se mostrado difícil com base somente na morfologia, uma abordagem genética molecular tem sido adotada para a identificação de espécies dentro do gênero. Estudos realizados por (LEE; Ó FOIGHIL, 2004) com populações de *Brachidontes* da Baía da Flórida (EUA), usando marcadores mitocondriais (COI) e nucleares (28S, ITS-1 e ITS-2), caracterizaram a estrutura genética dessas populações. Os resultados mostraram que as populações da Flórida são compostas por quatro morfoespécies depositadas sob o táxon *B. exustus*. Posteriormente, Lee e Ó Foighil (2005) amostraram 22 pontos na Bacia do Caribe e procederam com análises moleculares para um gene mitocondrial (COI) e dois nucleares, a subunidade ribossômica maior (28S) e espaçador transcrito interno

(ITS1). Os resultados mostraram que na bacia caribenha o táxon *B. exustus* é composto por cinco morfoespécies, que parecem ser o produto de uma longa história evolutiva regional. Bennett *et al.* (2011) coletaram espécies reconhecidas como *B. exustus* em manguezais e paredões de concreto na Florida Keys (EUA) e usaram o gene mitocondrial (COI) e o espaçador transcrito interno (ITS-2) nas análises moleculares para identificação de espécies. Os autores revelaram diferentes populações de uma única espécie em Long Key, na Flórida.

Trovant *et al.* (2013) amostraram nove localidades do Uruguai e Argentina e usaram genes mitocondriais e nucleares (COI, 28S rDNA e ITS1) para realizar a distinção entre as espécies, relações filogenéticas e biogeografia de *Brachidontes*. Os resultados confirmaram a ocorrência de três espécies no sudoeste do Atlântico: *Brachidontes darwinianus*, *B. rodriguezii* e *B. purpuratus*. Trovant *et al.* (2014) estudaram populações de *Brachidontes* no sul da América do Sul (Argentina e Chile), a partir das sequências de dois marcadores nucleares (28S e 18S) e um mitocondrial (COI) para inferir as relações filogenéticas entre espécies de *Brachidontes* da costa do Atlântico e do Pacífico. Os resultados mostraram que *B. rodriguezii* e *B. granulatus* ocorrem no sul do Atlântico Ocidental e a espécie *B. purpuratus* (sinonímia de *Perumytilus purpuratus*) tem ampla distribuição do extremo sul da costa do Atlântico ao longo da costa do Pacífico, do Chile até o Norte do Peru. Mais tarde, Trovant *et al.* (2016) analisaram espécimes de *Brachidontes* em nove localidades distribuídas na costa do Brasil a partir da Bahia (~14°S) até Montevideu no Uruguai, através de dois genes nucleares (18S e 28S rDNA) e um gene mitocondrial (mtDNA COI) para esclarecer as relações filogeográficas e filogenéticas entre os mexilhões. Os resultados revelaram quatro espécies ao longo da costa da América do Sul: *Brachidontes solisianus*, *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* e *Perumytilus purpuratus*. Esta última, como citado anteriormente, é a única espécie do gênero *Brachidontes* encontrada nas águas frias e temperadas do sul da América do Sul (ou seja, ao Sul de 41 °S), também é encontrado no Oceano Pacífico ao longo da costa do Chile e até o norte do Peru.

Apesar dos resultados alcançados por estudos moleculares na identificação de espécies do gênero *Brachidontes*, a existência de morfoespécies colocadas sobre o táxon *B. exustus* sugeridos por Lee e Ó Foighil (2004, 2005) pode encobrir novas espécies no grupo. Nesses casos, em que a abordagem morfológica ou molecular exclusivamente não é suficiente para a identificação de espécies, mas a

combinação das análises morfométricas clássicas com análises moleculares pode ser mais apropriada. Com essa abordagem, quando a morfologia não é informativa na identificação de espécies, os dados moleculares podem permitir esta distinção (NYGREN, 2014).

O trabalho de Goto *et al.* (2011) foi o único com *Brachidontes* que utilizou uma abordagem morfológica, juntamente com os dados genéticos. Os autores estudaram amostras de *Brachidontes* de nove lagos marinhos nas ilhas Palau no Oceano Pacífico Ocidental, usando o COI como marcador mitocondrial e o 18S como marcador nuclear. Os resultados das análises morfológicas foram apoiados pelas análises genéticas do COI e revelaram três diferentes morfoespécies diferenciadas umas das outras ao nível de espécie. Estudos que combinaram a abordagem morfológica, juntamente com a molecular, foram conduzidos com outros gêneros de mitilídeos por Trucco (2001) com o complexo *Mytilus edulis*, no Atlântico Sudoeste, e por Duarte *et al.* (2018), que analisaram por dados morfológicos e marcadores moleculares (aloenzimas) de populações do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei*, espécie invasora de água doce na América do Sul.

Portanto, os trabalhos de sistemática molecular (combinados ou não a dados morfométricos) feitos com espécies do gênero *Brachidontes*, no Atlântico Sul Ocidental, basearam-se principalmente na região do gene mitocondrial citocromo-c-oxidase, subunidade I (COI), por ter sido estabelecida como sequência para "barcoding" (código de barras do DNA) de invertebrados (HEBERT *et al.*, 2003). Um estudo realizado por Bennett *et al.* (2014) utilizou o COI, juntamente com o marcador 16S, uma região do genoma altamente conservada. Entretanto, o estudo consistiu na verificação de Dupla Herança Parental (DUI) com amostragem limitada a um único espécime de *B. exustus* coletado em costão da Praia da Madeira na Flórida (EUA). Apenas Liu *et al.* (2018) incluíram o marcador mitocondrial 16S, juntamente com COI e três nucleares (18S, 28S e histona H3), em seu estudo para inferir as relações filogenéticas de 42 espécies de mitilídeos, que incluiu somente *B. variabilis*, uma espécie encontrada nos Oceanos Índico e Pacífico Ocidental (TERRA-NOVA *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o esclarecimento do *status* taxonômico de populações de mexilhões previamente identificados como *Brachidontes exustus* no Atlântico Sul Ocidental, através de uma abordagem molecular e morfológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar geneticamente e determinar as distâncias genéticas de exemplares de mexilhões registrados como *Brachidontes* distribuídos no Atlântico Sul Ocidental, baseando-se numa análise em macroescala.
- Investigar possíveis diferenças morfométricas em populações de *Brachidontes* distribuídas no Atlântico Sul Ocidental, baseando-se numa análise em macroescala; e avaliar o potencial dessa análise como ferramenta para a diferenciação das espécies encontradas com o estudo molecular.
- Caracterizar e avaliar a diversidade haplotípica nos genes do COI e do 16S rRNA para as populações de *Brachidontes* distribuídas no Atlântico Sul Ocidental, baseando-se numa análise em macroescala.
- Disponibilizar os códigos de barra (*barcodes*) das populações de *Brachidontes* distribuídas no Atlântico Sul Ocidental, baseado-se numa análise em macroescala, no sistema mundial *Boldsystem* de código de barras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM E LOCAIS DE COLETA

Os mexilhões do gênero *Brachidontes* foram coletados manualmente com auxílio de uma espátula, sendo removidos de substratos duros da região entremarés e preservados em etanol a 95%. No caso de amostras dos locais mais distantes, os mexilhões foram transportados em sacos tipo *zip-loc* contendo sílica, o que permite a preservação do DNA (HOEZEL, 1998; CARVALHO e VIEIRA, 2000; CALAZANS *et al.*, 2017). Todas as amostras foram transportadas ao laboratório de Genética Marinha do Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), onde foram mantidas em etanol a 95% ou armazenados a -20°C, até a caracterização morfológica e molecular.

Os mexilhões do gênero *Brachidontes* utilizados neste estudo provêm de cinco localidades do Atlântico Sul Ocidental (Figura 1, Tabela 1), descritas a seguir:

1) Baía de Cartagena, Cartagena das Índias, Colômbia. Amostras de mexilhões foram retiradas de raízes de *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) em manguezais localizados nesta baía. A Baía de Cartagena está localizada na costa norte da Colômbia, no Mar do Caribe (TOSIC *et al.*, 2019), e corresponde a um sistema estuarino, onde os manguezais ocupam uma proporção significativa da região (MERLANO e HEGEDUS, 1994). A área é influenciada pelo escoamento de água doce do Rio Magdalena (RESTREPO *et al.*, 2018), que produz variação sazonal da salinidade entre 9,7 a 35,8 (média de 25) nas águas superficiais da baía, que apresenta temperatura média de 30°C (TOSIC *et al.*, 2019).

2) Praia da Cacimba do Padre, ilha Fernando de Noronha (maior), Arquipélago Fernando de Noronha. As amostras de mexilhões do gênero *Brachidontes* foram coletadas num costão rochoso com exposição à ação das ondas desta praia. A coleta foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Ferreira da Universidade Federal Fluminense, com autorização concedida pela Licença SISBIO nº 41327-12. Este arquipélago é composto por 21 ilhas oceânicas com 26 km² de área total, distante 545 km da cidade de Recife, capital do estado de Pernambuco, ao qual pertence esse conjunto de ilhas (SILVA *et al.*, 2018). Fernando de Noronha apresenta clima tropical com temperatura média da superfície da água em torno de 28°C e salinidade próxima de 36 (LEVY *et al.*, 1995; SANTANA *et al.*,

2018). A região do arquipélago está sob influência da Corrente Sul Equatorial (cSEC), que flui no sentido leste-oeste da África para a costa do Brasil, paralelo ao equador geográfico (MOLINARI, 1983; TCHAMABI *et al.*, 2017). A sSEC bifurca-se na costa brasileira, entre 5° e 10°S, originando a Corrente Norte do Brasil, que se desloca no sentido noroeste, e a Corrente do Brasil que flui na direção sul paralela a costa durante todo o ano (MOLINARI, 1983; MATHEUS *et al.*, 2019). A maioria das espécies marinhas encontradas em Fernando de Noronha são comuns no Atlântico Ocidental, principalmente da região do Caribe (ESTON *et al.*, 1986).

3) Baía de Todos os Santos, Salvador, Bahia. Os mexilhões foram coletados de um muro de pedra junto à Base Naval de Aratu, localizada nas bordas da cidade. A Baía de Todos os Santos é a segunda maior baía do Brasil com uma área de 1.233 km², atrás apenas da baía de São Marcos, no Maranhão (CIRANO e LESSA, 2007). É uma baía de condições essencialmente marinhas com temperatura média da água de 25 °C e salinidade em torno de 36, que diminui gradativamente para o interior da baía até valores próximos a 30 (MIRANDA *et al.*, 2011). Regiões estuarinas estão concentradas nas áreas próximas aos rios Paraguaçu, Subaé e Jaguaripe que apresentam as maiores contribuições de água doce a esta baía (HATJE e ANDRADE, 2009). Esta baía possui também uma rica diversidade em ecossistemas. Entre eles estão os recifes de corais, planícies de maré e manguezais. Estas áreas de manguezais ocupam aproximadamente 160 km², principalmente na porção norte interna da baía, na Ilha de Itaparica e na enseada de Aratu (BARROS *et al.*, 2012).

4) Praia do Pontal, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. A coleta dos mexilhões (Autorização SISBIO nº 55461-1) foi realizada num costão rochoso protegido contra a ação direta das ondas, que possui declividade suave (canal) (CORREAL, 2011). O costão é adjacente a um canal eutrofizado, na área da desembocadura, com água de coloração escura (CORREAL, 2011), temperaturas entre 22,7°C a 23,1°C e salinidade que varia de 28,7, na baixamar, e 36,8 na preamar (QUINTANILHA, 2017).

5) Praia dos Anjos, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Os mexilhões foram recolhidos de um costão rochoso exposto à ação direta das ondas, no flanco sul desta praia (mar). A Praia dos Anjos está localizada na Enseada dos Anjos, onde observa-se um porto e uma marina (flanco norte) e um enrocamento de proteção contra a erosão das ondas (flanco sul), construído pelo IEAPM (SAVI, 2007). Em

ambos os flancos da praia, os mexilhões são dominantes na zona entre marés dos costões rochosos (MONTEIRO-RIBAS *et al.*, 2006; SILVA e COUTINHO, 2007). A área é influenciada pelo fenômeno da ressurgência, que é o afloramento de massas de águas profundas frias (18 °C) ricas em nutrientes e salinidade que varia em torno de 35 (VALENTIN; *et al.*, 1987; VALENTIN, 2001; COELHO-SOUZA *et al.*, 2012).

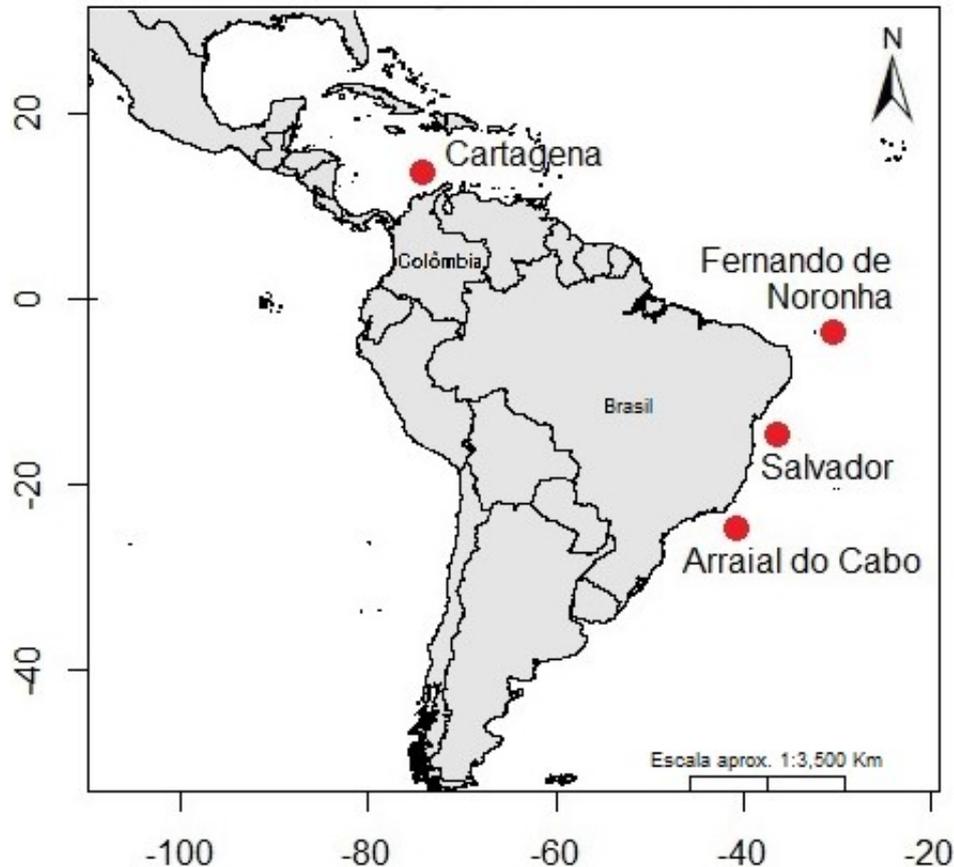


Figura 1 - Áreas de coleta dos espécimes registrados como *Brachidontes exustus* no Atlântico Sul Ocidental.

Tabela 1 - Locais, data e características do local de coleta de mexilhões do gênero *Brachidontes* e (N) número de espécimes.

Local	Coordenadas (GPS)	Data	N	Área da coleta	Salinidade
Baía de Cartagena, Cartagena das Índias, Colômbia	10°23'58"N; 75°30'51"O	04/06/2013	48	Manguezal	9,7–35,8
Praia da Cacimba do Padre, Fernando de Noronha	3°50'57"S; 32°26'20"O	18/10/2016	75	Costão de ilha oceânica	35–36
Baía de Todos os Santos, Salvador	12°48'S; 38°28' O	17/07/2015	48	Estuário	30–36
Praia do Pontal, Arraial do Cabo	22°57'58"S; 42°01'40"O	15/11/2016	75	Foz de Canal	28–36
Praia dos Anjos, Arraial do Cabo	22°57"S; 42°01"O	15/11/2016	48	Costão marinho	34–36

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE *Brachidontes*

As análises genético-moleculares foram iniciadas no Laboratório de Genética Marinha (LABGEM) do IEAPM, Arraial do Cabo, RJ e continuadas, em sua maior parte, no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM da UFRJ, Macaé, RJ.

3.2.1 Extração do DNA total

A caracterização genético-molecular foi iniciada com o processamento das partes moles de cada espécime que foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -20°C. O músculo adutor posterior foi utilizado para a extração do DNA, mas eventualmente foi necessário extrair também de outros tecidos, como o manto, em indivíduos de menor tamanho. O DNA total dos mexilhões foi extraído seguindo dois protocolos diferentes: 1) kit comercial *Wizard Promega*, de acordo com as instruções do fabricante; 2) protocolo Fenol/Clorofórmio/Proteinase-k (SAMBROOK *et al.*, 1989; HOETZEL, 1998). Seguindo este protocolo, o tecido do músculo foi macerado em 700 µL de tampão de lise (25mM de EDTA, 50 mM Tris-HCL, 1% de SDS) em microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 50 µL de proteinase-K (10 mg/mL) e, após agitação, foi incubada a amostra a 55°C por 4 horas. A seguir, foi realizada uma lavagem com 700 µL de solução PCI (25: 24: 1, fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. A fase superior aquosa foi retirada e transferida para um novo microtubo após 10 min de agitação e 5 min de centrifugação a 12.500g. A esta lavagem, seguiram duas lavagens de 500-400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24: 1), seguindo o mesmo procedimento realizado para o PCI. Finalmente, o DNA foi precipitado, adicionando etanol absoluto gelado no dobro de volume à última fase aquosa, a qual foi incubada durante a noite a -20°C. No dia seguinte, após a centrifugação por 10 min a 12.500g em 16°C, o *pellet* foi seco a temperatura ambiente, ressuspenso com 120 µL de TE (1mM Tris HCl; 0,5 mM EDTA; pH 7,4) e armazenados a -20°C. A qualidade do DNA extraído foi avaliada após 30 min de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% em tampão TEB 1X (Tris 0,09M; Borato 0,09 M; EDTA 2 mM) a 80 mA, seguido de visualização em transiluminador com o corante fluorescente Unisafe.

3.2.2 Amplificação do DNA

A análise genética, nesse estudo, foi baseada em dois marcadores moleculares do genoma mitocondrial (mtDNA): gene do citocromo-c-oxidase (COI) e gene do RNA ribossomal, subunidade maior (16S). A amplificação das regiões de interesse foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos (*primers*) universais para invertebrados descritos por PALUMBI *et al.* (1991) e FOLMER *et al.* (1994), como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Primers utilizados para amplificação dos marcadores 16S e COI.

Gene	Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho approx. (pb)	Referência
16S	AR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	540	Palumbi et al., 1991
	BR	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		
COI	LCOI 1490	TAAACTTCAGGGTGAAAAAATCA	660	Folmer et al., 1994
	HCO 2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG		

(16S) gene do RNA ribossomal, subunidade maior; (COI) gene do citocromo-c-oxidase.

A reação de PCR foi montada de acordo com os componentes e quantidades especificadas na Tabela 3 e foi submetida aos seguintes ciclos de temperatura no termociclador de gradiente, modelo Gradient Mastercycler da empresa Eppendorf: 1 ciclo de 4 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a cada temperatura de 92°C, 52°C e 72°C; 1 ciclo de extensão final de 7 min a 72°C. Para cada reação foi incluído um controle negativo na amplificação contendo todos os reagentes menos o DNA, com a finalidade de detectar possíveis contaminações.

Os produtos de PCR, juntamente com os controles negativos, foram verificados quanto à amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados. Isto foi realizado submetendo os produtos a 25 min de eletroforese em gel de agarose 1%, seguido de coloração fluorescente com Brometo de Etídio ou Unisafe e visualização em transiluminador com luz ultravioleta (254 nm). As imagens foram digitalizadas em fotodocumentador. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela comparação com padrões de 100 pb e o Puc19 (marcador padrão produzido no Laboratório de Bioquímica do NUPEM/UFRJ).

Tabela 3 - Componentes utilizados na PCR, volumes utilizados para uma reação e concentração das soluções estoque.

<i>Componentes da reação</i>	Volume para uma reação (µL)	Concentração do estoque
H ₂ O ultrapura	15,33	
Tampão da DNA polimerase	2,50	5 x
MgCl ₂	3,00	25 mM
dNTPs	0,24	100 µM
Triton-X-100	0,03	100 %
<i>Primer</i> Senso	0,10	100 µM
<i>Primer</i> anti-senso	0,10	100 µM
Taq DNA polimerase	0,20	10 U/µL
Total do <i>Master Mix</i>	24,00	
DNA extraído	1,00	
Volume final	25,00	

3.2.3 Sequenciamento, edição e análise das sequências

Uma vez constatada a amplificação de produto próximo do tamanho esperado (Tabela 2), estes foram enviados diretamente para sequenciar ou foram purificados previamente utilizando o kit Wizard da empresa Promega, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os produtos de PCR foram enviados primeiramente para sequenciar no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, PE e posteriormente, em sua maior parte, na empresa Macrogen, localizada em Seul, Coreia do Sul. As sequências foram editadas utilizando o programa Chromas Pro, v. 2.1.8. A seguir, estas foram submetidas à ferramenta online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn) do National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar se estes fragmentos eram a região do gene esperada.

3.2.4 Desenho de *primers*

Devido à falha na amplificação dos exemplares da população de Fernando de Noronha para o gene do COI, foi necessário o desenho de *primers* para outras espécies de *Brachidontes* e de variantes de *Brachidontes exustus* do Atlântico Sul. As sequências utilizadas foram obtidas do GenBank e se encontram listadas na

Tabela 4. Estas sequências foram alinhadas com a ferramenta *online* Clustal Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e desenhados *primers*. Estes *primers* foram avaliados pela ferramenta online IDT Primer Design (<https://www.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fprimerquest>) e a partir disso, foram selecionados os melhores *primers* para prosseguir com a amplificação do gene do COI.

Tabela 4 - Sequências de DNA do GenBank utilizadas para o desenho de *primers* para outras espécies e variantes de *Brachidontes* do Atlântico Sul.

Espécie	Local	Acesso GenBank
<i>B. puniceus</i>	Ilha de São Vicente, Calhau, Cabo Verde.	HM999789.1 (1)
<i>B. exustus</i>	Leste da Flórida, Estados Unidos.	KX713447.1 (2)
<i>B. exustus</i>	Layton (Florida Keys), Flórida, Estados Unidos.	MH012212.1 (3)

(1) CUNHA et al., 2011; (2) COMBOSCH et al., 2016; (3) METZGER et al., 2018.

3.2.5 Identificação e caracterização molecular das populações de *Brachidontes* estudadas

As sequências das populações de *Brachidontes* estudadas tiveram uma indicação de seu *status* específico quando estas foram submetidas à comparação com sequências depositadas no GenBank, através da ferramenta online BLAST. Estas comparações foram realizadas tanto para as sequências correspondentes ao gene do 16S quanto ao do COI. No entanto, devido à existência de alguns registros errados ou incompletos no GenBank, se procedeu à construção de redes de haplótipos, que permitem relacionar as diferentes populações mostrando as unidades mais próximas e as mais distantes. Foram incluídas em algumas redes as sequências de espécies ou variantes candidatas a representar as populações de *Brachidontes* aqui estudadas. As redes de haplótipos foram obtidas utilizando o programa POPART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) (<http://popart.otago.ac.nz>). Também foi construída uma árvore enraizada para o gene do COI, incluindo espécies de *Brachidontes* do Atlântico Sul, assim como *B. solisianus* e *Geukensia demissa* como grupo externo. Foi utilizado o algoritmo Maximum Likelihood para a construção desta árvore, utilizando o programa MEGA

7.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (<https://www.megasoftware.net/>). As distâncias genéticas p e Tamura-Nei foram obtidas pelo programa MEGA A distância p computa a proporção de nucleotídeos diferentes entre duas sequências, enquanto o modelo de Tamura-Nei estima a distância nucleotídica, considerando as taxas de transição e transversão.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE *Brachidontes*

Os mexilhões coletados passaram por um procedimento de limpeza das conchas no laboratório de processamento de materiais biológicos do IEAPM, onde tiveram as partes moles removidas para as análises moleculares. Após limpeza, cada mexilhão foi examinado com a ajuda de um microscópio estereoscópico no Laboratório de Microscopia do IEAPM e identificados até a espécie pelos caracteres morfológicos da concha de acordo com (AVELAR e NARCHI, 1984a, 1984b; RIOS, 1994). Alguns aspectos da morfologia externa e forma da concha foram considerados para a identificação: disposição predominante das estrias, desgaste do periostraco, ângulo dorsal, posição do umbo e concavidade da margem ventral. A valva esquerda de um representante de cada uma das localidades amostradas foi fotografada, usando microscópio estereoscópico Leica, modelo M205 FA, no Laboratório de Imagens do NUPEM/UFRJ (Figura 2). Os espécimes utilizados neste estudo serão depositados na Coleção Científica de Moluscos do IEAPM. De acordo com a literatura atual, os representantes de Cartagena, Salvador e Fernando de Noronha foram identificados por Rios (1994) e Meza *et al.* (2008) e da foz do canal em Arraial do Cabo por Quintanilha (2017) (Figura 2) que correspondem a *Brachidontes exustus*. Na quinta localidade, no costão rochoso marinho, foi coletado *Brachidontes (=Mytilaster) solisianus* (MONTEIRO-RIBAS *et al.*, 2006; SILVA e COUTINHO, 2007) (Figura 2) por coexistir em algumas áreas com o mexilhão do canal e para comparação genética devido a possíveis identificações duvidosas para a espécie no GenBank (GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2017).

As análises morfométricas foram realizadas para todos os espécimes de *Brachidontes*. Foram escolhidas cinco dimensões lineares já adotadas em estudos anteriores de *Brachidontes* (NALESSO, 1988; AGUIRRE *et al.*, 2006; GOTO *et al.*, 2011): comprimento total (C), altura (A), largura (L), comprimento anterior (CAD) e

posterior (CPD) dorsal (Figura 2 e Tabela 5). Estas dimensões foram medidas na valva esquerda de cada mexilhão com auxílio de um paquímetro digital MT-00855 Uyustools Profissional com precisão de 0,01mm, como mostra a Figura 3.

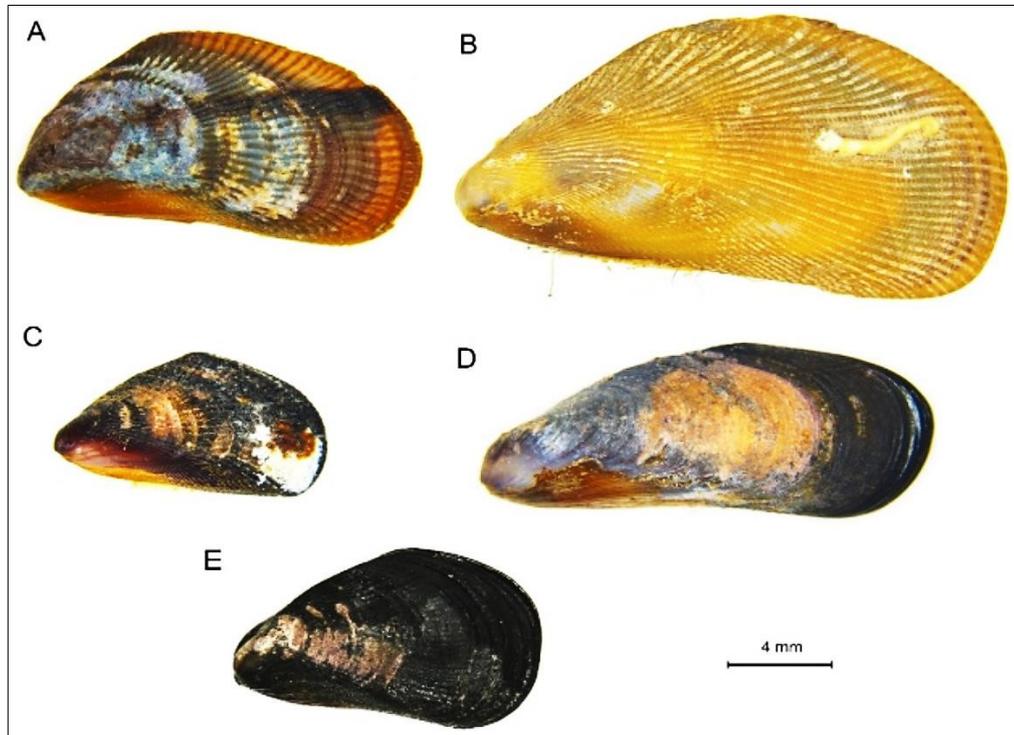


Figura 2 - Valva esquerda de *Brachidontes* dos diferentes locais de coleta: (A) Cartagena, (B) Salvador, (C) Fernando de Noronha, (D) Arraial do Cabo (Costão marinho) e (E) Arraial do Cabo (Foz do canal).

Com a finalidade de eliminar o efeito do tamanho dos indivíduos na comparação entre populações de uma mesma dimensão linear, foi necessário estabelecer medidas relativas ao comprimento do indivíduo, desta forma as variáveis de altura, largura, CAD e CPD foram transformadas dividindo os valores pelos respectivos comprimentos da concha. Estes valores relativos (A/C , L/C , CAD/C e CPD/C) foram utilizados para prosseguir com a análise morfométrica. As novas variáveis foram avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A seguir, uma Análise Discriminante Canônica (ADC) foi realizada para obter as combinações das novas variáveis como fatores multivariados. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa STATISTICA for Windows, v.7.0, Statsoft Inc.

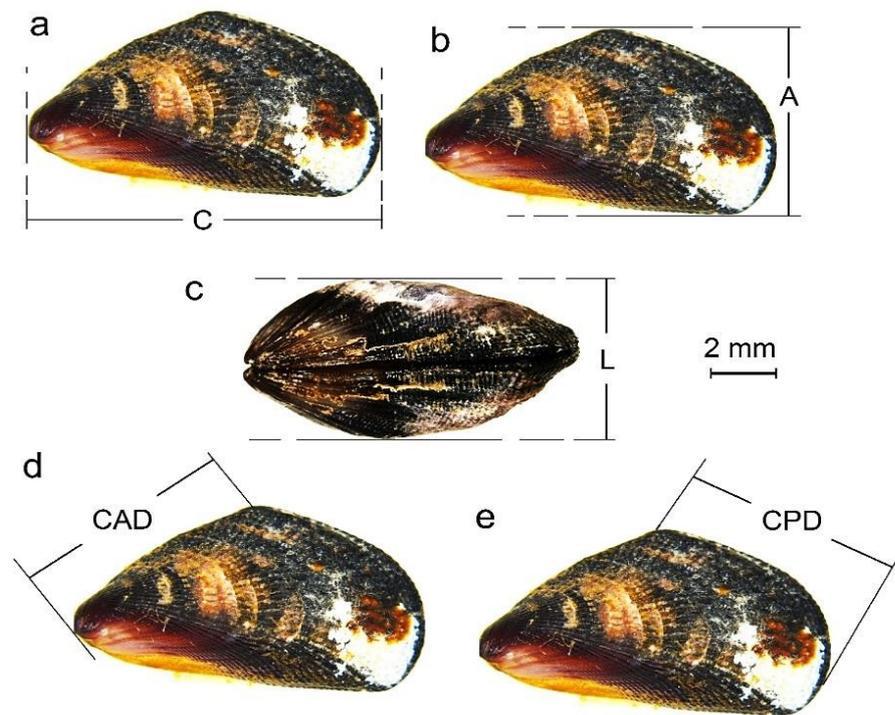


Figura 3 - Representação esquemática das dimensões lineares da concha em *Brachidontes* spp. (C) comprimento, (A) altura, (L) largura, (CAD) comprimento Anterior Dorsal e (CPD) comprimento posterior dorsal).

Tabela 5 - Parâmetros morfológicos utilizados nas análises morfométricas de *Brachidontes* coletados em Cartagena, Fernando de Noronha, Salvador e Arraial do Cabo.

Parâmetro	Abreviatura	Descrição
Comprimento	C	Distância máxima entre o umbo e região posterior da concha.
Altura	A	Distância máxima entre a margem dorsal e a margem ventral da concha.
Largura	L	Distância máxima entre as duas valvas.
Comprimento anterior dorsal	CAD	Distância máxima entre o umbo até o vértice do ângulo dorsal.
Comprimento posterior dorsal	CPD	Distância máxima entre o vértice do ângulo dorsal e a margem posterior da concha.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE *Brachidontes* ESTUDADAS BASEADAS NOS GENES DO 16S rRNA E DO COI

A caracterização molecular das populações estudadas foi possível com os genes do 16S rRNA e do COI, como descrito a seguir.

4.1.1 REGIÃO DO GENE DO 16S rRNA EM *Brachidontes*

A amplificação do gene mitocondrial do 16S rRNA foi eficiente, utilizando os *primers* AR/BR descritos por Palumbi *et al.* (1991), obtendo-se uma região de tamanho entre 484–540 pb para os mexilhões das populações estudadas (Tabela 6).

Foram obtidas 62 sequências parciais do gene mitocondrial do 16S rRNA, sendo 10 de mexilhões de Cartagena, 22 de Fernando de Noronha, 10 de Salvador, 10 de Arraial do Cabo (canal) e 10 Arraial do Cabo (mar), estes últimos correspondentes à espécie *B. solisianus*. Quando alinhadas às sequências de 492 pb obtidas, foram registrados 373 sítios conservados e 119 sítios variáveis. Estes sítios variáveis determinaram 14 haplótipos diferentes, sendo 3 de Cartagena (CT-H1-3), 2 de Fernando de Noronha (FN-H1-2), 3 de Salvador (SV-H1-3), 4 de Arraial do Cabo (Canal, AR-H1-4) e 2 de Arraial do Cabo (Mar, AC-H1-2). Os haplótipos mais frequentes de cada população, denominados de H1, junto com os haplótipos menos frequentes, são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 - Tamanhos dos fragmentos obtidos de mexilhões *Brachidontes* para os genes do 16S rRNA e do COI.

População	16S			COI		
	Primer	Fragmento (pb)	N	Primer	Fragmento (pb)	N
Cartagena	AR/BR	484	10	LCOI/HCOI	661	3
Fernando de Noronha	AR/BR	486	22	Bpun-F/Bpun-R	464	15
Salvador	AR/BR	484	10	LCOI/HCOI	661	10
Arraial do Cabo (Canal)	AR/BR	492	10	LCOI/HCOI	661	7
Arraial do Cabo (Mar)	AR/BR	540	10	LCOI/HCOI	467	1

Tabela 7 - Haplótipos do gene do 16S rRNA em *Brachidontes* e suas frequências nas localidades estudadas.

Local	Haplótipos	Código dos mexilhões	Frequência dos haplótipos
Cartagena (N= 10)	CT-H1	DC1–2, DC4–6, DC8, DC10	0,700
	CT-H2	DC3, DC7	0,200
	CT-H3	DC9	0,100
Fernando de Noronha (N= 22)	FN-H1	FD2–9, FD11–13, FD15, FD57, FD260–264, FD266–267, FD269	0,954
	FN-H2	FD265	0,045
Salvador (N= 10)	SV-H1	SD1, SD3, SD5–8	0,600
	SV-H2	SD2, SD4, SD9	0,300
	SV-H3	SD10	0,100
Arraial do Cabo (Canal) (N= 10)	AR-H1	DA3–5, DA7, DA10	0,700
	AR-H2	DA1	0,100
	AR-H3	DA2	0,100
	AR-H4	DA6	0,100
Arraial do Cabo (Mar) (N= 10)	AC-H1	ACS1, ACS3	0,900
	AC-H2	ACS2	0,100

Ao comparar as sequências do 16S provenientes de mexilhões das diferentes populações de *Brachidontes* estudadas com as depositadas no GenBank, obteve-se que as sequências dos mexilhões de Cartagena e Salvador mostraram como máximo 94,07% de similaridade, numa cobertura de 99% de sua sequência, com *B. exustus*, variedade encontrada na praia Madeira da Flórida (Acesso GenBank KM233636; BENNETT et al., 2011). As sequências dos mexilhões de Fernando de Noronha mostraram como máximo 86,61% (cobertura de 100%) de similaridade com *B. mutabilis* (= *Hormomya sinensis*; Acesso GenBank KY081315.1; LIU et al., 2018). As sequências dos mexilhões de Arraial do Cabo (canal) mostraram um máximo de 84,53% (cobertura de 100%) de similaridade com *B. variabilis* (Acesso GenBank KY081313.1; LIU et al., 2018) e os marinhos da mesma localidade (*B. solisianus*) mostraram 99,53% (cobertura de 100%) de similaridade com uma sequência erroneamente registrada como *Perna perna* (Acesso GenBank KM655841.1; ULIANO-SILVA et al., 2015), a qual corresponde à espécie *Mytilaster* (= *Brachidontes*) *solisianus* (TROVANT et al., 2016), erro previamente identificado

por García-Souto *et al.* (2017). Esta sequência mostrou 90,95% de similaridade (cobertura de 80%) com *B. pharaonis* (Acesso GenBank DQ833530.1; TERRANOVA *et al.*, 2007). Devido à falta de sequências do gene 16S das diferentes espécies de *Brachidontes* no GenBank, não foi possível confirmar as espécies às quais as populações estudadas correspondem, com a exceção de *B. solisianus*. No entanto, com a rede de haplótipos obtida a partir dos mexilhões das diferentes populações, foi possível identificar as populações que pertencem à mesma espécie, como é o caso de Cartagena e Salvador, que inclusive compartilham seus haplótipos mais frequentes (Figura 4.) e mostram uma distância extremamente baixa $0,002 \pm 0,001$). Considerando a população de Cartagena e de Salvador como um mesmo grupo, as diferentes populações estudadas estão separadas por muitos passos evolutivos, mostrando distâncias entre 0,154 – 0,167 (Figura 5, Tabela 8), ressaltando que a espécie marinha de Arraial do Cabo coletada nos costões rochosos da Praia dos Anjos corresponde a *B. solisianus*, recentemente transferida para o gênero *Mytilaster* (TROVANT *et al.*, 2016).

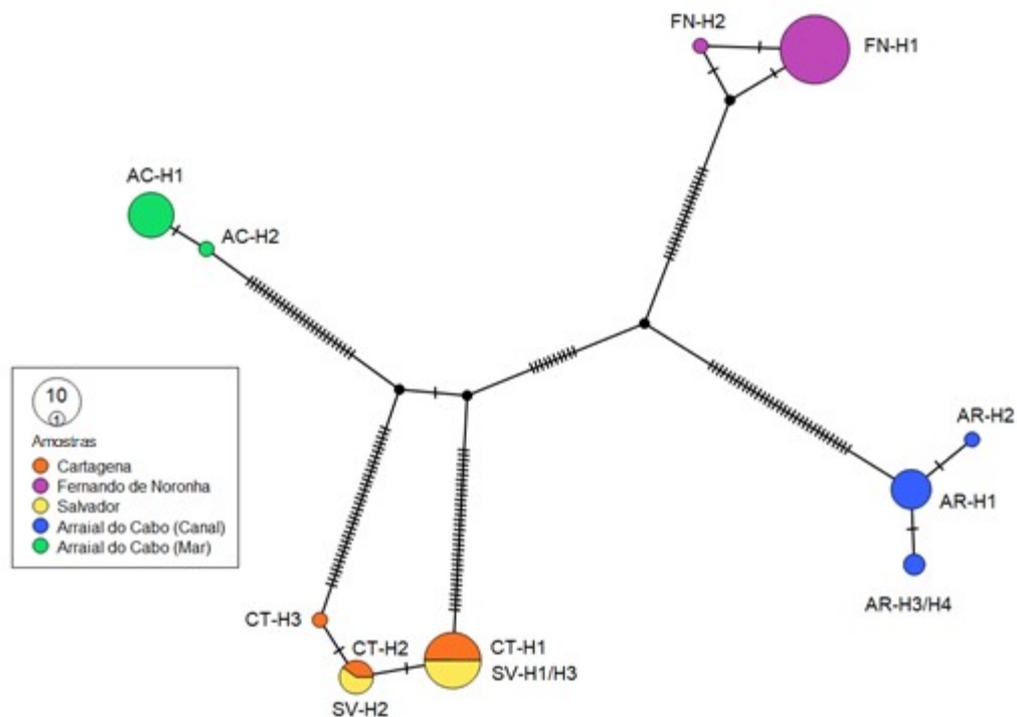


Figura 4 - Rede de haplótipos do 16S correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando a posição dos haplótipos mais frequentes de cada grupo. Os haplótipos AC-H1/H2 correspondem à espécie *Brachidontes* (= *Mytilaster*) *solisianus*.

Na árvore filogenética (Figura 5), se observa um agrupamento semelhante ao da rede de haplótipos da Figura 4, onde as populações de Cartagena e Salvador são agrupadas num mesmo clado, confirmando com a baixa distância observada entre estas populações (Tabela 8). A espécie *B. solisianus* (Arraial do Cabo-Mar) se mostrou mais próxima das populações de Cartagena e Salvador do que das populações de Fernando de Noronha e de Arraial do Cabo do Canal (Figura 5 e Tabela 8).

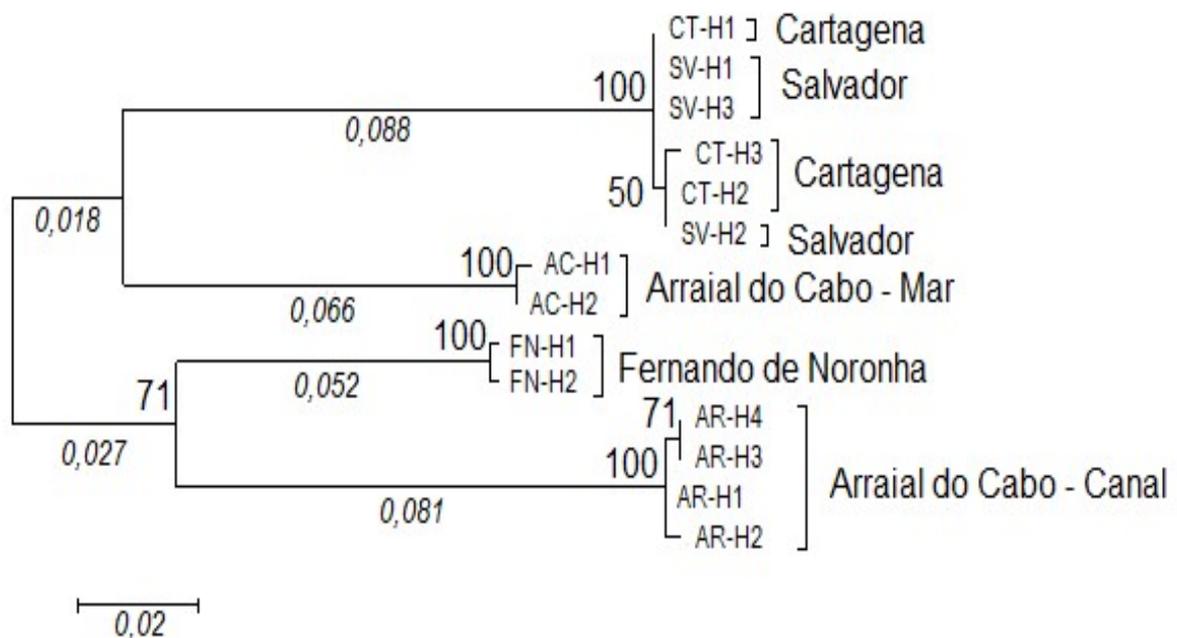


Figura 5 - Árvore filogenética de máxima probabilidade (Maximum Likelihood - distância Tamura-Nei) utilizando os haplótipos do 16S correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental. Os haplótipos AC-H1/H2 correspondem à espécie *Brachidontes* (= *Mytilaster*) *solisianus*.

Tabela 8 - Distância nucleotídica e erro padrão entre pares de populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental avaliados sobre 442 pb (regiões com deleções excluídas). Distância-P (abaixo da diagonal) e distância de Tamura-Nei (sobre a diagonal).

	FN	AR	AC	SV	CT
FN	****	0.139 ± 0.019	0.147, ± 0.020	0.166 ± 0.020	0.167 ± 0.020
AR	0,124 ± 0,015	****	0.180 ± 0.022	0.163 ± 0.021	0.164 ± 0.021
AC	0,132 ± 0,015	0,157 ± 0,016	****	0.154 ± 0.020	0.154 ± 0.020
SV	0,148 ± 0,015	0,145 ± 0,016	0,138 ± 0,015	****	0.002 ± 0.001
CT	0,149 ± 0,015	0,146 ± 0,016	0,138 ± 0,015	0,002 ± 0,001	****

4.1.2 ANÁLISE GENÉTICA DA REGIÃO DO COI

As amplificações do gene mitocondrial *COI* foram eficientes utilizando os *primers* de Folmer *et al.* (1994) para os mexilhões das populações de Cartagena, Salvador e Arraial do Cabo, gerando fragmentos de tamanhos entre 467–661 (Tabela 6). Os mexilhões de Fernando de Noronha foram amplificados somente com o par de *primers* especificamente desenhados para *B. puniceus*, Bpun-F (cac cca ggt aac ttt ttg tt) e Bpun-R (cag cat agt aat acc tcc ag). No entanto, obteve-se um fragmento menor ao conseguido para as outras populações, devido aos *primers* terem sido desenhados de uma região interna do fragmento amplificado pelos *primers* de Folmer. Foram obtidas em total 37 sequências para o gene mitocondrial *COI*, como mostra a Tabela 9, sendo que a sequência de *B. solisianus* (AC-H1) somente foi obtida para comparação com a outra espécie de Arraial do Cabo, que em algumas áreas co-existem. A comparação das populações estudadas foi possível para um fragmento de 425 pb, mostrando após o alinhamento, 220 sítios conservados e 205 sítios polimórficos. Os sítios polimórficos determinaram 16 haplótipos: 3 de Cartagena (CT-CH1–CH3), 5 de Fernando de Noronha (FN-CH1–5), 5 de Salvador (SV-CH1–5) e 3 de Arraial do Cabo (Canal). As frequências dos haplótipos mais frequentes, denominados de CH1, e os de menor frequência nas diferentes populações são apresentados na Tabela 9.

A comparação das sequências obtidas das diferentes populações estudadas com sequências de *Brachidontes* depositadas no GenBank mostraram que os mexilhões de Salvador e Cartagena tem 100% (98% cobertura) de identidade com *Brachidontes exustus* (KY454042.1, GARCIA-SOUTO *et al.* 2017; AY621861.1, LEE E Ó FOIGHIL, 2005). As sequências dos mexilhões de Fernando de Noronha mostraram similaridade de 96,41% (100% cobertura) com um clado bem diferenciado, clado B das Bahamas, do complexo de espécies de *Brachidontes exustus* (LEE E Ó FOIGHIL, 2005) e mostrou 94,30% (100% cobertura) com *Brachidontes puniceus*, espécie encontrada em Cabo Verde (CUNHA *et al.*, 2011). Os indivíduos de Arraial do Cabo (Canal) mostraram 100% (90% cobertura) de similaridade com *Brachidontes darwinianus* (KT318212.1, TROVANT *et al.*, 2016). A sequência de *B. solisianus* mostrou similaridade com o registro errôneo de *Perna perna* (KM655841.1, ULIANO-SILVA *et al.*, 2015) que corresponde a *B. solisianus*; e

como esperado mostrou 100% (82% cobertura) de similaridade com esta última espécie (KT318262.1, TROVANT *et al.*, 2016).

Tabela 9 - Haplótipos do gene *COI* em *Brachidontes* e suas frequências nas localidades estudadas.

População	Haplótipos	Código Indivíduos	Frequência
Cartagena (N = 3)	CT-CH1	Brachi7	0,333
	CT-CH2	Brachi43	0,333
	CT-CH3	Brachi46	0,333
Fernando de Noronha (N = 15)	FN-CH1	FD220–222, FD224–227, FD 253, FD255–257	0,733
	FN-CH2	FD259	0,067
	FN-CH3	FD254	0,067
	FN-CH4	FD223	0,067
	FN-CH5	FD258	0,067
Salvador (N = 10)	SV-CH1	Brachi12, 58, 61, 144, 158	0,500
	SV-CH2	Brachi149, 153f	0,200
	SV-CH3	Brachi151	0,100
	SV-CH4	Brachi62	0,100
	SV-CH5	Brachi60	0,100
Arraial do Cabo (Canal) (N = 8)	AR-CH1	Brachi50f, 52, 54, 57, DA195	0,625
	AR-CH2	Brachi51f, DA198	0,250
	AR-CH3	Brachi48	0,100
Arraial do Cabo (Mar) (N = 1)	AC-CH1	SL18	-

A rede de haplótipos construída com as sequências parciais do *COI* de *Brachidontes* dos locais analisados (Figura 6) mostra a proximidade dos haplótipos de Cartagena e Salvador que determinou uma distância extremamente baixa entre eles de $0,004 \pm 0,002$ (Tabela 11). Este grupo mostrou distâncias médias elevadas com os mexilhões de Fernando de Noronha ($0,208 \pm 0,023$) e de Arraial do Cabo ($0,250 \pm 0,027$); e estes últimos mostraram uma distância de $0,227 \pm 0,025$ (Tabela 11). Na Figura 7, também é possível identificar a posição do haplótipo mais comum de cada grupo. A rede de haplótipos, que inclui as sequências de outros *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental obtidas do GenBank (Tabela 10), mostra a proximidade das populações estudadas com determinadas espécies (Figura 7). Assim podemos observar que Cartagena e Salvador ficam muito próximos da

variedade 3 de *B. exustus*, encontrada em Miami, EUA, com a qual mostram uma distância de $0,005 \pm 0,002$ (Tabela 11, Figura 7). A população de Arraial do Cabo (canal) fica no mesmo grupo de *B. darwinianus* registrada para Montevideu, mostrando uma distância com esta de $0,006 \pm 0,003$ (Tabela 11, Figura. 7). A população de Fernando de Noronha, por sua vez, fica agrupada entre *B. puniceus* de Cabo Verde e a variedade de Bahamas de *B. exustus* (Figura 7), mostrando uma distância de $0,063 \pm 0,011$ e de $0,038 \pm 0,009$, respectivamente. *B. exustus* variedade Bahamas e *B. puniceus* mostram uma distância de $0,068 \pm 0,012$ (Tabela 11).

Tabela 10 - Sequências nucleotídicas da região do gene *COI* obtidas do GenBank e utilizadas para determinar a proximidade das populações estudadas com outras espécies e variantes de *Brachidontes* do Atlântico Sul.

Espécie	Local	Acesso
<i>B. rodriguezii</i>	Santa Clara del Mar, Buenos Aires, Argentina	KC844454.1(1)
<i>B. rodriguezii</i>	Mar del Plata, Argentina.	KY454053.1 (2)
<i>B. darwinianus</i>	Punta del Este, Uruguai.	KC844414.1 (1)
<i>B. puniceus</i>	Ilha de São Vicente, Calhau, Cabo Verde.	HM999789.1 (4)
<i>B. modiolus</i>	Long Key (marino), Flórida, Estados Unidos.	AY621917.1 (5)
<i>B. modiolus</i>	Caribe colombiano, Bolivar, Colômbia.	JN991296.1 (NP)
<i>B. exustus</i> Var B	Haplótipo B, Bahamas	AY621858.1 (5)
<i>B. exustus</i> Var1	Leste da Florida, Estados Unidos.	KX713447.1 (3)
<i>B. exustus</i> Var2	Layton (Florida Keys), Flórida, Estados Unidos.	MH012212.1 (6)
<i>B. exustus</i> Var3	Miami, Flórida,	KY454042.1 (2)
<i>Geukensia demissa</i>	Atlântico norte-ocidental, Estados Unidos.	U56844.1 (7)

(1) TROVANT *et al.*, 2013; (2) GARCIA-SOUTO *et al.*, 2017; (3) COMBOSCH *et al.*, 2016; (4) CUNHA *et al.*, 2011; (5) LEE E Ó FOIGHIL, 2004; (6) METZGER *et al.*, 2018; (7) HOEH *et al.*, 1998; (NP) não publicado. A espécie *G. demissa* foi utilizada nas análises como grupo externo.

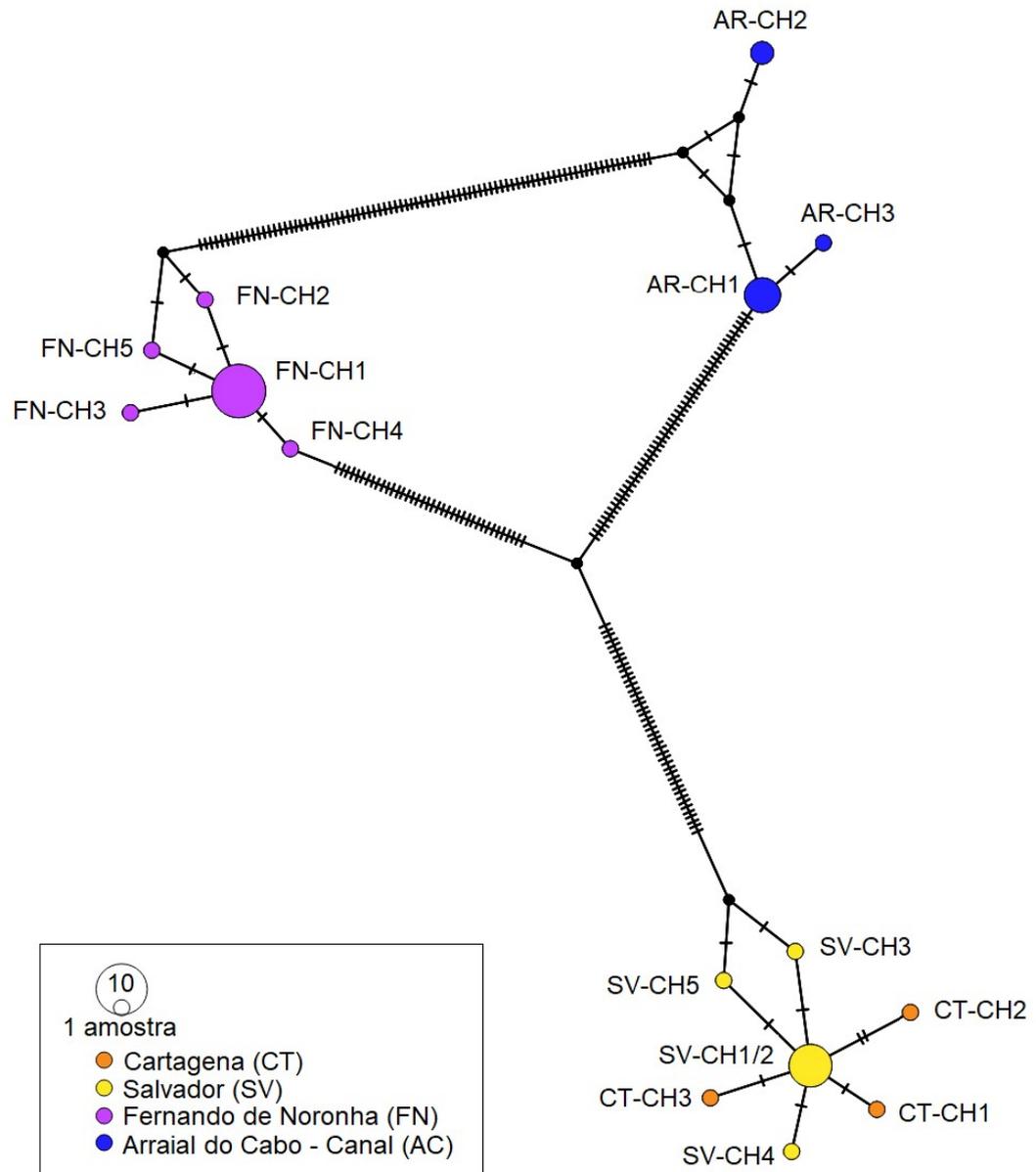


Figura 6 - Rede de haplótipos do *COI* correspondentes a mexilhões de diferentes populações de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando a posição dos haplótipos mais frequentes de cada grupo.

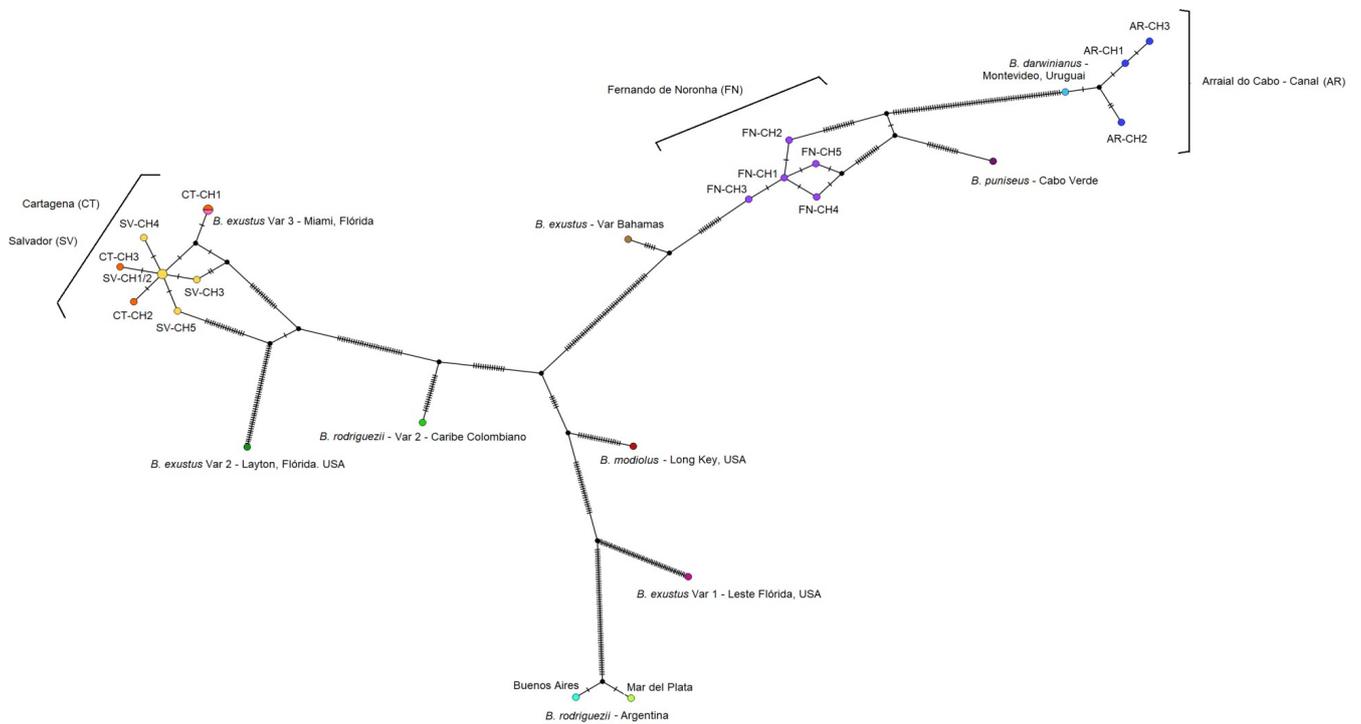


Figura 7 - Rede de haplótipos do *COI* correspondentes a mexilhões das populações estudadas de *Brachidontes* do Atlântico Sul Ocidental, mostrando o posicionamento em relação a outras espécies, portanto suas divergências e similaridades com as diferentes variantes de *Brachidontes*.

Tabela 11 – Matriz de distâncias com o erro padrão (SE) para o gene COI entre as populações estudadas, incluindo as sequências de *Brachidontes* baixadas do GenBank. Abaixo da diagonal a distância $P \pm SE$; acima da diagonal a distância Tamura-Nei $\pm SE$.

	CT	SV	Br	AR	Be1	Bd	Bp	BeB	FN	Bm	Br2	Be2	Be3	Gd
CT	*****	0,004±0,002	0,266±0,028	0,249±0,027	0,302±0,030	0,245±0,027	0,218±0,024	0,217±0,024	0,209±0,024	0,212±0,022	0,153±0,019	0,162±0,021	0,004±0,002	0,298±0,030
SV	0,004±0,002	*****	0,266±0,028	0,251±0,027	0,304±0,030	0,247±0,027	0,215±0,024	0,216±0,024	0,207±0,023	0,213±0,023	0,152±0,019	0,160±0,021	0,006±0,003	0,301±0,030
Br	0,219±0,018	0,218±0,018	*****	0,277±0,028	0,289±0,030	0,280±0,029	0,271±0,030	0,267±0,029	0,264±0,029	0,258±0,029	0,266±0,028	0,282±0,029	0,270±0,028	0,279±0,030
AR	0,205±0,017	0,206±0,017	0,224±0,018	*****	0,271±0,029	0,006±0,003	0,229±0,025	0,240±0,027	0,227±0,025	0,246±0,027	0,282±0,030	0,246±0,028	0,247±0,027	0,262±0,028
Be1	0,024±0,018	0,245±0,018	0,232±0,018	0,220±0,019	*****	0,272±0,029	0,282±0,031	0,286±0,029	0,295±0,030	0,241±0,026	0,297±0,031	0,296±0,030	0,299±0,030	0,008±0,004
Bd	0,203±0,018	0,204±0,018	0,225±0,018	0,006±0,003	0,221±0,019	*****	0,226±0,025	0,232±0,026	0,221±0,024	0,238±0,027	0,273±0,029	0,243±0,028	0,244±0,027	0,262±0,028
Bp	0,184±0,018	0,182±0,018	0,221±0,019	0,189±0,016	0,229±0,019	0,187±0,016	*****	0,068±0,012	0,063±0,011	0,201±0,024	0,224±0,025	0,223±0,026	0,217±0,024	0,275±0,030
BeB	0,184±0,017	0,183±0,017	0,217±0,019	0,196±0,017	0,232±0,019	0,192±0,017	0,063±0,011	*****	0,038±0,009	0,191±0,023	0,207±0,024	0,208±0,024	0,216±0,024	0,279±0,028
FN	0,178±0,017	0,176±0,017	0,217±0,019	0,190±0,016	0,237±0,019	0,185±0,016	0,059±0,010	0,037±0,008	*****	0,205±0,023	0,223±0,025	0,197±0,023	0,208±0,024	0,288±0,029
Bm	0,180±0,017	0,181±0,017	0,212±0,018	0,201±0,017	0,202±0,018	0,196±0,017	0,171±0,017	0,164±0,017	0,174±0,017	*****	0,131±0,018	0,251±0,028	0,210±0,022	0,247±0,027
Br2	0,135±0,015	0,135±0,015	0,218±0,018	0,222±0,018	0,240±0,019	0,217±0,017	0,187±0,018	0,177±0,018	0,187±0,018	0,118±0,014	*****	0,242±0,026	0,149±0,019	0,307±0,031
Be2	0,140±0,015	0,138±0,015	0,229±0,019	0,201±0,018	0,240±0,019	0,200±0,018	0,187±0,018	0,177±0,018	0,169±0,018	0,206±0,019	0,198±0,017	*****	0,161±0,021	0,295±0,030
Be3	0,004±0,002	0,005±0,003	0,222±0,018	0,204±0,018	0,242±0,018	0,202±0,018	0,183±0,018	0,183±0,018	0,177±0,017	0,179±0,017	0,133±0,015	0,139±0,015	*****	0,296±0,030
Gd	0,241±0,018	0,243±0,018	0,225±0,018	0,215±0,019	0,008±0,004	0,215±0,019	0,225±0,019	0,227±0,018	0,232±0,018	0,206±0,018	0,246±0,019	0,240±0,019	0,240±0,018	*****

Legenda: CT = Cartagena; SV = Salvador; Br = *B. rodriguezii*; AC = Arraial do Cabo; Be1 = *B. exustus* variedade 1; Bd = *B. darwinianus*; Bp = *B. puniceus*; BeB = *B. exustus* variedade Bahamas; FN = Fernando de Noronha; Bm = *B. modiolus*; Br2 = *B. rodriguezii* variedade2; Be2 = *B. exustus* variedade 2; Be3 = *B. exustus* variedade 3; Gd = *G. demissa*

A árvore filogenética reconstruída para o gene COI para as populações de *Brachidontes* aqui estudadas e as obtidas do GenBank do Atlântico, mostrou resultados congruentes com a rede de haplótipos, confirmando a proximidade de Cartagena e Salvador e sua proximidade com a variedade de Miami da espécie *B. exustus* (Figura 8). Também, é confirmada a proximidade dos mexilhões de Fernando de Noronha à variedade das Bahamas de *B. exustus*, assim como a *B. puniceus*, espécie encontrada apenas na ilha de São Vicente em Calhau em Cabo Verde (MORTON, 2012), constituindo estes três grupos um clado independente (Figura 8). Nesta árvore, também os espécimes de Arraial do Cabo (Canal) formam um clado com *B. darwinianus*, da localidade de Punta Canário, Montevideú, Uruguai (Figura 8).

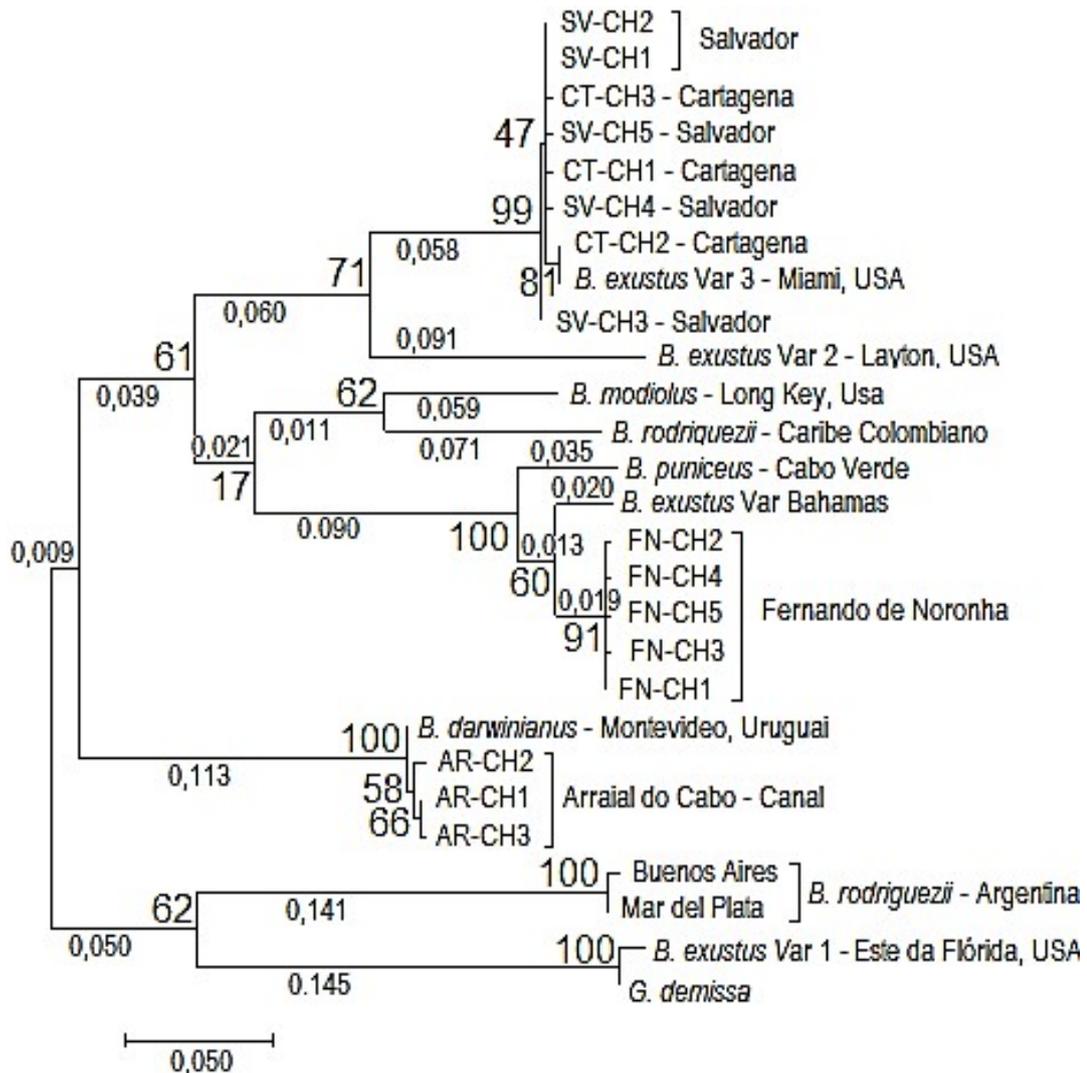


Figura 8 - Árvore filogenética para o gene COI reconstruída pelo método estatístico Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood- distância Tamura-Nei) a partir do cálculo das distâncias genéticas entre as populações incluindo seqüências recuperadas do GenBank de diferentes espécies e variedades de *Brachidontes*.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Foi avaliado um total de 240 espécimes de *Brachidontes* das localidades estudadas de Cartagena, Fernando de Noronha, Salvador e Arraial do Cabo, cujos tamanhos máximos e mínimos, médias e desvios padrão são especificados na Tabela 12. A população de Fernando de Noronha mostrou os menores tamanhos médios e Arraial do Cabo, os maiores tamanhos médios das populações estudadas (Tabela 12).

Tabela 12 - Número de indivíduos, faixas de tamanho, médias e desvio padrão das população de *Brachidontes* estudadas no Atlântico Sul Ocidental.

População	N	Faixa de tamanho (mm)	Média e desvio Padrão
Cartagena	75	10,70 – 25,72	19,07 ± 3,10
Fernando de Noronha	75	5,25 – 15,58	11,01 ± 1,91
Salvador	45	5,78 – 31,20	18,60 ± 5,76
Arraial do Cabo (Canal)	45	18,22 – 28,33	23,57 ± 2,60

Quanto à morfologia externa da concha, os mexilhões estudados apresentaram algumas diferenças, como descrito a seguir:

Os espécimes de Cartagena exibiram na margem dorsal das valvas o ângulo deslocado para a região anterior da concha, margem posterior arredondada e margem ventral levemente côncava. O umbo terminal (localizado muito próximo à margem anterior ventral da concha). O periostraco levemente desgastado de coloração marrom acinzentado a amarelo escuro próximo à borda posterior. As estrias do tipo radiais divergentes sobre toda a superfície da concha bem marcadas na parte dorsal e posterior.

Os exemplares de Fernando de Noronha exibem o ângulo dorsal numa posição aproximadamente equidistante dos extremos anterior e posterior da concha. A margem posterior é arredondada e a concavidade na margem ventral é ausente. O umbo terminal, relativamente próximo da margem anterior ventral. O periostraco conservado de coloração que varia entre marrom enegrecido, castanho-escuro e castanho-claro em direção à margem anterior ventral. As estrias radiais sobre toda a

superfície da concha com marcas concêntricas intensas e que se divergem em direção à margem ventral.

Os indivíduos de Salvador apresentaram na margem dorsal das valvas ângulo suave deslocado para a região anterior da concha, embora alguns exemplares apresentem leve angulação; margem posterior arredondada e margem ventral levemente côncava. O umbo está relativamente próximo à margem anterior ventral da concha. O periostraco intacto de cor amarelada levemente enegrecido na proximidade do umbo, apesar de alguns indivíduos apresentarem a coloração amarronzada. As estrias radiais divergentes sobre toda a superfície da concha, são bem marcadas na parte dorsal e posterior.

Os exemplares do canal, em Arraial do Cabo, apresentam na margem dorsal das valvas um ângulo levemente deslocado para a região posterior da concha e concavidade na margem ventral. O umbo próximo está à margem anterior ventral da concha. O periostraco é levemente desgastado e tem cor marrom enegrecida por toda a concha. As estrias radiais são divergentes sobre toda a superfície da concha e são mais evidentes na parte dorsal, posterior e anterior.

4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A primeira análise discriminante (AD), a partir das variáveis relativas e para as localidades estudadas, mostrou-se significativa (Lambda de Wilks: 0,19902; $F(12,632) = 44,323$; $p < 0,0000$) e revelou que as variáveis de altura, largura e comprimento dorsal anterior relativo foram significativamente informativas para a discriminação dos grupos, não sendo significativo o comprimento dorsal posterior relativo (Tabela 13). A falta de significância desta última variável pode ser constatada também pela baixa correlação desta variável nas raízes canônicas (Tabela 14). Duas raízes canônicas foram obtidas, com correlação canônica com os dados (variáveis) de 0,786, sendo ambas significativas (Tabela 15).

Tabela 13 - Significância das variáveis na discriminação morfológica dos mexilhões das diferentes localidades estudadas (N=240).

Variáveis	Lambda de Wilks	Lambda parcial	F-remoção (3,239)	p	Tolerância	1-Tolerância (R-quadrado)
Alt/C	0,213446	0,932407	5,77526	0,898149	0,898149	0,101851
Lar/C	0,419186	0,474773	88,13277	0,000000	0,998292	0,001708
CAD/C	0,322676	0,616775	46,49981	0,000000	0,922013	0,077987
CPD/C	0,199398	0,998098	0,15183	0,928446	0,955896	0,044105

Em vermelho, as variáveis que foram significativas.

Tabela 14 - Correlações das variáveis relativas nas raízes canônicas da análise discriminante realizada a partir das variáveis relativas dos mexilhões das diferentes localidades estudadas.

Variável	Raiz 1	Raiz 2
Alt/C	0,485959	- 0,248163
Lar/C	- 0,776599	- 0,586182
CAD/C	0,549553	- 0,794894
CPD/C	0,036349	0,109842

Tabela 15 - Significância das raízes canônicas e seus parâmetros obtidas da análise discriminante das variáveis morfológicas relativas dos mexilhões das diferentes localidades estudadas. Teste Qui-quadrado com raízes removidas sucessivamente.

Raiz removida	Valores próprios	R Canônico	Lambda Wilks	Qui-quadrado	Graus de liberdade	p
0	1,621593	0,786481	0,199036	389,0393	12	0,00
1	0,916477	0,691527	0,521791	156,7678	6	0,00

As maiores distâncias (Mahalanobis) foram observadas entre os mexilhões de Fernando de Noronha e Cartagena e a menor distância foi observada entre Cartagena e Salvador (Tabela 16). A matriz de classificação mostra 76 % de classificações corretas, onde os mexilhões de Cartagena, Fernando de Noronha e Arraial do Cabo foram classificados corretamente em mais de 80%, de acordo com as funções canônicas. No entanto, Salvador mostrou uma porcentagem muito baixa, de menos de 40% de classificações corretas (Tabela 17). A separação dos grupos, no plano discriminante canônico, formado pelas raízes canônicas 1 e 2 (Figura. 9a), mostra a proximidade de Salvador e Cartagena com uma ampla sobreposição, tanto na primeira quanto na segunda raiz. Os mexilhões de Arraial do Cabo, ainda que mostrando uma certa sobreposição com os mexilhões das outras localidades, numa

posição relativamente intermediária sobre a primeira raiz, é claramente separado sobre a segunda raiz. A população de Fernando de Noronha mostra uma ampla separação em relação às outras populações, considerando a primeira raiz, ainda que apresente um certo grau de sobreposição nas proximidades dos outros grupos (Figura. 9a).

Tabela 16 - Quadrado das Distâncias de Mahalanobis entre os mexilhões das diferentes localidades estudadas com base nas características morfológicas (variáveis relativas).

População	Cartagena	F. Noronha	Salvador	Arraial do Cabo (canal)
Cartagena	*****			
F. Noronha	10,01076	*****		
Salvador	1,72937	5,39059	*****	
Arraial do Cabo (canal)	8,71031	8,42258	3,010365	*****

Tabela 17 - Matriz de classificação dos mexilhões das diferentes localidades estudadas de acordo com a análise discriminante. As classificações previstas (colunas) e as observadas (linhas) com a porcentagem de acerto.

População	% Classificação correta	Cartagena $p = 0,30488$	F. Noronha $p = 0,30488$	Salvador $p = 0,19512$	Arraial do Cabo* $p = 0,19512$
Cartagena	82,66666	62	2	9	2
F. Noronha	88,00000	4	66	1	4
Salvador	35,41667	18	5	17	8
Arraial do Cabo*	89,58334	0	2	3	43
Total	76,42277	84	75	30	57

* Espécimes coletados no canal da Praia do Pontal.

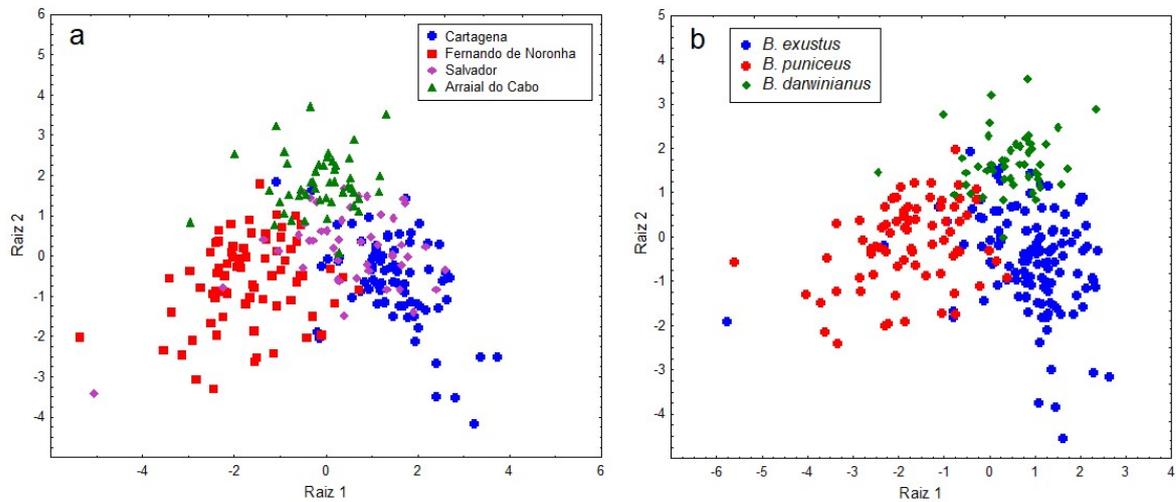


Figura 9 - Plano discriminante canônico com a dispersão dos mexilhões de acordo com os parâmetros morfológicos definidos pelas raízes canônicas: a) das diferentes localidades, b) das diferentes espécies de mexilhões do gênero *Brachidontes* estudados.

Agrupando os mexilhões em seus respectivos grupos específicos, baseados nos resultados moleculares, e nomeando a espécie diferenciada de Fernando de Noronha como *B. puniceus*, também foi significativa a análise discriminante (Lambda de Wilks: 0,24064; $F(8,480) = 62,310$; $p < 0,0000$) e com correlação canônica de 0,765. Foram significativas as mesmas variáveis que na análise anterior, não sendo significativa a variável relativa do comprimento dorsal posterior, e sendo significativas ambas raízes. As funções de classificação baseadas nas espécies (Tabela 18) foram melhores preditoras que quando separadas por localidade, sendo possível uma classificação correta em mais de 85% para as três espécies (Tabela 19). No plano discriminante canônico também podem se diferenciar melhor os grupos (Fig. 9b). Em *B. puniceus* se resalta uma concha muito mais larga que as outras espécies com ângulo dorsal intermediário, quanto *B. darwinianus* mostra um ângulo dorsal desviado posteriormente e *B. exustus* um ângulo dorsal desviado anteriormente (Tabela 20).

Tabela 18 - Funções de classificação segundo a análise discriminante canônica para cada espécie de *Brachidontes* estudada.

Variável	<i>B. exustus</i> $p = 0,50000$	<i>B. puniceus</i> $p = 0,30488$	<i>B. darwinianus</i> $p = 0,19512$
Alt/C	230,417	211,128	219,207
Lar/C	307,357	366,181	295,692
CAD/C	157,960	144,468	123,560
CPD/C	7,295	7,173	7,840
Constante	-183,934	-191,464	-152,714

Tabela 19 - Funções de classificação segundo a análise discriminante canônica para cada espécie de *Brachidontes* estudada. Classificações previstas (colunas), classificações observadas (linhas) e porcentagem de classificações corretas.

Espécie	% Classificação correta	<i>B. exustus</i> $p = 0,50000$	<i>B. puniceus</i> $p = 0,30488$	<i>B. darwinianus</i> $p = 0,19512$
<i>B. exustus</i>	89,43089	110	4	9
<i>B. puniceus</i>	85,33334	7	64	4
<i>B. darwinianus</i>	87,50000	4	2	42
Total	87,80488	121	70	55

Tabela 20 - Características diagnósticas das conchas nas espécies de *Brachidontes* estudadas.

Características	<i>B. puniceus</i>	<i>B. exustus</i>	<i>B. darwinianus</i>
Umbo	subterminal	terminal	subterminal
Ângulo dorsal	próxima da metade do comprimento	deslocado para a região anterior	deslocado para a região posterior
Margem ventral	concauidade ausente	leve concauidade	concauidade acentuada
Estado do periostraco	conservado	conservado	desgastado
Espessura das estrias	finas	grossas	finas

5 DISCUSSÃO

5.1 *Brachidontes exustus*, UM COMPLEXO DE ESPÉCIES EM RECONHECIMENTO

Brachidontes exustus foi caracterizado por Rios (1994) como uma espécie de manguezal e com ampla distribuição, estendendo-se pelo Atlântico Ocidental, desde a Carolina do Norte até a Argentina; e seus registros foram baseados somente na semelhança fenotípica. O mesmo autor, ao reunir informações sobre outras espécies de *Brachidontes* (*B. domingensis*, *B. lavalleanus*, *B. darwinianus*, *B. rosaseus* e *Mytilus muelleri*) e considerá-las como sinônimas de *B. exustus*, levantou dúvidas quanto à taxonomia dessa espécie (TROVANT *et al.*, 2013; 2016). Lee e Ó Foighil (2004, 2005) por análises moleculares, utilizando o gene do COI como marcador genético, confirmaram um complexo de quatro espécies depositadas sobre o táxon *Brachidontes exustus*, distribuídas na costa Atlântica da Flórida, no Golfo do México e no Mar do Caribe. Trovant *et al.* (2016), utilizando marcadores mitocondriais (COI) e nucleares (28S e 18S) em suas análises moleculares, não registraram *Brachidontes exustus* ao longo da costa atlântica da América do Sul e concluíram que nessa faixa geográfica existem quatro espécies de mexilhões do gênero *Brachidontes*: *B. purpuratus* (sinônimo de *Perumytilus purpuratus*), *B. rodriguezii*, *B. darwinianus* e *B. solisianus* (atualmente *Mytilaster solisinaus*). No entanto, podemos ampliar a distribuição de *B. exustus* além do descrito por Lee e Ó Foighil (2004, 2005) e Trovant *et al.* (2016), considerando os resultados do presente estudo, que mostra por identificação molecular que a espécie *B. exustus* está presente também em Salvador, na costa Nordeste do Brasil, permitindo ampliar a distribuição geográfica dessa espécie até a costa atlântica da América do Sul. Os mexilhões de Salvador mostraram o mesmo alelo mais comum que a população de Cartagena, com distâncias nucleotídicas entre elas de 0,004, próprias de uma mesma espécie (Hebert *et al.*, 2003). Este fato é sustentado pela alta similaridade destas populações com *B. exustus*, variedade aqui denominada 3, que corresponde à localidade de Miami, EUA, a qual mostra uma distância de 0,004 com Cartagena e de 0,006 com Salvador. A proximidade destas populações pode ocorrer por meios que permitem manter o intercâmbio genético e pela manutenção de ambiente similar ao original (ex. regiões de manguezal).

5.2 Dispersão em longa distância das espécies de *Brachidontes*

Há evidências de dispersão em longa distância ligando diferentes populações de mesma espécie nos oceanos (BOWEN *et al.*, 2006; BRIGGS e BOWEN, 2012). Os mexilhões se reproduzem liberando numerosas larvas de dispersão planctônica capazes de se deslocar passivamente por longas distâncias, devido ao tempo de permanência no plâncton e podem, portanto, ser distribuídas em grandes áreas geográficas (GOTO *et al.*, 2011). Assim, populações geograficamente bem separadas podem ser conectadas geneticamente, devido ao fluxo gênico mediado por correntes oceânicas (MORTON, 2012). Outro meio de dispersão que tem-se mostrado altamente efetivo corresponde ao transporte destes mexilhões aderidos a cascos de barcos e em águas de lastro (SIERRA-MARQUEZ *et al.*, 2018) de navios comerciais e transatlânticos, os quais podem manter o fluxo gênico de mexilhões por grandes distâncias. As localidades de Miami, Cartagena e Salvador são separadas por distâncias e barreiras geográficas significativas, porém representam regiões portuárias de intensa movimentação de navios que podem mediar o transporte de genes de uma localidade a outra.

A pluma do Rio Amazonas, que lança um grande volume de água doce no Atlântico (CURTIN, 2003), o que altera a salinidade e causa descarga de sedimentos até 500 km da costa (ROCHA 2003) atua como uma grande barreira à dispersão natural entre Salvador e as populações do norte. No entanto, essa barreira geográfica parece não ter bloqueado o fluxo gênico entre essas diferentes populações. Tem-se constatado que a pluma do Rio Amazonas atua como uma barreira seletiva por afetar as espécies em diferentes graus (TROVANT *et al.*, 2016). As larvas de *B. exustus* são capazes de permanecer a deriva por até 40 dias no plâncton (BARBER *et al.*, 2005), período suficiente para o assentamento pós-larval e o estabelecimento da espécie em substratos duros de locais distantes. Por outro lado, é levantada a hipótese de que *B. exustus* teria ampla distribuição por todo o Caribe Colombiano e pela costa do Brasil antes da formação do Rio Amazonas (há aprox. 10 Ma) (TROVANT *et al.*, 2014). Com o início do fluxo do Rio Amazonas, começou a ser formada uma barreira que separou geograficamente as populações brasileiras do Caribe, bloqueando o fluxo gênico entre essas populações (TROVANT *et al.*, 2016). Assim, por essa hipótese de isolamento, essas populações estariam caminhando para um processo de especiação, o que não é suportado

pelos resultados do presente estudo, como mostra a baixa distância nucleotídica entre estas populações.

5.3 IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES NO ESCLARECIMENTO DE PROBLEMAS TAXONÔMICOS

Com o objetivo de facilitar a resolução de problemas taxonômicos e de identificação de espécies e suas populações, foi acordada a utilização do gene mitocondrial que codifica a citocromo-*c*-oxidase, subunidade I (COI) para geração de códigos de barra (*DNA barcoding*) (HEBERT *et al.*, 2003; BENNETT, 2009). Esta região tem sido amplamente utilizada na resolução de problemas taxonômicos no grupo de espécies de *Brachidontes* (LEE E Ó FOIGHIL, 2004, 2005; TERRANOVA *et al.*, 2006, 2007; BENNETT, 2009; BENNETT *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2011; TROVANT *et al.*, 2013; 2014; BENNETT *et al.*, 2014; TROVANT *et al.*, 2016; GARCIA-SOUTO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017, 2018). O gene do 16S rRNA tem sido sub-utilizado em trabalhos taxonômicos por causa da ampla divulgação do COI como código de barras, no entanto, este pode ser superior ao COI para identificação de espécies em certos táxons, por apresentar sequências altamente conservadas (XIA *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2014). A escassez de sequências do 16S no GenBank dificulta a identificação de espécies de amostras novas ou de populações nunca estudadas anteriormente. O gene COI apresenta uma variação muito elevada e muito maior em relação a do gene 16S, o que muitas vezes dificulta a identificação pelo COI a partir de *primers* universais deste gene, que nem sempre são capazes de amplificar variantes ainda não conhecidas, devido à variação existente na região do DNA usada para amplificação. Isto, foi o caso da população de Fernando de Noronha que precisou o desenho de novos *primers* para sua identificação. A disponibilidade de sequências mais conservadas como as do gene 16S poderia facilitar a identificação específica correta. Outro importante problema no uso de código de barras do COI, como forma de discriminação taxonômica em nível de espécie, é a possibilidade de erros de identificação de espécimes e o conseqüente acúmulo de sequências incorretas em bancos de dados de DNA (GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2017).

A utilidade do 16S é demonstrada na consistência dos resultados obtidos com ambos marcadores moleculares quanto às distâncias nucleotídicas obtidas entre as populações estudadas. Entre os mexilhões de Cartagena e Salvador obteve-se distâncias semelhantes tanto com o 16S ($0,002 \pm 0,001$) quanto com o COI ($0,004 \pm 0,002$). No caso de diferenças entre espécies, as distâncias observadas com o 16S foram menores que com o COI, devido ao 16S ser mais conservado (ver Tabelas 8 e 11).

O presente estudo caracterizou e disponibilizou sequências do 16S das seguintes populações: 1. Baía de Cartagena, Colômbia e Salvador, Brasil, correspondente a *B. exustus*, var. Miami, EUA; 2. do canal da praia do Pontal de Arraial do Cabo, Brasil, correspondente a *B. darwinianus*; 3. de praia dos Anjos, de Arraial do Cabo, Brasil, correspondente a *B. solisianus* (atualmente *Mytilaster solisianus*); 4. de Fernando de Noronha, Brasil, correspondente a um clado que inclui *B. puniceus* de Cabo Verde e *B. exustus*, variedade Bahamas. Dessa forma, estas sequências poderão ser úteis à comunidade científica em futuros estudos moleculares de *Brachidontes* baseados no 16S.

Os resultados genéticos obtidos pelo gene COI permitiram mostrar que os mexilhões presentes no costão da desembocadura do canal em Arraial do Cabo correspondem à espécie *B. darwinianus*, como visto pelo agrupamento de seus haplótipos com os exemplares de *B. darwinianus* de Punta del Este, Uruguai, tanto na rede haplotípica quanto na árvore filogenética, mostrando-se distantes apenas em $0,006 \pm 0,003$, valores considerados típicos de populações intra-específicas (HEBERT *et al.*, 2003). A espécie *B. darwinianus*, considerada por Rios (1994) como sinonímia de *B. exustus*, já tinha sido considerada uma espécie independente de *B. exustus* por Avelar e Narchi (1984b) e Trovant *et al.* (2013, 2016), que consideraram inclusive que esta espécie estuarina não faz parte do complexo *B. exustus*, fato também evidenciado no presente trabalho pelas grandes distâncias nucleotídicas observadas ($> 0,220$; $> 22\%$) com as outras espécies do complexo *B. exustus*. O novo registro de *B. darwinianus* nos costões rochosos da Praia do Pontal em Arraial do Cabo, obtido na presente dissertação, não altera a atual distribuição geográfica confirmada para a espécie, que se estende desde Ilhéus na Bahia, Brasil até Punta del Este, Uruguai (TROVANT *et al.*, 2013, 2016).

5.4 UMA NOVA ESPÉCIE PARA O ARQUIPÉLAGO DE FERNANDO DE NORONHA ?

Estudos realizados em Fernando de Noronha, baseados na morfologia, tem indicado a ocorrência de *B. exustus* neste arquipélago (LOPES e ALVARENGA, 1955; RIOS e BARCELLOS, 1979). No entanto, esta informação não é confirmada com o presente estudo, dado que os mexilhões coletados em Fernando de Noronha não compartilham haplótipos com as populações de Cartagena e Salvador, que efetivamente correspondem a *B. exustus*, mostrando grandes distâncias nucleotídicas com este táxon, tanto para o marcador molecular *16S* ($0,166 \pm 0,020$) quanto para o *COI* ($0,208 \pm 0,023$). A população de Fernando de Noronha faz parte de um grupo independente, caracterizado por um clado que tem como base *B. puniceus* do arquipélago de Cabo Verde e uma variedade distante do complexo *B. exustus* registrada por Lee e Ó Foighil (2004) na ilha das Bahamas, no Caribe. Este clado apresenta uma distância genética média de $0,050 \pm 0,010$ entre seus integrantes, mostrando sua proximidade genética. Este grupo apresenta distâncias nucleotídicas médias com as outras espécies (com *B. rodriguezii*: $0,267 \pm 0,030$, *B. modiolus*: $0,199 \pm 0,023$ e *B. darwinianus*: $0,266 \pm 0,025$) e variantes de *B. exustus* (Var1, leste da Flórida, EUA: $0,288 \pm 0,030$; Var2, Layton, EUA: $0,209 \pm 0,024$; e Var3, Miami, EUA: $0,214 \pm 0,024$) num nível característico de espécies diferentes (HEBERT *et al.*, 2003 ; TROVANT *et al.*, 2016).

A conectividade das populações de organismos marinhos é complexa (BERNARDI *et al.*, 2001), podendo em longas distâncias, favorecer eventos de colonização de ilhas com subsequente isolamento geográfico (CUNHA *et al.*, 2011; MORTON, 2012). *Brachidontes puniceus*, é uma espécie com distribuição na costa Ocidental Africana, com registros em Angola, Gabão, Gana, Senegal, Mauritânia e em todas as ilhas do arquipélago de Cabo Verde (LOPES, 2009). Ambientes insulares tropicais, como os arquipélagos de Cabo Verde e Fernando de Noronha, são considerados verdadeiros *hotspots* devido a sua alta diversidade (SANTANA *et al.*, 2018). Apresentam um elevado número de endemismo resultante do seu isolamento (LOPES, 2009) e a colonização desses habitats remotos depende, de uma forma geral, de eventos acidentais de colonização; e sua biota mostra frequentemente uma amostra parcial da biodiversidade continental (LOPES, 2009). O tempo de sobrevivência no plâncton das larvas de *Brachidontes* é em torno de 40

dias (CAMPOS e RAMORINO 1980; FIELDS e MOORE 1983; BARBER *et al.*, 2005), tempo suficiente para permitir a colonização e recolonização de arquipélagos mais distantes e explicar a distribuição de *B. puniceus*, não só no arquipélago de Cabo Verde, mas também sua distribuição tropical mais ampla na costa oeste da África (MORTON, 2012).

As águas superficiais das ilhas de Cabo Verde e Fernando de Noronha estão sob a influência da Corrente Norte Equatorial e da extensão sul desta corrente, que conflui com a Corrente Norte do Brasil perto da costa brasileira (LOPES, 2009; CUNHA *et al.*, 2011; MORTON, 2012. TCHAMABI *et al.*, 2017; MATHEUS *et al.*, 2019), podendo determinar uma certa conectividade entre estas ilhas (LOPES, 2009; CUNHA *et al.*, 2011; MORTON, 2012; TCHAMABI *et al.*, 2017; MATHEUS *et al.*, 2019). Correntes podem potencializar a capacidade de dispersão larval (CAMPOS e RAMORINO 1980; FIELDS e MOORE 1983; BARBER *et al.*, 2005; MORTON, 2012), fato que poderia ter facilitado a colonização de outras ilhas tropicais do Atlântico. A semelhança das condições ambientais com o local de origem (LEE e Ó FOIGHIL, 2005) pode favorecer também a permanência de novos colonizadores.

O clado identificado para a população de Fernando de Noronha, no presente estudo, é correspondente ao clado das Bahamas identificado por Lee e Ó Foighil (2005), que inclui exemplares da Ilha das Bermudas e, na sua base, o *B. puniceus* de Cabo Verde. Este clado foi confirmado por estes autores tanto com o marcador *COI* quanto por genes nucleares e constitui uma das cinco espécies crípticas que representam o complexo de espécies de *B. exustus*. As populações, que correspondem à espécie constituída pelo clado das Bahamas, se caracterizam por habitar ambientes oceânicos de alta salinidade e baixas condições de produtividade próprias de ilhas afastadas da costa. Este clado teria se separado há 3,4 – 4,6 ma por especiação alopátrica do clado das Antilhas, que inclui as ilhas de Cuba, Jamaica (localidade tipo de *B. exustus*), Porto Rico, Barbados e Trindade (Lee e Ó Foighil, 2005). De acordo com estes autores, esta espécie teria se expandido desde o Caribe através do Atlântico, chegando a Cabo Verde. No entanto, sua ampla distribuição na costa da África, desde o Mediterrâneo até Ghana, levantam dúvidas acerca da direção da migração desta espécie. Na última era glacial teria diminuído o nível do mar, facilitando a dispersão entre locais distantes. O arquipélago de Cabo Verde, tem sua ilha mais antiga (Maio) datada do Mesozóico, sendo a maioria do Cretácio. Na ilha de Quail são observados depósitos fósseis de *B. puniceus* em

estratos geológicos que refletem variação prévia do nível do mar. É possível que *B. puniceus* tenha colonizado o arquipélago de Fernando de Noronha desde a costa Africana e logo as ilhas das Bahamas e Bermudas num modelo tipo *stepping stone*? Se esta hipótese for verdadeira, seria esperado encontrar esta espécie também nas outras ilhas oceânicas, como São Pedro e São Paulo e Atol das Rochas. As baixas distâncias encontradas entre os integrantes deste clado e o fato do *B. puniceus* se encontrar na base do mesmo, indica que esta espécie críptica deva receber o nome de *Brachidontes puniceus*, podendo especificar subespécies para as localidades mais distantes, que tenderão a aumentar sua divergência pelo nível de isolamento. Assim, se sugere o nome de *B. puniceus noronhensis* para a população do arquipélago de Fernando de Noronha.

5.5 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Brachidontes*

Análises multivariadas têm sido úteis para auxiliar na discriminação de espécies em diversos invertebrados (MARTINS, 2008; ROCHA e PAIVA, 2013; D'ELIA, 2015). No entanto, nem sempre a morfometria multivariada tem sido útil para encontrar diferenças suficientes na morfologia de *Brachidontes*, como no caso das espécies do Atlântico Sudoeste (AGUIRRE et al., 2006).

No presente estudo, a análise discriminante baseada nos caracteres externos da concha permitiu a discriminação parcial dos mexilhões *B. exustus* das localidades de Cartagena-Salvador, *B. puniceus* de Fernando de Noronha e de *B. darwinianus* de Arraial do Cabo. Quando agrupadas nestas espécies, obteve-se mais de 85% de classificação correta, mostrando que existem diferenças nos parâmetros da concha entre estas espécies, porém não suficientes para confiar completamente na identificação destes exemplares. A grande similaridade morfológica e a sobreposição parcial de alguns exemplares têm levado a que as espécies tenham sido nomeadas sob o nome de *B. exustus* e atualmente reconhecidas como espécies crípticas (LEE e Ó FOIGHIL, 2004, 2005). Parte da sobreposição encontrada na distribuição dos parâmetros da concha no plano discriminante é consequência da grande variabilidade morfológica dos mitilídeos que ocorre frente à variação das condições ambientais (Ex. exposição às ondas, declive do costão,

dinâmica da água, incidência solar, entre outros) dos locais onde se assentaram, o que é reconhecido como plasticidade fenotípica (NALESSO et al., 1988 ; AGUIRRE et al., 2006). Esta plasticidade fenotípica pode levar a sobre-estimar o número de espécies ou a relaxar excessivamente a distinção de espécies, como ocorrido com o complexo de espécies de *B. exustus*. As diferenças encontradas na posição do ângulo dorsal, a magnitude da concavidade ventral, o padrão de espessura e direção das estrias são caracteres que podem auxiliar efetivamente na distinção de espécies a um pesquisador ou observador experiente.

Com o objetivo de auxiliar no reconhecimento de espécies quando análises moleculares não estão disponíveis no momento ou quando há necessidade de uma identificação preliminar dos indivíduos, Lee e Ó Foighil (2005) sugerem avaliar o habitat e os parâmetros ambientais onde o mitilídeo é encontrado. Por exemplo, os exemplares aqui estudados de *B. exustus* das localidades de Cartagena e Salvador são característicos de ambientes de manguezal, ricos em matéria orgânica e com salinidade inferior à marinha. Os mexilhões da espécie *B. darwinianus*, neste estudo representados pelos mexilhões de Arraial do Cabo (canal), habitam paredões ou áreas de rochas na zona entre-marés próximas de desembocaduras de rios ou canais de água doce, assim como estuários ou desembocaduras menores (AVELAR e NARCHI, 1984b; TANAKA e MAGALHÃES, 1999; TANAKA, 2005). Em Arraial do Cabo, no canal da Praia do Pontal, esta espécie é encontrada coexistindo com *Mytilaster solisianus*, espécie dominante nos costões rochosos marinhos (COUTINHO e ZALMON, 2009). Isto levou a identificar erroneamente *B. darwinianus* por *B. exustus* nessa área por QUINTANILHA (2017), baseado apenas em caracteres morfológicos. Posteriormente, verificou-se que nesta área *B. darwinianus* se encontra na zona entre-marés inferior, enquanto *B. solisianus* vive na zona entre-marés superior (TANAKA, 2005). Quanto ao clado Bahamas, aqui reconhecido como *B. puniceus*, é característico de ilhas afastadas da costa, águas marinhas e oceânicas de baixa produtividade.

6 CONCLUSÃO

Com base em marcadores genéticos mitocondriais e morfometria multivariada em exemplares registrados previamente como *Brachidontes exustus*, podemos concluir o seguinte:

- 1) Análises genéticas proporcionam identificação específica mais precisa quando comparada com a morfometria, especialmente para aquelas de difícil identificação morfológica.
- 2) As populações de mexilhões de Cartagena e Salvador estudadas correspondem efetivamente à *B. exustus*, e a confirmação dessa espécie em Salvador amplia sua distribuição geográfica até a costa nordeste do Brasil, na América do Sul.
- 3) As populações de mexilhões geograficamente isoladas de Fernando de Noronha pertencem ao um clado independente previamente identificado por Lee & Ó Foighil (2005) das Bahamas, Bermudas e Cabo Verde. Este clado é confirmado como uma espécie distinta de *B. exustus*, tendo a nomeação de *B. puniceus* como base do clado, que pela expectativa do incremento de sua divergência, se sugere a nomeação da subespécie *Brachidontes puniceus noronhensis* para a população de Fernando de Noronha.
- 4) A população do costão rochoso da Praia do Pontal em Arraial do Cabo, na região do canal, confirma-se como *B. darwinianus*, enquanto a população do costão rochoso da Praia dos Anjos pertence a espécie *Mytilaster solisianus*.
- 5) A análise multivariada dos parâmetros da concha permite, parcialmente (aprox. 85%), a identificação de exemplares das espécies estudadas, auxiliando apenas para identificação preliminar, que depende da confirmação com marcador molecular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, M. L.; PASTORINO, G.; ORENSANZ, J. M. Phenotypic differentiation of ecologically significant *Brachidontes* species co-occurring in intertidal mussel beds from the Southwestern Atlantic. **Malacologia**, v. 56, n. 1 & amp; 2, p. 59–67, dez. 2013.

AGUIRRE, M. L.; PEREZ, S. I.; SIRCH, Y. N. Morphological variability of *Brachidontes* Swainson (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 239, n. 1–2, p. 100–125, set. 2006.

ARCHER, R. M.; MORETTO, E. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) from a natural coastal bed in the municipality of Palhoça, Santa Catarina, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 3, p. 379–386, 1994.

AVELAR, W. E. P.; NARCHI, W. Functional anatomy of *Brachidontes solisianus* (orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). **Boletim de Zoologia**, v. 8, n. 8, p. 215–237, 1984a.

AVELAR, W. E. P.; NARCHI, W. Functional anatomy of *Brachidontes darwinianus* (orbigny, 1842) (Bivalvia: Mytilidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 35, n. 27, p. 331–359, 1984b.

BALBAS, V. A.; TINEO, R. B.; ARCAS, A. P. Estructura comunitaria de bivalvos y gasterópodos en raíces del mangle rojo *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en isla Larga, bahía de Mochima, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 62, n. 2, p. 551–565, 2014.

BARBER, B. J.; FAJANS, J. S.; BAKER, S. M.; BAKER, P. Gametogenesis in the non-native green mussel, *Perna viridis*, and the native scorched mussel, *Brachidontes exustus*, in Tampa Bay, Florida. **Journal of Shellfish Research**, v. 24, n. 4, p. 1087–1095, 2005.

BARROS, F.; COSTA, P. C.; CRUZ, I.; MARIANO, D. L. S.; MIRANDA, R. J. Habitats bentônicos na Baía de Todos os Santos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 5, p. 551–565, 2012.

BENNETT, K. F. **Genetic and morphological discrimination of species within the nominal *Brachidontes exustus* (Mollusca: Bivalvia) cryptic species complex from the Florida keys**. Dissertation (Master of Science in Ecology and Evolution) Program in Ecology and Evolution - State University of New Jersey, New Jersey, 2009.

BENNETT, K. F.; BAILEY, A. W.; BRAMBERT, D. J.; FERHATI, E. W.; KARSON, C. A.; NAFASAT, U.; WADLEIGH, J. K.; WRIGHT, A. H. The F type mitochondrial genome of the scorched mussel: *Brachidontes exustus*, (Mytiloidea, Mytilidae). **Mitochondrial DNA**, v. 27, n. 2, p. 1501–1502, 3 mar. 2014.

BENNETT, K. F.; REED, A. J.; LUTZ, R. A. DNA barcoding reveals *Brachidontes* (Bivalvia: Mytilidae) from two ecologically distinct intertidal habitats on Long Key, Florida Keys, are cryptic species, not ecotypes. **The Nautilus**, v. 125, n. 2, p. 63–71, 2011.

BERNARDI, G.; HOLBROOK, S. J.; SCHMITT, R. J. Gene flow at three spatial scales in a coral reef fish, the three-spot dascyllus, *Dascyllus trimaculatus*. **Marine Biology**, v. 138, n. 3, p. 457–465, 2001.

BERTNESS, M. D. CRAIN, C. M.; SILLIMAN, B. R.; BAZTERRICA, M. C.; REYNA, M. V.; HILDAGO, F.; FARINA, J. K. The community structure of Western Atlantic Patagonian rocky shores. **Ecological Monographs**, v. 76, n. 3, p. 439–460, 2006.

BOWEN, B. W.; MUSS, A.; ROCHA, L. A.; GRANT, W. S. Shallow mtDNA coalescence in Atlantic Pygmy Angelfishes (Genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 1, p. 1–12, 2006.

BREWSTER-WINGARD, G. L.; STONE, J. R.; HOLMES, C. W. Molluscan faunal distribution in Florida Bay, past and present: An integration of down-core and modern

data. **Bulletins of American Paleontology**, v. 361, n. November 2016, p. 199–231, 2001.

BRIGGS, J. C.; BOWEN, B. W. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 1, p. 12–30, jan. 2012.

CALAZANS C, S. H.; WALTERS, L. J.; FERNANDES, F. C.; FERREIRA, C. E. L.; HOFFMAN, E. A. Genetic structure provides insights into the geographic origins and temporal change in the invasive charru mussel (Sururu) in the southeastern United States. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p.1-19, 2017.

CAMPOS, B. M.; RAMORINO, L. Larval and early benthic stages of *Brachidontes granulata* (Bivalvia: Mytilidae). **The veliger**, v. 22, n. 3, p. 277–281, 1980.

CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD analysis. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 3, p. 489-496, 2000.

CIRANO, M.; LESSA, G. C. Oceanographic characteristics of Baía de Todos os Santos, Brazil. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 25, n. 4, p. 363–387, 2007.

COELHO-SOUZA, S. A.; LÓPEZ, M. S.; GUIMARÃES, J. R. V.; COUTINHO, R.; CANDELLA, R. N. Biophysical interactions in the Cabo Frio *upwelling* system, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 3, p. 353–365, 2012.

CORREAL, G. O. **Impacto de um efluente doméstico sobre a comunidade de peixes recifais e macrobentos da Praia do Pontal, Arraial do Cabo, RJ**. Niterói, 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

COUTINHO, R.; ZALMON, I. R. Os Bentos de Costões Rochosos. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência,

2009. cap. 11.

CUNHA, R. L.; LOPES, E. P.; REIS, D. M.; CASTILHO, R. Genetic structure of *Brachidontes puniceus* populations in Cape Verde Archipelago shows signature of expansion during the last glacial maximum. **Journal of Molluscan Studies**, v. 77, p. 175-181, 2011.

CURTIN, T. B. Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge II. Water masses. **Continental Shelf Research**, v. 6, n. 1–2, p. 53–71, 2003.

CURTIUS, A. J.; SEIBERT, E. L.; FIEDLER, H. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: Resultados parciais de um estudo de caso realizado na ilha de Santa Catarina, Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 44–52, 2003.

D'ELIA, D. S. **Distribuição Espaço-Temporal e Estrutura Trófica de Polychaeta em Substrato Inconsolidado, Baía de Sepetiba, RJ**. Macaé, 2015. 65 f. Dissertação (Ciências Ambientais e Conservação) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira*, Macaé, 2015.

DINESEN, G. E.; MORTON, B. Review of the functional morphology, biology and perturbation impacts on the boreal, habitat-forming horse mussel *Modiolus modiolus* (Bivalvia: Mytilidae: Modiolinae). **Marine Biology Research**, v. 10, n. 9, p. 845-870, 2014.

DISTEL, D. L. Phylogenetic Relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA Data Suggest Convergence in Mytilid Body Plans. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, n. 1, p. 25–33, 2000.

DUARTE, M. R.; OTEGUI, A. C. P.; FERNANDES, F. C.; SILVA, E. P. High Levels of Genetic and Morphological Variability in Invasive *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) Populations in South America . **Malacologia**, v. 62, n. 1, p. 171–186, 2018.

ESTON, V. R. MIGOTTO, A. E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; RODRIGUES, S. A. FREITAS, J. C. Vertical Distribution of Benthic Marine Organisms on Rocky Coasts of the Fernando de Noronha Archipelago (BRAZIL). **Boletim do Instituto Oceanográfico**. São Paulo, v. 34, p. 37–53, 1986.

FERNANDEZ, A.; SINGH, A.; JAFFÉ, R. A literature review on trace metals and organic compounds of anthropogenic origin in the Wider Caribbean Region. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 11, p. 1681–1691, 2007.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; JUNIOR, C. A. C.; JÚNIOR, A. N. M.; MANO, S. B.; CLEMENTE, S. C. S. Trace metal contamination in mussel *Perna perna* from brazilian coast. **Ciência Rural Online**, p. 1–9, 2013.

FIELDS, A.; MOORE, E. The larval biology of *Brachidontes modiolus* (Linne', 1767) Bivalvia: Mytilidae). **The veliger**, v. 26, n. 1, p. 52–61, 1983.

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. **Molecular Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294–299, 1 out. 1994.

GARCÍA-SOUTO, D.; SUMNER-HEMPEL, A.; FERVENZA, S.; PÉREZ-GARCÍA, C.; TORREIRO, A.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; EIRÍN-LÓPEZ, J. M.; MORÁN, P.; PASANTES, J. J. et al. Detection of invasive and cryptic species in marine mussels (Bivalvia, Mytilidae): A chromosomal perspective. **Journal for Nature Conservation**, v. 39, p. 58–67, 2017.

GOTO, T. V.; TAMATE, H. B.; HANZAWA, N. Phylogenetic Characterization of Three Morphs of Mussels (Bivalvia, Mytilidae) Inhabiting Isolated Marine Environments in Palau Islands. **Zoological Science**, v. 28, n. 8, p. 568–579, ago. 2011.

HATJE, V.; ANDRADE, J. B. DE. **Baía de todos os santos: aspectos oceanográficos**. Salvador: EDUFBA, 2009.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society:**

Biological Sciences, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HOESE, H. D. BIOTIC CHANGES IN A BAY ASSOCIATED WITH THE END OF A DROUGHT¹. **Limnology and Oceanography**, v. 5, n. 3, p. 326–336, abr. 1960.

HOELZEL, A. R. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: Implications for conservation policy. **The Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, 1998.

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 ConchBooks, Hackenheim, 2010.

LEE, T.; Ó FOIGHIL, D. Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 11, p. 3527–3542, 15 out. 2004.

LEE, T.; Ó FOIGHIL, D. Placing the floridian marine genetic disjunction into a regional evolutionary context using the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. **Evolution**, v. 59, n. 10, p. 2139, 2005.

LEVY, A.; MATHIEU, R.; POINGNAT, A.; ROSSET-MOULINIER.; AMBROISE, D. Benthic foraminifera from the Fernando de Noronha Archipelago (northern Brazil). **Marine Micropaleontology**, v. 26, n. 1–4, p. 89–97, dez. 1995.

LIU, J.; LIU, H.; ZHANG, H. Phylogeny and evolutionary radiation of the marine mussels (Bivalvia: Mytilidae) based on mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 126, n. April, p. 233–240, set. 2018.

LIU, X.; KANG, L.; XU, M.; WU, C.; JIANG, L. Phylogenetic estimation of Mytilidae in the East China Sea inferred from mitochondrial genes and nuclear DNA sequence variation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 71, p. 219–224, 2017.

LLANES-BAEZA, C. A.; GONZÁLEZ, N. E. EVALUACIÓN DE LOS MEJILLONES *Mytilopsis sallei* (Reclúz) Y *Brachidontes exustus* (Linné) COMO BIOINDICADORES DE MATERIA ORGÁNICA EN LA BAHÍA DE CHETUMAL, MÉXICO. **October**, v. 18, p. 29–41, 2002.

LOPES, H. S.; ALVARENGA, M. Contribuição ao conhecimento dos moluscos da Ilha Fernando de Noronha - Brasil. **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**. v. 6, p. 157-190, 1955.

LOPES, E. P. **Filogeografia de *Brachidontes puniceus* (GMELIN, 1791) no Arquipélago de Cabo Verde**. Algarve, Portugal, 2009. 42 f. Dissertação (Biologia Marinha) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Universidade do Algarve, Portugal, 2009.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; JIA, G.; DENG, J.; WANG, C.; WANG, Q.; MEI, L.; LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S.; JUNIOR, A. C. G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 359–363, 2013.

MÁRQUEZ, B.; JIMÉNEZ, M. Moluscos asociados a las raíces submergidas del mangle rojo *Rhizophora mangle*, em el Golfo de Santa Fe, Estado Sucre, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, n. 3/4, p. 1101-10012, 2002.

MARTINS, E. S. **Desenvolvimento embrionário e larval de *Encope emarginata* (Leske, 1778) (Echinodermata: Echinoidea), e variações morfológicas interpopulacionais ao longo da costa brasileira entre 13° S e 30° S**. Rio de Janeiro, 2008.117 f. Tese (Ciências Biológicas - Zoologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MATHEUS, Z.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PEREIRA-FILHO, G. H.; MORAES, F. C.; MOURA, R. L.; BRASILEIRO, P. S.; AMADO-FILHO, G. M. Benthic reef assemblages of the Fernando de Noronha Archipelago, tropical South-west Atlantic: Effects of depth, wave exposure and cross-shelf positioning. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2019.

MERLANO, J. M. D.; HEGEDUS, M. P. **Moluscos del Caribe Colombiano: um catálogo ilustrado**. Fundacion Natura, Ivemar, 1994.

METZGER, M.J.; Paynter, A. N.; SIDDALL, M. S.; GOFF, S. P. Horizontal transfer of retrotransposons between bivalves and other aquatic species of multiple phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, p. 227-235, 2018.

MEZA, M.; PUYANAB, M.; CALIXTO, D.; VELOSA, L.; ACOSTA, E.; PANQUEVA, J A.; Morales, A. Antifouling effectiveness of coatings in biofouling control on ships that operate in the bay of cartagena. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.62, p. 6, 2008.

MIRANDA, L. B.; SILVEIRA, I, C. A.; FERNANDES, F. P. A.; PONSONI, L.; COSTA, T. P. A descriptive analysis of the seasonal variation of physical oceanographic characteristics in the northern region of the todos os santos bay (Bahia, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 1, p. 9–26, 2011.

MOLINARI, R. L. Observations of near-surface currents and temperature in the central and western tropical Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 88, p. 4433-4438, 1983.

MONTEIRO-RIBAS, W.; ROCHA-MIRANDA, F.; ROMANO, R. C.; QUINTANILHA, J. Larval development of *Brachidontes solisianus* (Bivalvia, Mytilidae), with notes on differences between its hinge system and that of the mollusk *Perna perna*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1A, p. 109–116, 2006.

MORTON, B. A Significant and Unappreciated Intertidal Mytiloidean Genus: The Biology and Functional Morphology of *Brachidontes puniceus* (Bivalvia: Mytilidae)

from the Cape Verde Islands. **African Journal of Marine Science**, v. 34, n. 1, p. 71–80, 2012.

NAKHLÉ, K. F.; COSSA, D.; KHALAF, G.; BELIAEF, B. *Brachidontes variabilis* and *Patella* sp. as quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. **Environmental Pollution**, v. 142, n. July, p. 73–82, 2006.

NALESSO, R. C. **Influência da salinidade e exposição ao ar na distribuição dos mexilhões *Brachidontes darwinianus* e *Brachidontes solisianus* em dois estuários do litoral do Estado de São Paulo**. Campinas, 1988. 152f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

NYGREN, A. Cryptic Polychaete Diversity: A review. **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 2, p. 172–183, 2014.

ORTEGA, S. Environmental stress, competition and dominance of *Crassostrea virginica* near Beaufort, North Carolina, USA. **Marine Biology**, v. 62, n. 1, p. 47–56, 1981.

PALUMBI, S. R.; MARTIN, A. P.; ROMANO, S.; MCMILAN, W. O.; STICE, L. and GRABOWSKI, G. The simple tool's guide to PCR. University of Hawaii, 1991.

PÉREZ-GARCÍA, C.; GUERRA-VARELA, J.; MORÁN, P.; PASANTES, J. J. Chromosomal mapping of rRNA genes, core histone genes and telomeric sequences in *Brachidontes puniceus* and *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia, Mytilidae). **BMC Genetics**, v. 11, 2010.

QUINTANILHA, D. B. **Estudo da população de *Brachidontes exustus* (linné, 1758) (Bivalvia, Mytilidae) em um costão rochoso na desembocadura de um canal na praia do pontal, em Arraial do Cabo - RJ**. Arraial do Cabo, 2017. 56 f. Monografia (Pós-Graduação *lato sensu* em Ciências Ambientais em Áreas Costeiras) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia *campus* Arraial do Cabo, Arraial do Cabo, 2017.

QUINTAS, P. Y.; ARIAS, A. H.; OLIVA, H. A.; DOMINI, C. E.; ALVAREZ, M. B.; GARRIDO, M.; MARCOVECCHIO, J. E. Organotin compounds in *Brachidontes rodriguezii* mussels from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, n. July, p. 518–527, 2017.

RAINBOW, P. S. Physiology, physicochemistry and metal uptake-A crustacean perspective. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1–3, p. 55–59, 1995.

RESTREPO, J. D.; ESCOBAR, R.; TOSIC, M. Fluvial fluxes from the Magdalena River into Cartagena Bay, Caribbean Colombia: Trends, future scenarios, and connections with upstream human impacts. **Geomorphology**, v. 302, p. 92–105, 2018.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2. ed. Rio Grande: Instituto Acqua, Museu Oceanográfico de Rio Grande, Universidade de Rio Grande, 1994. p. 482

RIOS E. C.; BARCELLOS, L. Nuevas ocurrencias de moluscos marinos para el archipiélago de Fernando de Noronha. **Comunicaciones de la Sociedad Molacológica de Uruguay**, v. 5, n. 37, p. 163-166, 1979.

ROCHA, L. A. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. **Journal of Biogeography**, v. 30, n. 8, p. 1161–1171, 2003.

ROCHA, M. B.; PAIVA, P. C. Análises morfométricas de quatro espécies de *Scolelepis* (Annelida: spionidae) no litoral do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 53, n. 5, p. 67–73, 10 set. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – a Laboratory manual. 2. ed. USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTANA, C. S.; SCHWAMBORN, R.; NEUMANN-LEITÃO, S.; MONTES, M. J. F.; LIRA, S. M. A. Spatio-temporal variation of planktonic decapods along the leeward coast of the Fernando de Noronha archipelago, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 66, n. 1, p. 1–14, mar. 2018.

SAVI, D. C. Erosão e acresção costeira na enseada dos anjos, Arraial do cabo, RJ. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 91–99, 2007.

SCARABINO, F.; ZAFFARONI, J. C.; CLAVIJO, C.; CARRANZA, A.; NIN, M. Bivalvos marinos y estuarinos de la costa uruguaya : taxonomía y conservación. n. 1978, 2006.

SEED, R. A note on the relationship between shell shape and life habits in *Geukensia demissa* and *Brachidontes exustus* (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Molluscan Studies**. n. 46p. 293-299, 1980.

SILLIMAN, B. R.; BERTNESS, M. D.; ALTIERI, A. H.; GRIFFIN, J. N.; BAZTERRICA, M. C.; HIDALGO, F. G.; CRAIN, C. M.; REYNA, M. V. Whole-community facilitation regulates biodiversity on patagonian rocky shores. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

SIERRA-MARQUEZ, L.; SIERRA-MARQUEZ, J.; DE LA ROSA, J.; OLIVERO-VERBEL, J. Imposex in *Stramonita haemastoma* from coastal sites of Cartagena, Colombia. **Brazilian Journal of Biology**. v. 78, n. 3, p. 548-555, 2018.

SILVA, M. A.; FERNANDES, E. F. S.T.; SANTANA, S. C.; MARVULO, M. F. V.; BARROS, M. R.; VILELA, S. M.O.; REIS, E. M. F.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. Isolation of *Salmonella* spp. in cattle egrets (*Bubulcus ibis*) from Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 559–563, 2018.

SILVA, Ú. R. D.; COUTINHO, R. Comparação do padrão de zonação dos organismos bentônicos de um costão batido e outro protegido localizados nas regiões da Ilha Grande e Arraial do Cabo. **Revista Novo Enfoque**, v. 5, n. 22, p. 1–13, 2007.

TANAKA, M.; MAGALHÃES, C. Edge effects and succession dynamics in *Brachidontes* mussel beds. **Marine Ecology Progress Series**, v. 237, n. Sousa 1985, p. 151–158, 2002.

TANAKA, M. O. Recolonization of experimental gaps by the mussels *Brachidontes darwinianus* and *Brachidontes solisianus* in a subtropical rocky shore. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 115–119, 2005.

TANAKA, M. O.; DE MAGALHÃES, C. A. Morphometric species recognition in *Brachidontes darwinianus* and *Brachidontes solisianus* (Bivalvia: Mytilidae). **Veliger**, v. 42, n. 3, p. 267–274, 1999.

TCHAMABI, C. C.; ARAUJO, M.; SILVA, M.; BOURLÈS, B. A study of the Brazilian Fernando de Noronha island and Rocas atoll wakes in the tropical Atlantic. **Ocean Modelling**, v. 111, n. 2017, p. 9–18, mar. 2017.

TEIXEIRA, R. R.; SIMÕES, R. C.; BRANDÃO, J. M.; MATOS, W. N.; FONTES, V. M. S.; FERNANDEZ, L.G. Análise da capacidade de bioacumulação de metais pesados por quatro espécies de moluscos bivalves (*Anomalocardia Brasiliiana*, *Crassostrea sp.*) da praia de cabuçu (Saubára, Bahia). **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, p. 1–3, 2007.

TERRANOVA, M. S.; BRUTO, S.; ARCULEO, M.; MITTON, J. B. Population structure of *Brachidontes pharaonis* (P. Fisher, 1870) (Bivalvia, Mytilidae) in the Mediterranean Sea, and evolution of a novel mtDNA polymorphism. **Marine Biology**, v. 150, n. 1, p. 89–101, 13 out. 2006.

TERRANOVA, M. S.; BRUTO, S.; ARCULEO, M.; MITTON, J. B. A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, n. 4, p. 289–298, nov. 2007.

THIEL, M.; ULLRICH, N. Hard rock versus soft bottom: The fauna associated with intertidal mussel beds on hard bottoms along the coast of Chile, and considerations on the functional role of mussel beds. **Helgoland Marine Research**, v. 56, n. 1, p. 21–30, 2002.

TOSIC, M.; RESTREPO, J. D.; LONIN, S.; IZQUIERDO, A.; MARTINS, F. Water and

sediment quality in Cartagena Bay, Colombia: Seasonal variability and potential impacts of pollution. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 216, p. 187–203, 2019.

TROVANT, B.; RUZZANTE, D. E.; BASSO, N. G.; ORENZANS, J. M. Distinctness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, Mytilidae) from the south-western Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 93, n. 7, p. 1843–1855, 2013.

TROVANT, B.; ORENZANS, J. M.; RUZZANTE, D. E.; STOTZ, W.; BASSO, N. G. Scorched mussels (BIVALVIA: MYTILIDAE: BRACHIDONTINAE) from the temperate coasts of South America: phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of quaternary glaciations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, n. PA, p. 60–74, 2015.

TROVANT, B.; BASSO, N. G.; ORENZANS, J. M.; LESSA, E. P.; DINCAO, F.; RUZZANTE, D. E. Scorched mussels (*Brachidontes* spp., Bivalvia: Mytilidae) from the tropical and warm-temperate southwestern Atlantic: the role of the Amazon River in their speciation. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 6, p. 1778–1798, 2016.

TRUCCO, M. I. **Diferenciación genética con polimorfismos alozímicos en *Mytilus* spp. del Atlántico Sudoccidental**. Unpublished PhD Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. España, 2001.

ULIANO-SILVA, M.; AMERICO, J.; BASTOS, A. S.; FURTADO, C.; REBELO, M. F.; PROSDOCIMI, F. Complete mitochondrial genome of the brown mussel *Perna perna* (Bivalve, Mytilidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v.27, n.6, p. 3955-3956, 2015.

VALENTIN, J. L. The Cabo Frio *Upwelling* System, Brazil. In: ULRICH, S.; KJERFVE, B. **Coastal Marine Ecosystems of Latin America**. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, Ecological Studies, v. 144, p. 97–105, 2001.cap. 7.

VALENTIN, J. L.; ANDRE, D. L.; JACOB, S. A. Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) *upwelling*: two-dimensional structure and variability during a wind cycle. **Continental**

Shelf Research, v. 7, n. 1, p. 77–88, jan. 1987.

VAN DER MOLEN, S.; MÁRQUEZ, F.; IDASZKIN, Y. L. ADAMI, M. Use of shell-shape to discriminate between *Brachidontes rodriguezii* and *Brachidontes purpuratus* species (Mytilidae) in the transition zone of their distributions (south-western Atlantic). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 93, n. 3, p. 803–808, 2013.

XIA, Y.; GU, H. F.; PENG, R.; CHEN, Q.; ZHENG, Y. C.; MURPHY, R. W. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 48–56, 2012.