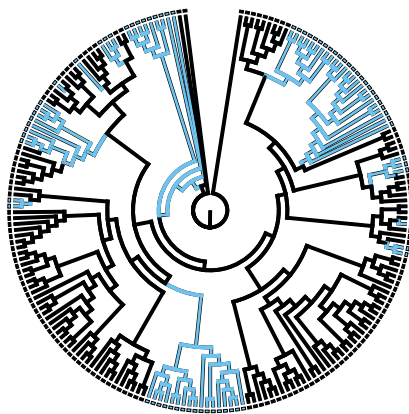


JORGE ALVES AUDINO



**Evolução da margem do manto em Pteriomorphia  
(Mollusca: Bivalvia): um modelo para compreensão  
da macroecologia do bentos marinho**



Evolution of the mantle margin in Pteriomorphia  
(Mollusca: Bivalvia): insights into the macroecology  
of the marine benthos



SÃO PAULO

2019

Jorge Alves Audino

**Evolução da margem do manto em Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia):  
um modelo para compreensão da macroecologia do bentos marinho**

Evolution of the mantle margin in Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia):  
insights into the macroecology of the marine benthos

São Paulo

2019

Jorge Alves Audino

**Evolução da margem do manto em Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia):  
um modelo para compreensão da macroecologia do bentos marinho**

Evolution of the mantle margin in Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia):  
insights into the macroecology of the marine benthos

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade de São Paulo, para a  
obtenção de Título de Doutor em Ciências  
Biológicas, na Área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Amoroso  
Rodriguez Marian

São Paulo

2019

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO

Questões macroevolutivas concentram elementos cruciais para a Biologia Evolutiva ao explorar associações entre diversidade fenotípica e paisagens adaptativas (Simpson, 1953; Schluter, 2000). A compreensão de como fatores ecológicos similares podem levar a fenótipos análogos em táxons independentes é fundamental para o estudo da evolução dos organismos (Losos, 2011; Serb *et al.*, 2017). Neste contexto, a evolução repetida de caracteres em linhagens independentes, *i.e.*, convergência evolutiva (Agrawal, 2017), em associação com fatores ambientais similares sugere possíveis adaptações, além de auxiliar na compreensão da evolução fenotípica sob regimes seletivos semelhantes (Harvey & Pagel, 1991; Losos, 2011; Mahler *et al.*, 2017). Enquanto diversos táxons de vertebrados são utilizados como modelos para estudos de irradiação evolutiva e convergência (Losos & Mahler, 2010), invertebrados são proporcionalmente menos estudados, de modo que padrões ecomorfológicos ainda permanecem amplamente subestimados.

Os Pteriomorphia são bivalves marinhos que representam modelos promissores em investigações de convergência e irradiação evolutiva devido à ampla diversidade morfológica e ecológica. Por serem animais bentônicos com diferentes hábitos de vida e com atributos fenotípicos supostamente associados a esses hábitos, esse grupo de bivalves representa um importante modelo para se explorar questões macroevolutivas no bentos marinho. O clado Pteriomorphia reúne ostras, mexilhões, vieiras, entre outros bivalves, e agrupa atualmente 23 famílias em cinco ordens (Bieler *et al.*, 2014), correspondendo a 20% da diversidade atual de bivalves (Combosch & Giribet, 2016). A classificação atual de Pteriomorphia encontra-se sumarizada no Anexo 1.

O monofiletismo de Pteriomorphia foi corroborado em diversas análises filogenéticas, utilizando diferentes amostragens taxonômicas e dados morfológicos e moleculares (Steiner & Hammer, 2000; Giribet & Wheeler, 2002; Matsumoto, 2003; Bieler *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2015; Lemer *et al.*, 2016; Sun & Gao, 2017). Contudo, as relações entre famílias e ordens ainda é pouco consensual e intensamente debatida, o que se configura em um fator limitante para se compreender questões relacionadas à homologia de caracteres morfológicos e à evolução fenotípica.

Os bivalves Pteriomorphia apresentam hábitos de vida variados, podendo ser classificados em duas categorias principais, *i.e.*, epifaunais e infaunais, conforme o

posicionamento do corpo em relação ao substrato (Stanley, 1975). Bivalves epifaunais vivem sobre substrato consolidados, como rochas, corais e outros fragmentos, geralmente com o auxílio do bisso, formado por filamentos de grande resistência secretados pelo animal e que garantem sua adesão a superfícies sólidas. Já bivalves semi-infaunais e infaunais possuem o hábito de se enterrar em substratos não-consolidados, deixando a região posterior do corpo exposta, acima da superfície. Em Pteriomorpha, a suposta condição ancestral de escavadores superficiais foi substituída por hábitos epifaunais na maioria das linhagens, contribuindo para a irradiação evolutiva do grupo (Stanley, 1972). Em Ostreida, as ostras (Ostreidae) cimentam uma das valvas sobre substratos consolidados, enquanto muitos Pteriidae vivem fixados pelo bisso a diferentes tipos de substrato (Tëmkin, 2006). Os Pinnidae representam uma exceção, sendo todos animais semi-infaunais, vivendo parcialmente enterrados em substrato não-consolidado com auxílio de um longo e volumoso bisso (Yonge, 1953). Em Pectinida e Limida, a diversidade de hábitos epifaunais é notável, incluindo espécies vágeis, além de espécies cimentantes, como em Spondylidae (Waller, 2006). Os mexilhões, típicos representantes da ordem Mytilida, são epifaunais, vivendo fixos sobre rochas e outros materiais por meio de um forte bisso; contudo, muitas linhagens do clado apresentam hábito perfurador ou semi-infaunal (Distel, 2000). Finalmente, a ordem Arcida também abrange diversas linhagens de bivalves epifaunais e infaunais (Oliver & Holmes, 2006).

Como brevemente exemplificado acima, a irradiação evolutiva da maioria das linhagens de Bivalvia é caracterizada pela ocupação de diferentes zonas adaptativas, o que está possivelmente relacionado à ampla diversificação morfológica do grupo (Giribet, 2008). Estudos anatômicos identificaram supostas associações entre diferentes modos de vida e possíveis adaptações morfológicas, relacionadas principalmente ao formato e estrutura das valvas, organização da musculatura adutora e presença de especializações do manto (Stanley, 1972; Yonge, 1983; Oliver & Holmes, 2006; Morton, 2015). Contudo, a maioria dessas hipóteses não foi testada em um contexto filogenético ou por métodos comparativos. Recentemente, entretanto, esse tipo de abordagem foi empregado na investigação da evolução morfológica e ecológica de alguns clados de bivalves, como Pectinidae, Mytilidae e Galeommatidae, corroborando a existência de inúmeras convergências evolutivas associadas a contextos ecológicos similares (Alejandrino, Puslednik, & Serb, 2011; Lorion *et al.*, 2013; Li, Ó Foighil, & Strong, 2016; Serb *et al.*, 2017).

Considerando o contexto apresentado acima, a margem do manto (ou palial) dos bivalves representa uma promissora fonte de dados fenotípicos, pois está intimamente associada ao uso de habitats e também à diversificação taxonômica (Yonge, 1983). O manto é

um órgão formado pelos lobos direito e esquerdo, unidos dorsalmente, e responsável pela secreção da concha, além de delimitar a cavidade do manto, onde localizam-se os ctenídios (brânquias) (Carter *et al.*, 2012). Em sua porção mais distal, junto à borda da valva, a margem do manto organiza-se em pregas que podem variar com relação à forma e à função. De modo generalizado, a margem do manto é tipicamente composta por três pregas, sendo a principal região de interação com o meio externo (Yonge, 1983). Por isso, é considerada um elemento chave na compreensão da irradiação evolutiva dos bivalves e na conquista de novos nichos ecológicos (Yonge, 1983). Um exemplo clássico corresponde aos sifões, estruturas formadas a partir da fusão de pregas do manto e que permitem a comunicação e fluxo de água com o ambiente em animais que vivem enterrados no sedimento (Yonge, 1957).

A plasticidade e diversidade da margem do manto inclui estruturas especializadas como glândulas e células secretoras que atuam na limpeza, adesão, lubrificação e até mesmo perfuração do substrato (Morton & Scott, 1980; Morton, 1982). Além disso, tentáculos também são comuns na margem do manto de Limidae, Pectinidae, Ostreidae e Pteriidae, onde podem desempenhar funções sensoriais, secretoras e defensivas (Gilmour, 1967; Morton, 1973; Moir, 1977; Mikkelsen & Bieler, 2003). Órgãos fotorreceptores ocorrem na margem do manto de vários grupos de bivalves, representando um elemento de grande interesse em estudos evolutivos e anatômicos (Morton, 2008). Apesar do extenso conhecimento sobre a morfologia da margem do manto em bivalves infaunais, principalmente quanto à descrição dos sifões e graus de fusão (Yonge, 1957, 1983; Sartori *et al.*, 2008), a escassez de informações para a mesma região em bivalves epifaunais é notável.

No caso de Pteriomorphia, a carência de informações comparativas e sistematizadas sobre a morfologia do manto no grupo representa uma importante lacuna em estudos anatômicos e evolutivos. Contudo, diversas linhas de evidência apontam para a correlação de estruturas paliais e a diversificação de hábitos de vida. Por exemplo, o surgimento independente de fotorreceptores em pregas paliais de diversas linhagens de bivalves é amplamente reconhecido como um caso de convergência evolutiva (Serb & Eernisse, 2008; Morton, 2008). A evolução de pregas paliais hipertrofiadas também parece estar fortemente associada ao hábito epifaunal em muitos grupos de bivalves (Yonge, 1983). O desenvolvimento de estruturas tentaculares no manto, assim como alguns graus de fusão, também são apontados como convergentes (Gilmour, 1967; Morton, 1973; Yonge, 1983). Portanto, a margem do manto reúne caracteres morfológicos de grande potencial na compreensão de adaptações e convergências evolutivas em Bivalvia, sendo um elemento chave em Pteriomorphia dada sua diversidade de forma e função.

Em um contexto mais amplo, a margem do manto dos bivalves concentra estruturas em contato primário com o ambiente externo, da mesma forma que os lofóforos em briozoários, coroa de tentáculos em cnidários, e região anterior do corpo em poliquetas tubícolas (Gilmour, 1978; Dauer, 1985; Nielsen & Riisgård, 1998). Todas as regiões descritas podem ser consideradas correspondentes, pois possuem concentração de órgãos sensoriais, combinados com ação ciliar, produção de muco e outras secreções, além de auxiliarem na obtenção de alimento, proteção e circulação de água. Desse modo, a margem do manto de bivalves também representa um potencial modelo no estudo sobre a diversificação de forma e funções de regiões corpóreas associadas à interação com o ambiente, particularmente em animais sésseis do bentos marinho.

## **2. OBJETIVOS**

Investigar a diversidade morfológica da margem do manto em Pteriomorphia, por meio de abordagens comparativas e funcionais, a fim de inferir a evolução dessa região e testar hipóteses de convergências associadas à diversificação do grupo no bentos marinho. De modo mais específico, a presente pesquisa e seus respectivos objetivos estiveram organizados de acordo com as seguintes perguntas:

### *1. Qual a diversidade morfológica da margem do manto em Pteriomorphia?*

Objetivo: Sistematizar o conhecimento sobre a margem do manto para diferentes níveis taxonômicos quanto à anatomia, morfologia funcional e diversidade.

### *2. Como foi a evolução dessa diversidade?*

Objetivo: Estudar a evolução da margem palial por meio da reconstrução de estados ancestrais de caracteres do manto, de modo a inferir mudanças de estado ao longo da filogenia do grupo.

### *3. De que modo a diversificação de forma e função da margem do manto está associada à evolução de Pteriomorphia no bentos marinho?*

Objetivo: Fornecer bases sólidas para proposição e teste de hipóteses de homologia e convergência de estruturas do manto e sua eventual correlação com o modo de vida dos representantes de Pteriomorphia.

#### 4. *Quais aspectos funcionais estão vinculados à diversidade morfológica?*

Objetivo: Compreender a anatomia funcional da margem do manto e estruturas associadas em espécies representantes das principais famílias de Pteriomorphia, fornecendo subsídios anatômicos para compreensão dos padrões encontrados no estudo evolutivo.

### 3. METODOLOGIA GERAL

Para contemplar seus objetivos, a pesquisa foi dividida em três frentes de estudos: (1) inferência filogenética de Pteriomorphia com base em dados moleculares; (2) avaliação e descrição da diversidade palial com base em espécimes depositados em coleções, como base para o levantamento de caracteres, reconstrução de estados ancestrais e testes de correlação com hábitos de vida; e (3) estudo anatômico detalhado da margem do manto em exemplares coletados, para compreensão da base funcional das estruturas envolvidas.

De acordo com a abordagem proposta, a primeira frente do estudo objetivou a inferência filogenética de Pteriomorphia como ferramenta para a subsequente análise da evolução fenotípica. A segunda frente de estudo vincula-se às perguntas 1 a 3, possuindo um componente mais abrangente e comparativo, associado ao levantamento da diversidade morfológica e dos hábitos de vida. Considerando explicitamente o contexto filogenético, o reconhecimento de padrões na morfologia do manto possibilitou o teste de correlações entre os atributos fenotípicos observados e aspectos da biologia dos táxons. O terceiro componente da pesquisa foi dirigido à pergunta 4, e se propôs a explicar os padrões encontrados a partir da compreensão da base funcional das estruturas envolvidas, envolvendo análises anatômicas detalhadas.

#### 3.1. Inferência filogenética

Para a inferência filogenética de Pteriomorphia, foram utilizadas 187 espécies de 19 famílias de Pteriomorphia, considerando as sequências nucleotídicas de cinco genes, *i.e.*, 16S rRNA, COI mtDNA, 18S rRNA, 28S rRNA e histona H3, obtidas no *Genbank*. Mais informações a respeito da amostragem taxonômica e do conjunto de dados moleculares estão detalhadas na metodologia dos capítulos 2, 6 e 7, que incluem análises filogenéticas. De modo geral, alinhamentos foram gerados no MAFFT sob o método L-INS-i (Kato & Standley, 2013), a seleção de modelos de evolução nucleotídica foi realizada por meio do ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) e as buscas de árvores foram conduzidas sob máxima verossimilhança no IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2014). Quando possível, tempos de divergência



foram estimados por inferência Bayesiana a partir de dados fósseis, utilizando-se o modelo *fossilized birth-death model* no software RevBayes (Höhna *et al.*, 2016). Mais informações a respeito da amostragem taxonômica, dados fósseis e outros parâmetros de análise estão descritos nos capítulos 6 e 7.

### **3.2. Diversidade e evolução da margem do manto em Pteriomorphia.**

As espécies de interesse nesta frente de estudo abrangeram a diversidade de Pteriomorphia, bem como as variações dentro de cada família. O material de pesquisa foi obtido em coleções científicas via empréstimo ou visita, incluindo materiais analisados no exterior. No total, foram observados exemplares de 209 espécies depositados nas seguintes coleções: MCZ (*Harvard Museum of Comparative Zoology*, Cambridge, EUA), MZSP (Museu de Zoologia da USP), SBMNH (*Santa Barbara Museum of Natural History*, Santa Barbara, EUA), USNM (*Smithsonian National Museum of Natural History*, Washington, EUA), e ZUEC-BIV (Coleção de Bivalvia do Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso” da UNICAMP).

#### *3.2.1. Caracterização morfológica*

A morfologia geral da margem do manto foi avaliada nas espécies de interesse, com ênfase na obtenção de informações sobre os seguintes caracteres: 1) morfologia geral (*e.g.*, pigmentação e variação ao longo do eixos corpóreos); 2) pregas do manto (*e.g.*, número de pregas, morfologia, tamanho relativo); 3) fusão palial (pontos de fusão ao longo da margem do manto); 4) estruturas paliais associadas (*e.g.*, tentáculos e órgãos fotorreceptores.). O estudo foi realizado por meio de dissecções em etanol e observações sob estereomicroscópio.

#### *3.2.2. Reconstrução da evolução da margem do manto*

Os caracteres de interesse foram codificados e organizados em matrizes com base na observação dos espécimes provenientes de coleções científicas. Estados de caráter foram atribuídos aos terminais com base em observações das espécies correspondentes. Em espécies não observadas, e no caso de não haver informação na literatura, os estados foram assinalados como equivalentes aos de espécies congênicas analisadas.

Reconstruções de estado ancestral foram conduzidas sob máxima verossimilhança. Dois possíveis modelos foram considerados, *i.e.*, o modelo MK1 (Markov *k*-state), que assume taxas iguais para transições de estado, e o modelo AsymmMK (asymmetrical Markov

*k*-state), que permite que as taxas de transição sejam diferentes. A razão de verossimilhança (*likelihood ratio*) foi utilizada para verificar qual modelo se ajustava melhor aos dados apresentados, definindo assim o modelo adotado na análise (Pagel, 1994; Maddison & Maddison, 2018).

Testes de correlação foram aplicados quando dois caracteres binários, com múltiplas transições ao longo da filogenia, pareciam estar associados. Hipóteses de correlação foram aceitas sempre que o modelo de oito parâmetros (hipóteses de evolução dependente) apresentou melhor desempenho ( $p < 0,05$ ) do que o modelo de quatro parâmetros (hipóteses de evolução independente), considerando as diferenças em *loglikelihood* dos modelos (Pagel, 1994). Reconstruções de estado ancestral e testes de correlação foram realizados no software Mesquite (Maddison & Maddison, 2018).

### 3.3. Anatomia detalhada e funcional da margem do manto

Esta frente de estudo foi dedicada a compreender a base funcional das estruturas da margem do manto, empregando análises anatômicas detalhadas. Indivíduos das espécies de interesse foram coletados no Canal de São Sebastião (SP) nas regiões infra, meso e supra litoral de costões rochosos. A coleta, manutenção e demais procedimentos com animais vivos foram realizados com apoio da infraestrutura e equipe técnica do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP). Foram obtidas amostras do manto de 12 espécies, listadas na Tabela 1, contemplando 7 famílias de Pteriomorphia.

**Tabela 1.** Espécies coletadas no Canal de São Sebastião (SP) e cujas amostras da margem do manto foram processadas para diferentes técnicas de microscopia: histologia e histoquímica (Hist), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (MC). Algumas amostras não foram processadas para microscopia confocal devido ao excesso de pigmentação no manto, o que inviabilizaria a análise.

Família	Espécie	Autor	Hist	MEV	MC
Arcidae	<i>Arca imbricata</i>	Bruguière, 1789	✓	✓	
Arcidae	<i>Barbatia candida</i>	(Helbling, 1779)	✓	✓	✓
Mytilidae	<i>Brachidontes exustus</i>	(Linnaeus, 1758)	✓	✓	
Mytilidae	<i>Leiosolenus bisulcatus</i>	(d'Orbigny, 1853)	✓	✓	
Mytilidae	<i>Perna perna</i>	(Linnaeus, 1758)	✓	✓	
Noetiidae	<i>Arcopsis adamsi</i>	(Dall, 1886)	✓	✓	✓

<b>Ostreidae</b>	<i>Ostrea equestris</i>	Say, 1834	✓	✓	✓
<b>Pinnidae</b>	<i>Pinna carnea</i>	Gmelin, 1791	✓	✓	✓
<b>Pteriidae</b>	<i>Isognomon bicolor</i>	(Adams, 1845)	✓	✓	✓
<b>Pteriidae</b>	<i>Pinctada imbricata</i>	Röding, 1798	✓	✓	✓
<b>Pteriidae</b>	<i>Pteria colymbus</i>	Röding, 1798	✓	✓	✓
<b>Spondylidae</b>	<i>Spondylus ictericus</i>	Reeve, 1856	✓	✓	✓

### 3.3.1. Fixação do material para estudos de microscopia

Antes da fixação, os indivíduos foram anestesiados adicionando-se solução de cloreto de magnésio a 7,5% à água do mar (proporção 1 anestésico: 3 água do mar), sob refrigeração, por um período de até 3h (conforme o tamanho dos indivíduos). Esse procedimento foi realizado com o objetivo de se reduzir as contrações musculares observadas durante a fixação. Indivíduos diminutos foram fixados inteiramente, enquanto que indivíduos maiores tiveram sua margem do manto dissecada e posteriormente fixada. Dois tipos de solução fixadora foram empregados: (1) amostras para microscopia confocal foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão PB a 1,0M (tampão fosfato com osmolaridade ajustada para 1000mOsm e pH 7.2) por duas horas e em seguida lavadas e mantidas em tampão PB com 0,1% de NaN<sub>3</sub>; (2) amostras destinadas à histologia e microscopia eletrônica foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, com osmolaridade ajustada para 1000mOsm e pH 7.4) por três horas e em seguida lavadas e mantidas em tampão cacodilato de sódio a 0,1M.

### 3.3.2. Histologia e histoquímica

A partir da metodologia de fixação descrita anteriormente, as amostras da margem do manto de espécimes coletados foram submetidas ao procedimento descrito a seguir. Após desidratação em série alcoólica ascendente até etanol a 100%, as amostras foram incluídas em resina à base de glicol-metacrilato da marca “Leica” (“Leica Historesin Kit”), seguindo-se instruções do fabricante. Cortes seriados de 3 µm a 4 µm de espessura foram obtidos e montados em lâminas. Foram empregados os métodos de coloração descritos na Tabela 2. Todas as lâminas produzidas foram posteriormente preparadas em meio de montagem apropriado (“Entellan”) com lamínula.

**Tabela 2.** Métodos de coloração empregados nos estudos histológicos da margem do manto. Referências utilizadas para os métodos: Humason, 1962; Behmer, Tolosa, & Freitas Neto, 1976; Bancroft & Stevens, 1982; Pearse, 1985; Junqueira & Carneiro, 1995.

<b>Método de coloração</b>	<b>Objetivo</b>
Hematoxilina de Mayer e eosina Y	Coloração para análise geral
Azul de Toluidina e fucsina Básica	Coloração para análise geral
Azul de Alcian	Identificação de mucopolissacarídeos ácidos
PAS	Identificação de mucopolissacarídeos
PAS + azul de Alcian	Diferenciar os tipos de mucopolissacarídeos
Preto de Sudão B	Identificação de agregados lipídicos
Tricromo de Mallory	Evidenciar musculatura, tecido conjuntivo e glândulas
Tricromo de Gomori	Evidenciar musculatura, tecido conjuntivo e glândulas
Azul de bromofenol	Evidenciar proteínas básicas
Amarelo naftol	Evidenciar aminoácidos e peptídeos

### 3.3.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

Para microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram submetidas à segunda fixação com OsO<sub>4</sub> a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio a 0.1M durante 30 minutos, depois lavadas com ácido tânico em solução tampão por 15 minutos e, então, mantidas em nova solução de OsO<sub>4</sub> por 15 minutos. Após a segunda fixação, todas as amostras foram então desidratadas até etanol a 100% em série alcoólica ascendente, submetidas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> como fluido transicional (Balzers CPD 030), montadas em *stubs* e metalizadas com ouro (Balzers CPD 050). O material resultante foi analisado no Microscópio Eletrônico de Varredura do Instituto de Biociências da USP (ZEISS SIGMA VP).

### 3.3.4. *Microscopia Confocal de Varredura a Laser*

Amostras para microscopia confocal foram inicialmente mantidas em solução tampão com Triton X-100 a 2% (PBT) *overnight* para aumento de permeabilidade dos tecidos. Para marcação muscular (fibras de actina), as amostras foram incubadas em *Alexa Flour 488 Phalloidin* em PBT por 24 horas no escuro. Para marcação de cílios e fibras nervosas (filamentos de tubulina), as amostras foram incubadas em *Alexa Flour 488 Anti-tubulin* em PBT por 24 horas no escuro. Em seguida, as amostras foram lavadas em três banhos de 15 minutos cada com solução tampão (PB) e então montadas em lâmina e lamínula utilizando

meio de montagem *Anti-Fading Diamond Pro* (Molecular Probes) com DAPI para marcação nuclear. As lâminas foram mantidas sob refrigeração até análise no Microscópio Confocal de Varredura a Laser do IB-USP (ZEISS LSM 880). Planos ópticos foram registrados ao longo do eixo z e digitalmente agrupados pelo método de projeção de máxima intensidade. Demais ajustes forem realizados com o software ZEN Lite (ZEISS).

#### **4. ORGANIZAÇÃO DA TESE**

Além da presente “Introdução geral” e das “Considerações Finais”, a tese está organizada em oito capítulos estruturados como artigos científicos e redigidos em inglês. Cada capítulo aborda um conjunto de questões e hipóteses específicas que, somadas, permitem compreender a diversidade e evolução da margem do manto nos bivalves Pteriomorphia.

##### **Capítulo 1. Evolutionary significance of the mantle margin in pteriomorphian bivalves**

O capítulo compreende uma ampla revisão sobre a margem do manto nos moluscos bivalves, com ênfase nos Pteriomorphia. O conhecimento sobre essa região anatômica é avaliado, considerando publicações em diferentes áreas, incluindo morfologia, genética e fisiologia. Ao longo da revisão, são apresentadas diferentes evidências que suportam a margem do manto como uma região de grande potencial para estudos evolutivos, principalmente devido à relação entre ecologia e morfologia funcional. De modo complementar, Pteriomorphia é indicado como clado modelo para diferentes investigações, principalmente focadas em evolução convergente e diversificação de órgãos sensoriais. Em suma, o capítulo fornece uma introdução ao tema da tese e explora os fundamentos teóricos que subsidiam os demais capítulos.

O capítulo foi publicado na revista *American Malacological Bulletin*.

##### **Capítulo 2. On the evolution of mantle photoreceptor organs in Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia)**

O capítulo explora a diversidade e evolução de órgãos fotorreceptores em Pteriomorphia. A abordagem filogenética compreende a maior amostragem taxonômica do grupo atualmente, incluindo 187 espécies de 19 famílias. A margem do manto foi analisada em 209 espécies (com base em indivíduos preservados em coleções) para avaliação da presença, tipo e distribuição de órgãos fotorreceptores. Com base na hipótese filogenética inferida, estudos de reconstrução de estado ancestral foram conduzidos para avaliar a evolução dos órgãos fotorreceptores, assim como dos hábitos de vida. Os dados obtidos para Pteriomorphia sistematizam informações morfofuncionais e evolutivas, fornecendo evidências robustas para hipóteses de homologia e convergência de órgãos fotorreceptores no clado.

### **Capítulo 3. Form and function of tentacles in pteriomorphian bivalves**

O capítulo apresenta dados detalhados da anatomia de tentáculos de Pteriomorphia por meio de histologia, microscopia eletrônica e confocal. Foram consideradas amostras de indivíduos coletados de seis espécies de quatro famílias de Pteriomorphia (*i.e.*, Ostreidae, Pinnidae, Pteriidae e Spondylidae), com ênfase em observações de musculatura, inervação, ciliação e atividade secretora. Os dados obtidos para a diversidade de tentáculos do clado, em conjunto com informações da literatura, permitem o reconhecimento de padrões anatômicos e funcionais, bem como a proposição de hipóteses de homologia.

### **Capítulo 4. The evolution of tentacles untangled: revealing tentacle homology and convergence in epifaunal bivalves**

O capítulo aborda a evolução de tentáculos em Pteriomorphia, com base na hipótese filogenética inferida para o clado, apresentada no segundo capítulo. O estudo morfológico foi realizado com base em exemplares preservados de coleções científicas, totalizando 121 espécies de 13 famílias que possuem tentáculos na margem do manto. As observações focaram no tipo, localização e distribuição de tentáculos na margem do manto. O estudo de morfologia comparada, combinada à reconstrução de estados ancestrais, permitiu testar hipóteses de homologia dos tentáculos em Pteriomorphia, revelando atributos homólogos bem como homoplásticos.

### **Capítulo 5. Comparative and functional anatomy of the mantle margin in ark clams and relatives (Bivalvia: Arcoidea) supports association between morphology and life habits**

O capítulo apresenta um estudo anatômico detalhado de representantes de quatro famílias da ordem Arcida (*i.e.*, Arcidae, Cucullaeidae, Glycymerididae e Noetiidae). Com base em dados de histologia, microscopia eletrônica e confocal, a margem do manto foi estudada nesses animais, com ênfase em funções secretoras e sensoriais. Dados de morfologia geral para 27 espécies provenientes de coleções complementam a análise. Os resultados obtidos revelam padrões morfofuncionais e possíveis associações a diferentes hábitos de vida.

O capítulo foi publicado na revista *Journal of Zoology*.

## **Capítulo 6. Ark clams and relatives (Bivalvia: Arcida) show convergent morphological evolution associated with lifestyle transitions in the marine benthos**

O capítulo aborda a evolução da margem do manto na ordem Arcida, com base em hipóteses filogenéticas geradas para 54 espécies de seis famílias que compõem clado, além de uma árvore datada a partir de dados fósseis. A margem do manto foi estudada em 64 espécies provenientes de museus, permitindo ampla caracterização da região e das estruturas associadas. Métodos filogenéticos comparativos foram empregados para avaliar a evolução das estruturas da margem do manto, bem como sua associação com hábitos de vida.

O capítulo foi publicado na revista *Biological Journal of the Linnean Society*.

## **Capítulo 7. Phylogeny and anatomy of marine mussels (Mytilidae) reveal convergent evolution of siphon traits in association with similar ecology**

O capítulo explora a evolução da margem do manto na família dos mexilhões (Mytilidae) com base em anatomia comparada e funcional, além de métodos filogenéticos comparativos. Foram utilizadas 32 espécies a fim de inferir a filogenia do grupo, incluindo uma árvore datada a partir de dados fósseis. A margem do manto foi estudada em 43 espécies (23 gêneros) com base em espécimes preservados provenientes de coleções. Dados de anatomia detalhada também foram investigados por meio de microscopia integrativa para quatro espécies coletadas. Resultados da morfologia comparada e funcional são discutidos no contexto filogenético e revelam diferentes aspectos da evolução da margem do manto em associação a transições entre hábitos de vida.

## **Capítulo 8. Detailed and comparative anatomy reveal further unusual mantle specializations in pen shells (Mollusca: Bivalvia: Pinnidae)**

O capítulo apresenta dados de morfologia comparada da margem do manto para 10 espécies dos três gêneros (*Atrina*, *Pinna* e *Streptopinna*) que compõe a família Pinnidae. Além disso, a margem do manto foi detalhadamente estudada em *Pinna carnea* (espécime coletado) por meio de microscopia eletrônica de varredura e histologia. Os dados obtidos revelam padrões morfofuncionais em Pinnidae, além de informações inéditas a respeito da composição e atividade secretora do manto. Um nova estrutura glandular é descrita para a margem do manto.



## Referências bibliográficas

- Agrawal AA. 2017. Toward a predictive framework for convergent evolution: Integrating natural history, genetic mechanisms, and consequences for the diversity of life. *The American Naturalist* 190: S1–S12.
- Alejandrino A, Puslednik L, Serb JM. 2011. Convergent and parallel evolution in life habit of the scallops (Bivalvia: Pectinidae). *BMC Evolutionary Biology* 11.
- Bancroft J, Stevens A. 1982. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York, NY: Churchill Livingstone.
- Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. 1976. *Manual de técnicas para microscopia normal e patológica*. São Paulo: Edusp.
- Bieler R, Mikkelsen PM, Collins TM, Glover EA, González VL, Graf DL, Harper EM, Healy J, Kawauchi GY, Sharma PP, Staubach S, Strong EE, Taylor JD, Tëmkin I, Zardus JD, Clark S, Guzmán A, McIntyre E, Sharp P, Giribet G. 2014. Investigating the Bivalve Tree of Life – an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics* 28: 32.
- Carter JG, Harries PJ, Malchus N, Sartori AF, Anderson LC, Bieler R, Bogan AE, Coan EV, Cope JC, Cragg S. 2012. Illustrated glossary of the Bivalvia. *Treatise Online*: 1–209.
- Combosch DJ, Giribet G. 2016. Clarifying phylogenetic relationships and the evolutionary history of the bivalve order Arcida (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 298–312.
- Dauer DM. 1985. Functional morphology and feeding behavior of *Paraprionospio pinnata* (Polychaeta: Spionidae). *Marine Biology* 85: 143–151.
- Distel DL. 2000. Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in mytilid body plans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 25–33.
- Gilmour THJ. 1967. The defensive adaptations of *Lima hians* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47: 209–221.
- Gilmour THJ. 1978. Ciliation and function of the food-collecting and waste-rejecting organs of lophophorates. *Canadian Journal of Zoology* 56: 2142–2155.
- Giribet G. 2008. Bivalvia. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. Berkeley: University of California Press, 105–141.
- Giribet G, Wheeler W. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121: 271–324.
- Gonzalez VL, Andrade SCS, Bieler R, Collins TM, Dunn CW, Mikkelsen PM, Taylor JD, Giribet G. 2015. A phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20142332–20142332.
- Harvey PH, Pagel MD. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford: Oxford university press.
- Höhna S, Landis MJ, Heath TA, Boussau B, Lartillot N, Moore BR, Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2016. RevBayes: Bayesian phylogenetic inference using graphical models and an interactive model-specification language. *Systematic Biology* 65: 726–736.

- Humason GL. 1962. *Animal tissue techniques*. San Francisco & London: W. H. Freeman and Company.
- Junqueira LC, Carneiro J. 1995. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, von Haeseler A, Jermini LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14: 587.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Lemer S, González VL, Bieler R, Giribet G. 2016. Cementing mussels to oysters in the pteriomorphian tree: A phylogenomic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20160857.
- Li J, Ó Foighil D, Strong EE. 2016. Commensal associations and benthic habitats shape macroevolution of the bivalve clade Galeommatoidea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20161006.
- Lorion J, Kiel S, Faure B, Kawato M, Ho SYW, Marshall B, Tsuchida S, Miyazaki JI, Fujiwara Y. 2013. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20131243–20131243.
- Losos JB. 2011. Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution* 65: 1827–1840.
- Losos JB, Mahler DL. 2010. Adaptive radiation: the interaction of ecological opportunity, adaptation, and speciation. *Evolution after Darwin: the first 150 years*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Maddison WP, Maddison DR. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51 <http://www.mesquiteproject.org>.
- Mahler DL, Weber MG, Wagner CE, Ingram T. 2017. Pattern and process in the comparative study of convergent evolution. *The American Naturalist* 190: S13–S28.
- Matsumoto M. 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 429–440.
- Mikkelsen PM, Bieler R. 2003. Systematic revision of the western Atlantic file clams, *Lima* and *Ctenoides* (Bivalvia: Limoida: Limidae). *Invertebrate Systematics* 17: 667.
- Moir AJG. 1977. Ultrastructural studies on the ciliated receptors of the long tentacles of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Cell and Tissue Research* 184: 367–380.
- Morton B. 1973. The biology and functional morphology of *Galeomma (Paralepida) takii* (Bivalvia: Leptonacea). *Journal of Zoology* 169: 133–150.
- Morton B. 1982. Functional morphology of *Bathyarca pectunculoides* (Bivalvia: Arcacea) from a deep Norwegian fjord with a discussion of the mantle margin in the Arcoida. *Sarsia* 67: 269–282.
- Morton B. 2008. The evolution of eyes in the Bivalvia: New insights. *American Malacological Bulletin* 26: 35–45.
- Morton B. 2015. Evolution and adaptive radiation in the Mytiloidea (Bivalvia): clues from the pericardial–posterior byssal retractor musculature complex. *Molluscan Research* 35: 227–245.

- Morton B, Scott PJB. 1980. Morphological and functional specializations of the shell, musculature and pallial glands in the Lithophaginae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Zoology* 192: 179–203.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2014. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution* 32: 268–274.
- Nielsen C, Riisgård H. 1998. Tentacle structure and filter-feeding in *Crisia eburnea* and other cyclostomatous bryozoans, with a review of upstream-collecting mechanisms. *Marine Ecology Progress Series* 168: 163–186.
- Oliver PG, Holmes AM. 2006. The Arcoidea (Mollusca: Bivalvia): a review of the current phenetic-based systematics. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 237–251.
- Pagel M. 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc. R. Soc. Lond. B* 255: 37–45.
- Pearse AGE. 1985. *Histochemistry, theoretical and applied*. London: Churchill Livingstone.
- Sartori AF, Printrakoon C, Mikkelsen PM, Bieler R. 2008. Siphonal structure in the Veneridae (Bivalvia: Heterodonta) with an assessment of its phylogenetic application and a review of venerids of the Gulf of Thailand. *The Raffles Bulletin of Zoology* 18: 103–125.
- Schluter D. 2000. *The ecology of adaptive radiation*. Oxford: Oxford University Press.
- Serb JM, Eernisse DJ. 2008. Charting evolution's trajectory: Using molluscan eye diversity to understand parallel and convergent evolution. *Evolution: Education and Outreach* 1: 439–447.
- Serb JM, Sherratt E, Alejandrino A, Adams DC. 2017. Phylogenetic convergence and multiple shell shape optima for gliding scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Evolutionary Biology* 30: 1736–1747.
- Simpson GG. 1953. *The major features of evolution*. New York, NY: Columbia University Press.
- Stanley SM. 1972. Functional morphology and evolution of byssally attached bivalve mollusks. *Journal of Paleontology* 46: 165–212.
- Stanley SM. 1975. Adaptive themes in the evolution of the Bivalvia (Mollusca). *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 3: 361–385.
- Steiner G, Hammer S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences with particular reference to the Pteriomorphia. *Geological Society, London, Special Publications* 177: 11–29.
- Sun W, Gao L. 2017. Phylogeny and comparative genomic analysis of Pteriomorphia (Mollusca: Bivalvia) based on complete mitochondrial genomes. *Marine Biology Research* 13: 255–268.
- Tëmkin I. 2006. Morphological perspective on the classification and evolution of Recent Pterioidea (Mollusca: Bivalvia). *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 253–312.
- Waller TR. 2006. Phylogeny of families in the Pectinoidea (Mollusca: Bivalvia): importance of the fossil record. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 313–342.

- Yonge CM. 1953. Form and Habit in *Pinna carnea* Gmelin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 237: 335–374.
- Yonge CM. 1957. Mantle fusion in the Lamellibranchia. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* 29: 151–171.
- Yonge CM. 1983. Symmetries and the role of the mantle margins in the bivalve Mollusca. *Malacological Review* 16: 1–10.

**Anexo 1.** Classificação atual dos bivalves Pteriomorphia segundo a plataforma de dados *MolluscaBase* (2019) do *World Register of Marine Species* (<http://www.marinespecies.org/>).

**PTERIOMORPHIA Beurlen, 1944**

**Ordem Arcida Gray, 1854**

- Superfamília Arcoidea Lamarck, 1809
  - Família Arcidae Lamarck, 1809
  - Família Cucullaeidae Stewart, 1930
  - Família Glycymerididae Dall, 1908 (1847)
  - Família Noetiidae Stewart, 1930
  - Família Parallelodontidae Dall, 1898
- Superfamília Limopsoidea Dall, 1895
  - Família Limopsidae Dall, 1895
  - Família Phylobryidae F. Bernard, 1897

**Ordem Limida Moore, 1952**

- Superfamília Limoidea d'Orbigny, 1846
  - Família Limidae d'Orbigny, 1846

**Ordem Mytilida Férussac, 1822**

- Superfamília Mytiloidea Rafinesque, 1815
  - Família Mytilidae Rafinesque, 1815

**Ordem Ostreida Férussac, 1822**

- Superfamília Ostreoidea Rafinesque, 1815
  - Família Ostreidae Rafinesque, 1815
  - Família Gryphaeidae Vyalov, 1936
- Superfamília Pinnoidea Leach, 1819
  - Família Pinnidae Leach, 1819
- Superfamília Pterioidea Gray, 1847 (1820)
  - Família Malleidae Lamarck, 1818
  - Família Pteriidae Gray, 1847 (1820)
  - Família Pulvinitidae Stephenson, 1941

**Ordem Pectinida Gray, 1854**

- Superfamília Anomioidea Rafinesque, 1815
  - Família Anomiidae Rafinesque, 1815
  - Família Placunidae Rafinesque, 1815
- Superfamília Dimyoidea P. Fischer, 1886
  - Família Dimyidae P. Fischer, 1886
- Superfamília Pectinoidea Rafinesque, 1815
  - Família Entoliidae Teppner, 1922
  - Família Pectinidae Rafinesque, 1815
  - Família Propeamussiidae Abbott, 1954
  - Família Spondylidae Gray, 1826
- Superfamília Plicatuloidea Gray, 1857
  - Família Plicatulidae Gray, 1857

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de diferentes abordagens e a análise conjunta dos dados obtidos permitiram ampla investigação sobre a margem do manto em Pteriomorphia, contemplando os objetivos da pesquisa proposta. O conjunto de questões e resultados levantados com este trabalho é inédito para bivalves e não somente amplia o conhecimento sobre Pteriomorphia, como também contribui para o entendimento de questões que extrapolam o grupo-modelo, como irradiações evolutivas, correlação fenótipo-ambiente, convergências evolutivas e adaptação.

A hipótese filogenética de Pteriomorphia foi inferida com base em ampla amostragem taxonômica e até cinco genes. O clado foi recuperado como monofilético, assim como previamente sugerido em estudos filogenéticos de Bivalvia (Steiner & Hammer, 2000; Giribet & Wheeler, 2002; Bieler *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2015; Combosch *et al.*, 2017; Ozawa *et al.*, 2017). Na presente análise, Pteriomorphia está organizada em quatro ordens contidas em dois clados principais (Arcida+Pectinida e Ostreida+Mytilida).

As relações de parentesco entre famílias e ordens, principalmente Mytilida e Arcida, revelaram-se pouco consensuais na literatura, gerando hipóteses conflitantes (Matsumoto, 2003; Bieler *et al.*, 2014; Lemer *et al.*, 2016; Sun & Gao, 2017). Estudos prévios com Arcida, por exemplo, revelaram ampla sensibilidade à amostragem taxonômica e conjunto de dados (Feng, Li, & Kong, 2015; Combosch & Giribet, 2016), o que também foi constatado na presente investigação. A ordem é composta por duas superfamílias, Arcoidea e Limopsoidea, e os dados sugerem que a família Arcidae não é monofilética.

A ordem Pectinida inclui as superfamílias Anomioidea, Dimyoidea, Limoidea, Pectinoidea e Plicatuloidea. Os resultados sugerem o posicionamento de Limoidea como grupo-irmão de Pectinoidea, assim como sugerido em um estudo prévio (Combosch *et al.*, 2017). Entretanto, esse resultado refuta a ordem Limida *sensu* Bieler *et al.* (2014), composta por Limoidea como grupo-irmão de Pectinoidea, Anomioidea, Dimyoidea e Plicatuloidea (Bieler *et al.*, 2014; Lemer *et al.*, 2016). Entre as famílias atualmente reconhecidas dentro de Pectinida, apenas Propeamussiidae não foi recuperada como monofilética.

Nossas análises corroboram a ordem Ostreida sendo composta pelas superfamílias Ostreoidea, Pinnoidea e Pterioidea, bem como o clado Ostreoidea+Pterioidea (Matsumoto, 2003; Lemer *et al.*, 2016). As relações dos gêneros dentro das respectivas superfamílias

também estão de acordo com propostas anteriores (Tëmkin, 2010; Lemer *et al.*, 2014; Salvi, Macali, & Mariottini, 2014).

A ordem Mytilida compreende apenas a família Mytilidae, que inclui atualmente dez subfamílias e, de acordo com a análise filogenética, está organizada em dois clados. O presente estudo representa um avanço no conhecimento filogenético do grupo, uma vez que análises prévias da família não abrangiam a diversidade do clado ou eram restritas a grupos particulares, como mexilhões de águas profundas e mitilídeos perfuradores (Owada, 2007; Lorion *et al.*, 2013; Liu, Liu, & Zhang, 2018).

A margem do manto em Pteriomorphia representa uma região anatômica de ampla plasticidade fenotípica e complexa evolução, como demonstrado pelos dados obtidos na presente Tese. Por exemplo, órgãos fotorreceptores da margem do manto surgiram ao menos seis vezes de modo independente, exclusivamente em linhagens epifaunais de Pteriomorphia. Ao todo, cinco tipos morfofuncionais de ocelos paliais (Morton, 2008) ocorrem em 11 famílias do clado. Dados a respeito de hábitos de vida também foram analisados, indicando possível associação entre evolução de ocelos e transição para o hábito epifaunal de ocupação de fendas. Além disso, a perda de ocelos ocorreu múltiplas vezes, principalmente em linhagens que adotaram hábitos infaunais ou semi-infaunais. Em conjunto, os dados levantam novas hipóteses para o surgimento e evolução de órgãos fotorreceptores em Bivalvia, fornecendo evidências para explorar padrões evolutivos e ecológicos de fotorrecepção no bentos marinho.

Órgãos sensoriais, células secretoras e distintos conjuntos musculares estão amplamente distribuídos na margem do manto dos bivalves (Yonge, 1983). O presente estudo caracterizou a inervação, musculatura, atividade secretora e ciliação da margem do manto em representantes das principais famílias de Pteriomorphia, possibilitando a inferência de funções associadas às estruturas paliais. Os diferentes tipos de ocelos são responsáveis por fotorrecepção direcional, ou mesmo formação de imagens de baixa resolução, e estão possivelmente associados à comportamentos de fototaxia, posicionamento do corpo no substrato e alarme contra predadores (Nilsson & Bok, 2017). Outras funções sensoriais também estão presentes, principalmente nos tentáculos de Pectinida e Ostreida, que concentram receptores ciliados e inervados. Tentáculos também protegem a abertura da cavidade do manto, principalmente na região inalante dos representantes de Ostreida e Mytilida. Uma grande diversidade de células secretoras está presente nas pregas paliais, principalmente na prega interna, atuando na lubrificação e limpeza da margem do manto.



A integração dos dados filogenéticos, de morfologia comparada e de anatomia funcional permitiram o reconhecimento de padrões evolutivos em Pteriomorphia. Os dados obtidos sugerem a evolução independente de estruturas paliais, como tentáculos, ocelos, e pregas hipertrofiadas, caracterizando ampla ocorrência de convergências evolutivas em diferentes níveis taxonômicos. Por exemplo, tentáculos surgiram em Pteriomorphia de modo independente ao menos quatro vezes na prega interna do manto e duas vezes na prega mediana. Esses resultados evidenciam a plasticidade do corpo dos moluscos bivalves (Giribet, 2008; Wanninger *et al.*, 2008) e demonstram que convergências evolutivas foram frequentes na irradiação do grupo, assim como sugerido por estudos focados em outras características ecológicas e morfológicas (Distel, 2000; Oliver & Holmes, 2006; Alejandrino, Puslednik, & Serb, 2011; Lorion *et al.*, 2013; Li, Ó Foighil, & Strong, 2016; Serb *et al.*, 2017).

O estudo da evolução da margem do manto em conjunto com mudanças nos hábitos de vida também foi fundamental para explorar mais a fundo questões macroecológicas na irradiação de Pteriomorphia. Em Arcida, por exemplo, convergências evolutivas, como perda de ocelos, redução da prega mediana e hipertrofia da prega interna, estão correlacionadas a múltiplas transições para o hábito de vida infaunal. Tais evidências corroboram a importância do reconhecimento de homoplasias para a compreensão da irradiação do grupo (Oliver & Holmes, 2006), além de levantarem novas hipóteses a respeito da diversificação de Pteriomorphia ao longo do Mesozoico (Stanley, 1972; Vermeij, 1977). Em Mytilidae, a evolução convergente de sífões longos em linhagens que substituíram o hábito epifaunal pelo hábito perfurador ou infaunal representa outro exemplo de correlação evolutiva entre fenótipo e ambiente. De modo geral, os resultados obtidos contribuem para a compreensão da evolução de fenótipos similares em resposta a pressões seletivas e condições ecológicas semelhantes (Schluter, 2000; Losos & Mahler, 2010; Losos, 2011), além de fornecer evidências para compreensão de adaptações em invertebrados bentônicos.

## Referências bibliográficas

- Alejandrino A, Puslednik L, Serb JM. 2011. Convergent and parallel evolution in life habit of the scallops (Bivalvia: Pectinidae). *BMC Evolutionary Biology* 11.
- Bieler R, Mikkelsen PM, Collins TM, Glover EA, González VL, Graf DL, Harper EM, Healy J, Kawauchi GY, Sharma PP, Staubach S, Strong EE, Taylor JD, Tëmkin I, Zardus JD, Clark S, Guzmán A, McIntyre E, Sharp P, Giribet G. 2014. Investigating the Bivalve Tree of Life – an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics* 28: 32.
- Combosch DJ, Collins TM, Glover EA, Graf DL, Harper EM, Healy JM, Kawauchi GY, Lemer S, McIntyre E, Strong EE, Taylor JD, Zardus JD, Mikkelsen PM, Giribet G, Bieler R. 2017. A family-level Tree of Life for bivalves based on a Sanger-sequencing approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107: 191–208.
- Combosch DJ, Giribet G. 2016. Clarifying phylogenetic relationships and the evolutionary history of the bivalve order Arcida (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorphia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 298–312.
- Distel DL. 2000. Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in mytilid body plans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 25–33.
- Feng Y, Li Q, Kong L. 2015. Molecular phylogeny of Arcoidea with emphasis on Arcidae species (Bivalvia: Pteriomorphia) along the coast of China: Challenges to current classification of arcoids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85: 189–196.
- Giribet G. 2008. Bivalvia. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. Berkeley: University of California Press, 105–141.
- Giribet G, Wheeler W. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121: 271–324.
- Gonzalez VL, Andrade SCS, Bieler R, Collins TM, Dunn CW, Mikkelsen PM, Taylor JD, Giribet G. 2015. A phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20142332–20142332.
- Lemer S, Buge B, Bemis A, Giribet G. 2014. First molecular phylogeny of the circumtropical bivalve family Pinnidae (Mollusca, Bivalvia): Evidence for high levels of cryptic species diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 11–23.
- Lemer S, González VL, Bieler R, Giribet G. 2016. Cementing mussels to oysters in the pteriomorphian tree: A phylogenomic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20160857.
- Li J, Ó Foighil D, Strong EE. 2016. Commensal associations and benthic habitats shape macroevolution of the bivalve clade Galeommatoidea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20161006.
- Liu J, Liu H, Zhang H. 2018. Phylogeny and evolutionary radiation of the marine mussels (Bivalvia: Mytilidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 126: 233–240.

- Lorion J, Kiel S, Faure B, Kawato M, Ho SYW, Marshall B, Tsuchida S, Miyazaki JI, Fujiwara Y. 2013. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20131243–20131243.
- Losos JB. 2011. Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution* 65: 1827–1840.
- Losos JB, Mahler DL. 2010. Adaptive radiation: the interaction of ecological opportunity, adaptation, and speciation. *Evolution after Darwin: the first 150 years*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Matsumoto M. 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 429–440.
- Morton B. 2008. The evolution of eyes in the Bivalvia: New insights. *American Malacological Bulletin* 26: 35–45.
- Nilsson DE, Bok MJ. 2017. Low-resolution vision – at the hub of eye evolution. *Integrative and Comparative Biology* 57: 1066–1070.
- Oliver PG, Holmes AM. 2006. The Arcoidea (Mollusca: Bivalvia): a review of the current phenetic-based systematics. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 237–251.
- Owada M. 2007. Functional morphology and phylogeny of the rock-boring bivalves *Leiosolenus* and *Lithophaga* (Bivalvia: Mytilidae): a third functional clade. *Marine Biology* 150: 853–860.
- Ozawa G, Shimamura S, Takaki Y, Yokobori S ichi, Ohara Y, Takishita K, Maruyama T, Fujikura K, Yoshida T. 2017. Updated mitochondrial phylogeny of Pteriomorph and Heterodont Bivalvia, including deep-sea chemosymbiotic *Bathymodiolus* mussels, vesicomid clams and the thyasirid clam *Conchocele cf. bisecta*. *Marine Genomics* 31: 43–52.
- Salvi D, Macali A, Mariottini P. 2014. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family Ostreidae based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree (V Ketmaier, Ed.). *PLoS ONE* 9: e108696.
- Schluter D. 2000. *The ecology of adaptive radiation*. Oxford: Oxford University Press.
- Serb JM, Sherratt E, Alejandrino A, Adams DC. 2017. Phylogenetic convergence and multiple shell shape optima for gliding scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Evolutionary Biology* 30: 1736–1747.
- Stanley SM. 1972. Functional morphology and evolution of byssally attached bivalve mollusks. *Journal of Paleontology* 46: 165–212.
- Steiner G, Hammer S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences with particular reference to the Pteriomorpha. *Geological Society, London, Special Publications* 177: 11–29.
- Sun W, Gao L. 2017. Phylogeny and comparative genomic analysis of Pteriomorpha (Mollusca: Bivalvia) based on complete mitochondrial genomes. *Marine Biology Research* 13: 255–268.
- Tëmkin I. 2010. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea). *BMC Evolutionary Biology* 10: 342.
- Vermeij GJ. 1977. The Mesozoic Marine Revolution: Evidence from snails, predators and grazers. *Paleobiology* 3: 245–258.

- Wanninger A, Koop D, Moshel-Lynch S, Degnan BM. 2008. Molluscan evolutionary development. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca* 16.
- Yonge CM. 1983. Symmetries and the role of the mantle margins in the bivalve Mollusca. *Malacological Review* 16: 1–10.

## RESUMO

Nos moluscos da classe Bivalvia, a margem do manto (ou palial) é geralmente organizada em três pregas e representa um ponto chave na compreensão da irradiação evolutiva do grupo e na conquista de novos nichos ecológicos. Na subclasse Pteriomorpha, agrupamento que reúne bivalves como ostras, vieiras e mexilhões, a margem do manto é amplamente diversa. Além disso, algumas linhas de evidência apontam para a associação entre estruturas paliais e diversificação de hábitos de vida, de modo que essa região anatômica representa uma importante fonte de dados para estudos de adaptação e correlação fenótipo-ambiente. A pesquisa desenvolvida investigou a diversidade morfológica da margem do manto em Pteriomorpha, por meio de abordagens comparativas e funcionais, a fim de inferir a evolução dessa região anatômica e testar hipóteses de homologia, convergência e correlação. A metodologia abrangeu: (1) inferência filogenética de Pteriomorpha com base em 187 espécies e até cinco genes; (2) morfologia comparada de 209 espécies utilizando-se espécimes depositados em coleções científicas, levantamento de caracteres chave do manto e emprego de métodos filogenéticos comparativos; e (3) anatomia detalhada da margem do manto em representantes de 12 espécies das principais famílias de Pteriomorpha, que foram coletados e analisados por meio de histologia, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. A análise filogenética de Pteriomorpha indica que o grupo é monofilético e organizado em quatro ordens contidas em dois clados principais (Arcida+Pectinida e Ostreida+Mytilida). A evolução da margem do manto abrange o surgimento de cinco tipos de órgãos fotorreceptores em diferentes linhagens epifaunais, com subsequente perda desses órgãos principalmente em grupos que se tornaram infaunais. Convergências evolutivas foram recorrentes na irradiação dos Pteriomorpha, como é o caso dos tentáculos paliais. Algumas dessas convergências estão correlacionadas a transições para o hábito de vida infaunal, como demonstrado pela hipertrofia da prega interna do manto em representantes de Arcida e Mytilida. A caracterização da inervação, musculatura, atividade secretora e ciliação da margem do manto contribuiu para a compreensão da anatomia funcional das pregas, ocelos, tentáculos, glândulas e demais estruturas associadas. Em suma, os resultados obtidos permitem compreender a evolução da margem do manto em Pteriomorpha associada a mudanças nos hábitos de vida, fornecendo evidências importantes para se explorar questões macroecológicas na irradiação dos bivalves e do bentos marinho como um todo.

**Palavras-chave:** bivalves, convergência evolutiva, filogenia, microscopia, ocelos, tentáculos

## ABSTRACT

The mantle margin in bivalve mollusks typically comprises three folds, being considered a key element in the evolutionary radiation of the class and occupancy of novel ecological niches. In the subclass Pteriomorpha, which includes oysters, scallops, and mussels, the mantle margin is significantly diverse. In addition, several lines of evidence suggest the association between mantle structures and diversification of lifestyles, making the mantle margin a suitable anatomical region for studies focused on adaptations and phenotype-environment correlations. The present investigation evaluated the morphological diversity of the mantle margin in Pteriomorpha, by means of comparative and functional approaches, to infer the evolution of this anatomical region, and test hypotheses of homology, convergence and correlation. The methodology included: (1) phylogenetic inference of Pteriomorpha based on 187 taxa and up to five genes; (2) comparative morphology of 209 species based on observations of archived specimens, survey of key mantle traits and subsequent use of phylogenetic comparative methods; and (3) detailed anatomy of the mantle margin in representatives of 12 species from the most diverse pteriomorphian families, which were collected and analyzed by means of histology, scanning electron microscopy and confocal microscopy. Phylogenetic analyses of Pteriomorpha corroborate its monophyly and indicate it is comprised of four orders divided in two main clades (Arcida+Pectinida and Ostreida+Mytilida). The inferred evolution of the mantle margin suggests the origin of five types of photoreceptor organs in independent epifaunal lineages, with subsequent loss of eyespots mostly in groups that became infaunal. Evolutionary convergences were pervasive in pteriomorphian radiation, as illustrated by multiple gains of mantle tentacles. Some convergences are correlated with transitions to infaunal lifestyles, as demonstrated by the hypertrophy of the inner mantle fold in lineages within Arcida and Mytilida. In addition, the detailed investigation of musculature, innervation, secretory activity and cilia of the mantle margin permitted inferring possible functions performed by mantle folds, eyespots, tentacles, glands and further associated structures. Altogether, the results shed light on the evolution of the mantle margin in Pteriomorpha in association with lifestyle shifts, therefore providing bases to explore macroecological questions in the evolutionary radiation of bivalves and the marine benthos as a whole.

**Keywords:** bivalves, evolutionary convergence, phylogeny, microscopy, eyespots, tentacles