

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Paula Peixoto Vilela

Biblioteca de referência de DNA barcodes de bivalves (Mollusca: Bivalvia) e gastrópodes (Mollusca: Gastropoda) da costa Portuguesa.



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Paula Peixoto Vilela

Biblioteca de referência de DNA barcodes de
bivalves (Mollusca: Bivalvia) e gastrópodes
(Mollusca: Gastropoda) da costa Portuguesa.

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

Trabalho efectuado sob a orientação de
Professor Doutor Filipe José Oliveira Costa

e coorientação da
Doutora Claudia Hollatz

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Paula Peixoto Vilela

Endereço eletrónico: anapaulapvilela@gmail.com Telefone: 919408809

Bilhete de Identidade/Cartão do Cidadão: 14079428

Título da dissertação: Biblioteca de referência de *DNA barcodes* de bivalves (Mollusca: Bivalvia) e gastrópodes (Mollusca: Gastropoda) da costa Portuguesa.

Orientador: Professor Doutor Filipe José Oliveira Costa

Coorientadora: Doutora Claudia Hollatz

Ano de conclusão: 2015

Mestrado em Ecologia

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Queria deixar um especial obrigado ao meu orientador Doutor Filipe Costa, por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar nesta área que sempre me despertou interesse, por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, paciência e apoio na realização desta tese.

À minha coorientadora Doutora Claudia Hollatz, igualmente por todos os conhecimentos transmitidos, por me ter ensinado tudo sobre como trabalhar corretamente no laboratório, pela amizade, paciência e por toda a sua disponibilidade demonstrada durante este ano de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório (Ilisa, Luís, Ana Sofia, Rita, Renata, Jorge, Adriana, Hugo) pela boa disposição que sempre proporcionaram no laboratório, pelos momentos de companheirismo e risada.

Aos meus queridos amigos e amigas (Ana Raquel, Denise, Joana, Mafalda, Zé e a todos os Malotas) um muito obrigado por me terem aturado sempre que o trabalho não corria tão bem e de me tirarem de casa para espairer.

Por último, mas não menos importantes, quero agradecer aos meus pais, por terem feito de mim o que sou hoje, por tudo o que sempre fizeram por mim, por todo o apoio que sempre me deram e por me terem proporcionado esta oportunidade de poder prosseguir com a vida académica e obter o grau de mestre em Ecologia.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional de Factores de Competitividade - COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT "Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)" no âmbito dos projetos FCOMP-01-0124-FEDER-015429. O trabalho desenvolvido no CBMA teve suporte do fundo estratégico UID/BIA/04050/2013. A sequenciação no BIO (Biodiversity Institute of Ontario) foi financiada pelo iBOL (International Barcode of Life Project) através do Canadian Centre for DNA Barcoding, a partir do Ontario Genomics Institute (2008-OGI-ICI-03), Genome Canada, Ontario Ministry of Research and Innovation e pelo Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Biblioteca de referência de *DNA barcodes* de bivalves (Mollusca: Bivalvia) e gastrópodes (Mollusca: Gastropoda) da costa Portuguesa

Resumo

Os moluscos são um dos grupos mais diversos da vida marinha, e apresentam um papel importante nos sistemas ecológicos e na economia. No presente estudo, o nosso objetivo é contribuir para a implementação de uma biblioteca de referência de *DNA barcodes* para gastrópodes e bivalves estuarinos e marinhos da costa Portuguesa. Esta biblioteca de referência pode melhorar significativamente o processo de descoberta de espécies e na monitorização da biodiversidade através da implementação da abordagem do *DNA barcoding*. Os métodos taxonómicos tradicionais têm sido aplicados à identificação de espécies baseando-se unicamente em características morfológicas, o que se torna muitas vezes difícil e demorado. Neste contexto, a aplicação do *DNA barcodes* (isto é, sequências do gene da sub-unidade I do citocromo c oxidase - COI-5P) mostrou ser útil na determinação de espécies em vários *taxa*. Este trabalho iniciou a biblioteca de referência para espécies de gastrópodes e bivalves, compreendendo um total de 260 sequências de *DNA barcodes*, incluindo 156 sequências COI-5P geradas noutros projetos do nosso grupo de pesquisa. A este conjunto de dados foram adicionadas 104 sequências de COI-5P de bases de dados públicas (GenBank e BOLD) de espécies taxonómicamente próximas. Os valores médios das divergências intraespecíficas, congénicas e confamiliares obtidas do nosso conjunto de dados foram 1,24% (0 a 29,8%), 8,91% (0,2 a 37,7%) e 14% (0 a 32,3%), respetivamente. Foram produzidos pela primeira vez *DNA barcodes* para cinco espécies (*Calliostoma virescens*, *Cingula trifasciata*, *Gibbula delgadensis*, *Jujubinus pseudogravinae* e *Mitra cornea*) e uma sub-espécie (*Tricolia pullus azorica*) de gastrópodes e para uma espécie de bivalve (*Gari fervensis*). Nos fenogramas construídos pelo método *Neighbor-Joining* 86% das espécies, com pelo menos dois espécimes, agruparam congruentemente em clados monofiléticos e com elevado grau de suporte. As 47 morfoespécies presentes neste estudo foram atribuídas a 53 BINs, que após revisão compreenderam, 44 BINs concordantes, 5 BINs discordantes e 4 singletons. O sistema de classificação foi aplicado à nossa biblioteca de referência, 64% das espécies apresentaram-se congruentes e concordantes externamente. Este trabalho confirmou a eficácia do *DNA barcodes* na identificação de espécies de bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa. Não obstante, foram detetadas algumas ambiguidades taxonómicas, assim como divergências genéticas consideráveis em alguns *taxa*, o que indica a necessidade de futuras revisões taxonómicas nestes grupos.

Palavras-Chave: *DNA barcodes*, COI-5P, Bivalves, Gastrópodes, Portugal

Reference library of DNA barcodes of bivalves (Mollusca: Bivalvia) and gastropods (Mollusca: Gastropoda) from Portuguese coast

Abstract

The molluscs are one of the most diverse groups of the marine life, playing important roles in ecological systems and the economy. In the present study, we aimed to contribute to the implementation of a reference library of DNA barcodes for estuarine and marine gastropods and bivalves of the Portuguese coast. This reference library can significantly improve processes of species discovery and biodiversity monitoring through the implementation of the DNA barcoding approach. Traditional taxonomic methods have been applied to species identification relying solely on morphological characters, which are often time-consuming and difficult. In this context, the application of DNA barcodes (i.e. sequences of the cytochrome *c* oxidase I gene -COI-5P) has shown to be greatly useful to help delimiting species in several taxa. This work started a reference library for gastropod and bivalve species, comprising a total of 260 DNA barcode sequences, including 156 COI-5P sequences generated in other projects of our research group. To this dataset, 104 COI-5P sequences of taxonomically close species were added from public databases (GenBank and BOLD). The mean values of intraspecific, congeneric and confamilial divergences obtained from our dataset were 1.24% (0 to 29.8%), 8.91% (0.2 to 37.7%) and 14% (0 to 32.5%), respectively. DNA barcodes were produced for the first time for five species (*Calliostoma virescens*, *Cingula trifasciata*, *Gibbula delgadensis*, *Jujubinus pseudogravinae* and *Mitra cornea*) and one sub-species (*Tricolia pullus azorica*) of gastropods and for one bivalve species (*Gari fervensis*). In the phenograms built with the *Neighbor-Joining* method, 86% of the species with at least two specimens grouped congruently in monophyletic clades with a high degree of support. The 47 morpho-species in this study were attributed to 53 BINs which after revisions comprised 44 concordant BINs, 5 discordant BINs and 4 singletons. The application of a ranking system to the barcodes yield over 64% with top taxonomic congruence. This study indicate the efficacy of DNA barcodes in the identification of the majority of bivalves and gastropods species in the Portuguese coast. Nonetheless, some taxonomic ambiguities were detected, as well as considerable genetic divergence in a few *taxa*, indicating that further taxonomic revision are still needed in those groups.

Keywords: DNA barcodes, bivalves, gastropods, COI-5P, Portugal

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1 Diversidade e distribuição de bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa.....	1
1.2 Conceito: Significado e Aplicação dos <i>DNA barcodes</i>	3
1.3 Objetivos.....	6
2. Materiais e Métodos.....	7
2.1 Procedimento Geral.....	7
2.2 Colheita, Identificação e Processamento de Espécimes.....	8
2.3 Análises Moleculares.....	9
2.3.1 Extração de <i>DNA</i>	9
2.3.2 Amplificação e Sequenciação de <i>DNA barcodes</i>	9
2.4 Tratamento e análise de dados.....	11
2.4.1 Edição de cromatogramas e alinhamento das sequências geradas.....	11
2.4.2 Cálculo de distâncias genéticas e construção de fenogramas.....	11
2.4.3 Ferramentas de análise e de categorização de <i>DNA barcodes</i> da BOLD.....	12
3. Resultados.....	14
3.1 Compilação da biblioteca de referência.....	14
3.2 Divergências moleculares intra e interespecíficas.....	15
3.3 Fenogramas de <i>DNA barcodes</i>	16
3.4 Análise de incongruências nos BINs e categorização dos <i>DNA barcodes</i>	21
4. Discussão.....	22
5. Conclusão.....	29
6. Referências bibliográficas.....	30
7. Anexos.....	37

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema simplificado da metodologia global utilizada no <i>DNA barcodes</i>	7
Figura 2 - Locais de recolha dos espécimes de bivalves e gastrópodes utilizados para a construção da biblioteca de referência.....	8
Figura 3 - Fenograma NJ compactado obtido pela análise de 260 sequências de COI-5P de gastrópodes e bivalves da costa Portuguesa em conjunto com as sequências públicas do GenBank, obtida com recurso ao modelo K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas. Os asteriscos representam as sequências obtidas neste estudo.....	17
Figura 4 – Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies <i>Littorina saxatilis</i> , <i>Littorina compressa</i> e <i>Littorina arcana</i> com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.	19
Figura 5 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies <i>Littorina obtusata</i> e <i>Littorina fabalis</i> com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.....	19
Figura 6 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies <i>Ocenebrina edwardsii</i> , <i>Ocenebrina hispidula</i> , <i>Ocenebrina nicolai</i> e <i>Ocenebrina leukos</i> com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.	19
Figura 7 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies <i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> e <i>Mytilus</i> sp. com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.	20
Figura 8 – Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P da espécie <i>Parvicardium exiguum</i> com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.	20
Figura 9 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P da espécie <i>Ruditapes decussatus</i> com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise <i>bootstrap</i> a partir de 1000 réplicas.....	20

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Lista dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos COI-5P e das condições da reação de PCR correspondentes.	10
Tabela 2 – Critérios de classificação de <i>DNA barcodes</i> baseado em Costa <i>et al.</i> (2012), modificado por Lobo <i>et al.</i> (2015).....	12
Tabela 3 – Distâncias intra e interespecíficas das espécies de gastrópodes e bivalves, géneros e famílias analisadas neste estudo, calculadas com o modelo de substituição nucleotídica K2P.	16
Tabela 4 – Resumo do número de BINs e registos taxonomicamente concordantes, discordantes e com apenas um membro (<i>singleton</i>). Dos 156 registos da biblioteca, 155 tiveram a atribuição de um BIN, correspondentes a um total de 53 BINs.	21

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

µl - microlitro

µM – micromol

AU – Austrália

BIN- *Barcode Index Number*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BOLD – *Barcode of Life Data System*

CA – Canadá

CH – China

COI-5P – Extremidade 5' da subunidade I do citocromo c oxidase

CR – Croácia

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dNTPs - *deoxyribonucleotide triphosphates*

DUI – *Doubly uniparental inheritance*

ES – Espanha

EUA – Estados Unidos da América

FR – França

GR – Grécia

IS – Islândia

IT – Itália

J – Japão

K2P – Kimura-2-Parâmetros

MA – Malta

MM – Mar Mediterrâneo

mM – milimol

MN – Mar do Norte

MR – Marrocos

ND – Não disponível

mV – milivolt

NJ – Neighbor-Joining

OTU – Unidade Taxonómica Operacional

PB - Pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PT – Portugal

RU – Reino Unido

S - Suécia

TA – Tailândia

TR – Turquia

TU – Tunísia

WoRMS - *World Register of Marine Species*

1. Introdução

1.1 Diversidade e distribuição de bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa

O filo Mollusca contem cerca de 103 824 espécies válidas (ou 124 039 *taxa*), de acordo com o World Register of Marine Species (WoRMS; <http://www.marinespecies.org>) (Setembro 2015), representando um dos grupos mais diversos e amplamente distribuídos do ambiente marinho (Rueda *et al.*, 2009). Os moluscos são importantes componentes das comunidades estuarinas, devido à sua importância ecológica, enorme abundância, baixa mobilidade e consequentemente, facilidade de coletar. Representam por isso organismos ideais na biomonitorização de diferentes ecossistemas (Bresler *et al.*, 2003; Feldstein *et al.* 2003). Os moluscos possuem também uma grande importância económica, sendo altamente explorados e utilizados como recurso alimentar em Portugal (Gaspar *et al.*, 2003). Aproximadamente 1600 espécies de moluscos marinhos estão descritas para Portugal Continental (Macedo *et al.*, 1999).

Do ponto de vista biológico, os estuários são considerados um dos ecossistemas mais produtivos, representando áreas vitais de alimentação e reprodução para muitas espécies animais (Lyra, 2007). No entanto, esta zona tem sido sujeita a múltiplas pressões associadas maioritariamente ao despejo de resíduos, exploração de recursos naturais e atividades recreativas (McLusky & Elliott, 2004). A correta gestão dos ecossistemas marinhos é uma questão que parece ganhar mais ímpeto com a aplicação da Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 Outubro de 2000, a qual estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, que exige a elaboração de planos de gestão das bacias hidrográficas para cada região hidrográfica, a fim de se atingir um bom estado ecológico e químico, e que contribuirá para a atenuação dos efeitos das inundações. Deste modo, o conhecimento da sua biodiversidade pode auxiliar nesta tarefa, no entanto a identificação das espécies deste grupo com base em caracteres morfológicos aliada ao baixo número de taxonomistas especializados atrasa e torna difícil a disponibilidade deste conhecimento.

Um dos desafios para os taxonomistas tradicionais, por exemplo, é a identificação de diferentes fases de vida de espécies com histórias de vida complexas, em particular para os invertebrados marinhos, onde se incluem os moluscos, que sofrem metamorfoses pronunciadas ao longo de um ou mais estádios larvares (Puillandre *et al.*, 2009). A presença de taxas elevadas de espécies crípticas e de plasticidade fenotípica, bem como a variabilidade genética dos caracteres empregados para o reconhecimento de

espécies e a degradação dos espécimes são outros fatores que impedem a correta identificação de espécies através de abordagens morfológicas (Drent *et al.*, 2004; Marko & Moran, 2009).

O filo Mollusca divide-se em oito classes (Bivalvia, Cephalopoda, Gastropoda, Monoplacophora, Polyplacophora e Scaphopoda) baseadas na análise filogenética das características morfológicas (Gosling, 2015), sendo que a presente tese incidirá nas duas classes mais diversas (contendo >95% das espécies de moluscos), porém pouco conhecidas, Gastropoda e Bivalvia (figura com exemplares no Anexo 4/Figura F1).

Os gastrópodes são a maior e mais diversa classe de todos os moluscos (Bouchet, 2006; Zapata *et al.*, 2014; Gosling, 2015), e incluem as lapas, caracóis e lesmas terrestres. Um total entre 32.000 e 40.000 espécies de gastrópodes foram descritas para o ambiente marinho, mas acredita-se que esta estimativa represente entre 23 e 32% do total de espécies marinhas descritas (Appeltans *et al.*, 2012). Em Portugal estão referenciadas cerca de 1200 espécies de gastrópodes (Borges, 2007). Este grupo é conhecido pela sua capacidade de adaptar a morfologia da sua concha aos diferentes ambientes em que se encontram (Solas *et al.*, 2015), apresentando uma impressionante diversidade fenotípica. Apesar de ser um grupo bem estudado (Smith *et al.*, 2011), a sua taxonomia, bem como as suas relações sistemáticas e evolutivas ainda são pouco conhecidas (Donald *et al.*, 2012, Zapata *et al.*, 2014). Além disto, a identificação e a classificação das espécies desta classe ainda é fortemente baseada em caracteres morfológicos como a concha, opérculo e rádula (Barco *et al.*, 2010). Esta classe apresenta grande importância quer a nível económico e ecológico, pois são utilizados como fonte de alimentação, por exemplo, a tradição do uso de patelas na culinária em alguns locais das Astúrias, no norte de Espanha (Borrel *et al.*, 2010), são bons indicadores de qualidade ambiental e funcionamento dos ecossistemas (Radulovici *et al.*, 2010). Espécies do género *Nassarius* constituem um bom exemplo, são necrófagos que contribuem na manutenção do equilíbrio do ecossistema e das comunidades bentónicas (Zou *et al.*, 2012).

Os bivalves são a segunda maior classe dos moluscos, com cerca de 9200 espécies, caracterizam-se por apresentarem uma concha formada por duas valvas, pé reduzido e a perda da rádula, sendo organismos filtradores. Ocorrem tanto em ambientes marinhos, como de água-doce, habitando costões rochosos, praias arenosas e regiões profundas dos oceanos. Esta classe inclui por exemplo, os mexilhões, ostras, vieiras e amêijoas (Gosling, 2015). Apresentam estados adultos sésseis e têm tipicamente, longos estágios larvares, características que são úteis para estudar as interações das circulações marinhas (Cordero *et al.*, 2014). Os bivalves são amplamente utilizados como bioindicadores da qualidade do ambiente marinho e estuarino (Sheehan & Power, 1999). Muitas espécies são

exploradas comercialmente em Portugal, como mexilhões e ostras, principalmente nas zonas costeiras, incluindo estuários e lagoas costeiras (Leitão *et al.*, 2014). Até recentemente, a distribuição dos bivalves foi baseada apenas nas características morfológicas da concha. Com o advento dos marcadores moleculares, a distribuição geográfica de muitos bivalves teve que ser revista (Gosling, 2015). Num estudo recente sobre a diversidade e distribuição de moluscos bênticos em Portugal, Martins *et al.* (2014) encontrou 169 *taxa*, sendo a maior parte representada pelos bivalves (62%). Entretanto, os estudos sobre a diversidade de moluscos e gastrópodes para o ambiente marinho são ainda muito incipientes comparativamente ao estudo destas mesmas classes em água-doce (Bogan, 2008; Strong *et al.*, 2008).

A costa portuguesa representa uma área de particular interesse ecológico e biogeográfico (Saldanha, 1995), uma vez que está situada numa zona de contacto entre as águas quentes provenientes do norte da África e Mediterrâneo e as águas frias vindas do norte do Atlântico (Fiúza, 1983). Além disto a costa portuguesa é formada por diferentes desfiladeiros (Oliveira *et al.*, 2007), apresentando diversos tipos de sedimentos (Martins *et al.*, 2012) e condições hidrodinâmicas (Bettencourt *et al.*, 2004), o que indica a probabilidade de uma fauna diversa.

Esta diversidade torna os estuários portugueses um ponto ideal para contribuir para o enriquecimento de uma biblioteca de referência *de DNA barcodes* para gastrópodes e bivalves, que poderá ser usada futuramente em estudos de biomonitorização em grande escala com recurso de técnicas de sequenciação de alto débito. Para tal, será primeiro necessário validar e construir a respetiva biblioteca de referência e confrontar os dados gerados com os dados baseados na morfologia.

1.2 Conceito: Significado e Aplicação dos *DNA barcodes*

No campo da taxonomia a morfologia é o fator chave para descrever e nomear espécies, mas esta abordagem pode ser alvo de subjetividades e limitações, pois cabe a cada taxonomista escolher os caracteres morfológicos para delinear as espécies (Radulovici *et al.*, 2010). As dificuldades apresentadas na identificação correta de uma espécie devem-se por exemplo, à presença de plasticidade fenotípica e variabilidade genética nos caracteres usados para a identificação destas. Além disto, o recurso a chaves dicotômicas incompletas, que muitas vezes são eficazes apenas para determinado estágio de vida dos organismos ou género (Hebert *et al.*, 2003). De um modo geral, a ausência de um conceito universal para o reconhecimento de espécies que inclua toda a complexidade e diversidade biológica tem levado a uma fragmentação da comunidade taxonómica científica (Costa & Antunes, 2012).

A taxonomia tradicional baseada nos caracteres morfológicos aliada ao advento de métodos moleculares baseados na análise de sequências de *DNA*, podem apresentar grandes vantagens quando utilizados como ferramentas taxonômicas. As sequências de *DNA* apresentam um conjunto de caracteres universais que permitem a comparação direta entre diversos organismos, o que facilita a validação e verificação entre os especialistas na comunidade científica (Costa & Antunes, 2012). Além disto, possibilitam o estudo de espécies crípticas (semelhantes morfológicamente, mas distintas geneticamente), e torna possível a identificação de espécimes degradados e de organismos em diferentes estágios do seu ciclo de vida (Costa & Antunes, 2012). Devido a todas estas dificuldades, a abordagem taxonômica tradicional baseada na morfologia torna-se ultrapassada e pouco eficaz na identificação de diversos *taxa*.

Como forma de solucionar estes problemas relacionados com a identificação de organismos, Hebert *et al.* (2003) propôs um novo sistema de identificação, baseado em sequências relativamente curtas, de uma zona padronizada do genoma: o *DNA barcodes*. No caso dos animais, o *DNA barcodes* é composto por cerca de 650 pb e localiza-se na extremidade 5' da subunidade I do citocromo c oxidase (COI-5P) do *DNA* mitocondrial (*mtDNA*). O gene do citocromo oxidase 1 (COI) tem duas vantagens que merecem destaque. A primeira é que os *primers* universais para este gene são bastante robustos, permitindo a “recolha” do gene, de representantes da maioria ou até mesmo de todos os filos animais (Folmer *et al.*, 1994). A segunda razão é que o COI parece possuir um sinal filogenético de maior gama quando comparado com qualquer outro gene mitocondrial. Tal como outros genes codificadores de proteínas, a terceira posição dos nucleótidos num codão mostram uma alta incidência de substituições de bases, levando a uma taxa de evolução molecular três vezes maior do que os genes ribossomais 12S ou 16S (Knowlton & Weigt, 1998). A evolução do COI é rápida o suficiente para permitir não só a distinção entre espécies, mas também de grupos filogenéticos dentro da mesma espécie (Cox & Hebert, 2001; Wares & Cunningham, 2001).

Este novo sistema de identificação tem sido aplicado a todos os grandes grupos de organismos eucariotas, como é o caso dos animais (Hebert *et al.*, 2004), plantas (Li *et al.*, 2015; Bruni *et al.*, 2015), macroalgas (Milstein & Saunders, 2012, Du *et al.*, 2015), fungos (Stockinger *et al.*, 2010) e bactérias (Sogin *et al.*, 2006).

Para a vida marinha, o *DNA barcodes* tem múltiplas aplicações, como é o caso da identificação de larvas, espécies invasoras, espécies crípticas, novas espécies, comércio ilegal ou espécies protegidas, gestão de *stocks* pesqueiros, avaliação da biodiversidade, monitorização dos ecossistemas, revisões de

alguns *taxa*, inferência das relações filogenéticas, padrões de especiação entre outros (Radulovici *et al.*, 2010; Van Der Bank *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2008).

O sucesso da implementação e utilização do *DNA barcode* como um sistema global na identificação das espécies é dependente da densa representação de diversos *taxa* e esta simplificação será a vantagem primária de enormes esforços de sequenciação de um gene (Schander & Willassen, 2005). Deste modo, a criação de bibliotecas de referência de *DNA barcodes* permitirá diagnosticar uma espécie com base no seu *DNA barcode* ou conjunto de *DNA barcodes* (Costa & Antunes, 2012), permitindo a catalogação de espécies de maneira mais rápida e eficiente, reduzindo possíveis ambiguidades, que poderá no futuro dar-nos dados mais rigorosos sobre a diversidade de espécies. Esta acessibilidade das informações permite ainda a realização de estudos ecológicos mais aprofundados, a comparação de resultados ecológicos e a implementação de programas de monitorização ambiental.

Como qualquer método, o *DNA barcodes* apresenta também algumas limitações, tendo baixa resolução em alguns casos de hibridização, espécies divergentes recentes, espécies complexas ou grupos em evolução lenta, e a presença de pseudogenes (Radulovici *et al.*, 2010). Após a avaliação da precisão de *DNA barcodes* na identificação de *taxa* de interesse, os dados podem então ser aplicados a estudos de conservação, filogeografia, ecologia, biogeografia e em muitos outros campos (Mitchell, 2008).

DNA barcodes tem sido utilizado com sucesso em estudos envolvendo gastrópodes e bivalves, ajudando a solucionar dificuldades resultantes da identificação de espécies baseadas apenas nas suas características morfológicas (Barco *et al.*, 2013a; Jennings *et al.*, 2010; Puillandre *et al.*, 2009; Nuryanto *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2007). Começam já a existir alguns estudos que construíram bibliotecas de referência para alguns organismos marinhos, como por exemplo, para as poliquetas (Lobo *et al.*, 2015), moluscos (Layton *et al.*, 2014; Barco *et al.*, 2015), entre outros. A utilização de *DNA barcodes* proporcionou um significativo aumento de sequências representando muitas espécies de moluscos. Em 2011 estavam disponíveis 4,813 barcodes para moluscos marinhos (Bucklin *et al.*, 2011), representando 3 a 3,5% do número estimado de espécies vivas de moluscos marinhos (Appeltans *et al.*, 2012). Em 2015, o número de espécies de moluscos com barcodes disponíveis é de 10,894 (dados retirados da BOLD a 21 de Outubro de 2015), número que inclui espécies marinhas, terrestres e de água doce.

1.3 Objetivos

A presente tese teve por objetivo global a construção de uma biblioteca de referência de *DNA barcodes* (COI-5P) de bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa. A biblioteca de referência constituirá um recurso importante para a identificação de gastrópodes e bivalves das zonas costeiras portuguesas, pois permitirá que a sua catalogação seja feita com maior rapidez e precisão, a investigação da biodiversidade destes organismos, cadeias tróficas, biomonitorização, integração em plataformas de sequenciação de alto débito em conjunto com outros *taxa* dominantes no macrobentos. Pretende-se com esta biblioteca de referência facilitar futuras identificações taxonómicas destes organismos, contribuindo significativamente para um melhor conhecimento acerca das comunidades, que ainda se encontram pouco estudadas, permitindo desta forma acelerar o processo de catalogação e facilitar o reconhecimento de espécimes de gastrópodes e bivalves.

Os objectivos específicos deste estudo são:

- Rever o inventário de espécies da costa Portuguesa, clarificando incertezas e ambiguidades taxonómicas;

- Comparar as unidades taxonómicas operacionais evidenciadas pela análise de dados moleculares, com as estabelecidas com base no atual conhecimento taxonómico;

Deste modo, o estudo irá contribuir para criar um novo sistema de identificação de espécies, mais simples, mais eficiente e rápido, tendo a vantagem de ser menos dispendioso, e podendo ainda aumentar as possibilidades de monitorização.

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projecto BestBarcode (PTDC/MAR/113435/2009), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia. O conjunto dos dados aqui analisados e discutidos consiste numa combinação de resultados originados a partir das três fontes principais: a) dados gerados no âmbito desta tese e devidamente identificados no Material e Métodos e Resultados b) sequências publicadas e compiladas a partir do GenBank e c) sequências geradas pela parceria entre equipas do CBMA / Universidade do Minho, do IMAR / Universidade Nova de Lisboa, do Instituto Português de Malacologia / Universidade Lusófona e do CIBIO / Universidade dos Açores, que foram entretanto integradas num artigo científico submetido para publicação:

Borges LMS, Hollatz C, Lobo J, Cunha AM, Vilela AP, Calado G, Coelho R, Costa AC, Ferreira MSG, Costa MH, Costa FO (in press). With a little help from DNA barcoding: investigating the diversity of Gastropoda from the Portuguese coast. Scientific Reports.

2. Materiais e Métodos

2.1 Procedimento Geral

A metodologia global de criação de bibliotecas de referência de *DNA barcodes* encontra-se esquematizada na figura 1 (segue-se breve descrição da metodologia).

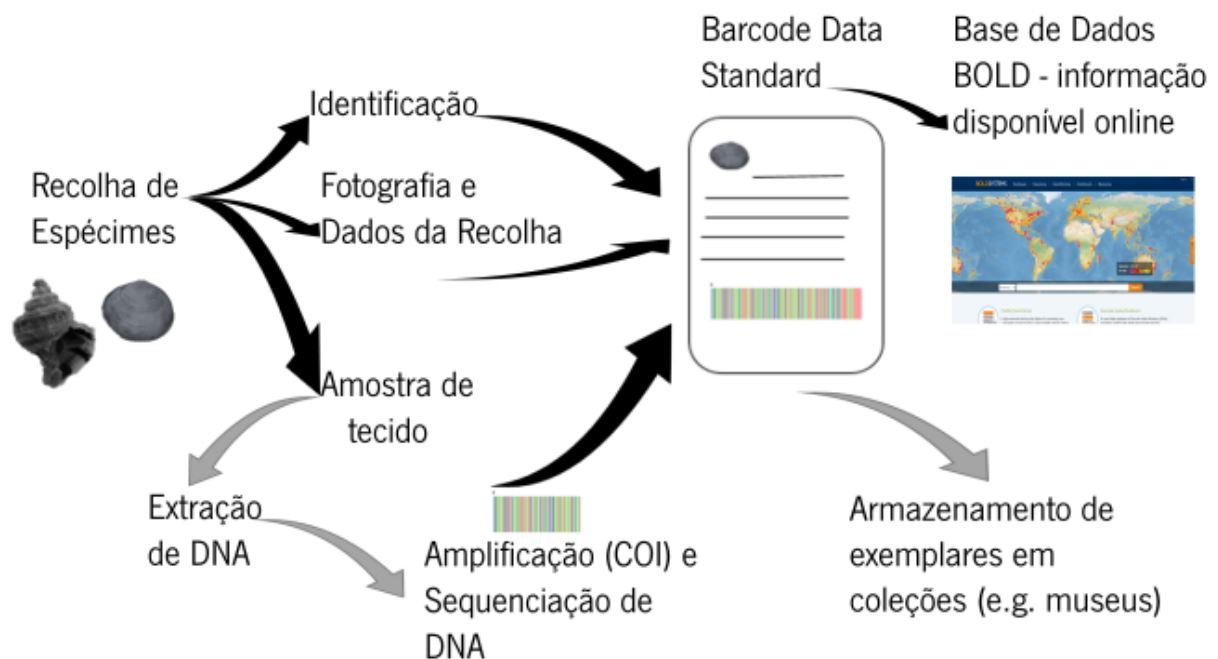


Figura 1 - Esquema simplificado da metodologia global utilizada no *DNA barcodes*.

Neste estudo foram investigados espécimes de moluscos recolhidos ao longo da costa Portuguesa, com particular incidência nas classes Gastropoda e Bivalvia. O processo inicia-se com a colheita de espécimes dos grupos alvos ao longo da costa Portuguesa. Após a colheita é necessário realizar a identificação dos organismos com base nas características morfológicas, com recurso a chaves taxonómicas especializadas (por exemplo, Hayward & Ryland 2008 e Gibson *et al.*, 2001). Todas as informações recolhidas sobre os organismos são organizadas em tabelas padronizadas, incluindo detalhes dos espécimes, taxonomia e local da colheita, juntamente com as fotografias dos exemplares e anotações pertinentes, para posteriormente serem submetidos à base de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). Os passos iniciais da colheita, identificação e processamento dos espécimes foram realizados no âmbito de estudos do grupo de Biodiversidade e Ecologia Molecular do CBMA. A informação

associada a estes espécimes encontra-se organizada em projetos específicos na base de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007).

A extração de *DNA* é realizada usando um kit de extração específico para moluscos (E.Z.N.A.® Mollusc da OMEGA Bio-Tek). A amplificação das amostras é feita por meio de PCR (Polymerase Chain Reaction), incidindo sobre um fragmento com cerca de 658 pares de bases da extremidade 5' do gene da subunidade I da enzima citocromo c oxidase (COI-5P), que se localiza no *DNA* mitocondrial. As reações de PCR são realizadas com recurso a diferentes *primers*, de forma a garantir a amplificação de todas as espécies. O sucesso das amplificações é verificado através de eletroforese em gel de agarose, e sendo os produtos resultantes enviados para sequenciação num fornecedor de serviços externos, após purificação pelo método EXOSAP.

Após a edição e alinhamento das sequências de *DNA*, realizados no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), estas serão submetidas a pesquisa de sequências similares em bases de dados públicas como o GenBank através do algoritmo BLAST e BOLD.

2.2 Colheita, Identificação e Processamento de Espécimes

No âmbito de estudos anteriores do grupo de Biodiversidade e Ecologia molecular do CBMA foram realizadas diversas campanhas de amostragem ao longo da costa Portuguesa, lagoas costeiras e estuários, com particular incidência em Viana do Castelo, estuário do Lima, ria de Aveiro e estuário do Sado, Açores, entre outros (figura 2, Anexo2/Tabela T1).



Figura 2 - Locais de recolha dos espécimes de bivalves e gastrópodes utilizados para a construção da biblioteca de referência.

As amostragens foram realizadas usando diferentes metodologias, incluindo a colheita manual e a utilização corers. No último caso, as amostras de sedimento foram recolhidas com a ajuda de um corer com 110 mm de diâmetro, tendo sido peneiradas com a ajuda de um crivo de 0,5 mm e transportadas para o laboratório sob condições de refrigeração. Em laboratório, os organismos são individualizados em tubos de plástico, fotografados e preservados em etanol absoluto, sendo que todos os tubos devem estar devidamente identificados com códigos, para não ocorrerem trocas de organismos. Cada espécime é identificado morfológicamente ao nível da espécie ou ao nível taxonómico mais baixo possível, utilizando uma lupa binocular com o auxílio de chaves taxonómicas e de literatura especializada (por exemplo, Hayward & Ryland 2008 e Gibson *et al.*, 2001). Além da classificação taxonómica, os metadados associados a cada espécime, tais como as coordenadas geográficas do local de amostragem, data de recolha, profundidade e outras anotações do local de colheita, foram inseridos numa tabela de campos padronizados e posteriormente submetidos à base de dados BOLD. A cada espécime foi atribuído um número de registo único, ao qual se encontra associada a informação recolhida, assim como as fotografias, sequências COI-5P e respetivos cromatogramas.

2.3 Análises Moleculares

2.3.1 Extração de *DNA*

Para a extração de *DNA* dos organismos usou-se um kit específico para moluscos, E.Z.N.A.® (Mollusc da OMEGA Bio-Tek), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (Anexo 1), utilizando para isso todo o organismo ou uma porção, dependendo do tamanho do mesmo.

2.3.2 Amplificação e Sequenciação de *DNA barcodes*

Após a obtenção do extrato, realizou-se a amplificação, por meio de PCR, incidindo sobre um fragmento com cerca de 658 pares de bases da extremidade 5' do gene da subunidade I da enzima citocromo c oxidase (COI-5P), que se localiza no *DNA* mitocondrial.

As reações de PCR apresentam 2,5 µl de tampão de PCR (10x), 2,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,50 µl de dNTP's (10 mM), 1,5 µl de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM), 0,2 µl de *Taq polymerase* Thermo Scientific™ (5U/µL), 2-8 µl de extrato de *DNA* e água ultrapura até perfazer um volume total de 25 µl. Os conjuntos de *primers* utilizados neste estudo para amplificar o segmento de 658 pb do gene

COI foram: Lobo F1/Lobo R1, dgLCO-1490/dgHCO-2198, LCO1490/HCO2198 e PolyLCO/PolyHCO. As sequências e o ciclo térmico utilizado para cada par de *primers* encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos COI-5P e das condições da reação de PCR correspondentes.

Primer	Sequência 5'-3'	Condições da Reação de PCR	Referência
Lobo F1/ Lobo R1	F - KBTCHACAAAYCAYAARGAYATHGG R - TAAACYTCWGGRTGWCCRAARAAYCA	94°C 60" 1 ciclo 94°C 30" / 5°C 90" / 72°C 60" 5 ciclos 94°C 30" / 54°C 90" / 72°C 60" 45 ciclos 72°C / 5' 1 ciclo	Lobo <i>et al.</i> 2013
dgLCO- 1490/ dgHCO- 2198	F - GGTCACAACAAATCATAAAGAYATYGG R - TAACTTCAGGGTGACCAARAAYCA	94°C 60" 94°C 30" / 45°C 40" / 72°C 60" 5 ciclos 94°C 30" / 51°C 40" / 72°C 60" 35 ciclos 72°C / 10' 1 ciclo	Meyer 2003
LCO1490/ HCO2198	F - GGTCACAACAAATCATAAAGATATTGG R - TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	94°C 60" 94°C 30" / 45°C 90" / 72°C 60" 5 ciclos 94°C 30" / 51°C 90" / 72°C 60" 35 ciclos 72°C / 7' 1 ciclo	Folmer <i>et al.</i> 1994
PolyLCO/ PolyHCO	F - GAYTATWTTCAACAAATCATAAAGATATTGGT R - TAMACTTCWGGGTGACCAARAATCA	94°C 60" 94°C 40" / 45°C 40" / 72°C 60" 5 ciclos 94°C 40" / 51°C 40" / 72°C 60" 35 ciclos 72°C / 7' 1 ciclo	Carr <i>et al.</i> 2011

O sucesso da amplificação foi verificado através da eletroforese dos produtos de PCR a 90 V durante 30 minutos em gel de agarose 1%, corado com GreenSafe (NZYTech).

Os produtos de PCR que após a eletroforese apresentaram bandas claras e bem definidas, foram purificados por método de EXOSAP, com a adição de 0,5 µl de exonuclease (New England Biolabs) e 1 µl de fosfatase alcalina (Promega), e submetidos a temperaturas de 37°C durante 15 minutos e 85°C por 15 minutos, sendo depois enviados para um fornecedor externo de serviços de sequenciação (STABVida).

2.4 Tratamento e análise de dados

2.4.1 Edição de cromatogramas e alinhamento das sequências geradas

Todos os cromatogramas das sequências *forward* e *reverse* foram cuidadosamente editados individualmente utilizando o programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), com o intuito de remover zonas elegíveis, remover a região correspondente aos primers e ainda verificar bases ambíguas. As sequências foram verificadas de forma a se poder detetar possíveis pseudogenes mitocondriais nucleares (numts) (Song *et al.*, 2008), nomeadamente através da análise da qualidade dos cromatogramas e da tradução das sequências, para detetar possíveis desvios na grelha de leitura e eventuais codões stop ou inserções e deleções. Após todas as sequências serem editadas, foram alinhadas através da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Por fim, as sequências foram submetidas a pesquisa de sequências similares em bases de dados públicas GenBank (Benson *et al.*, 2005) realizando BLASTn (Altschull *et al.*, 1990) e na base de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007), para uma melhor classificação e despiste de eventuais ambiguidades.

Todos os espécimes de moluscos da costa de Portugal utilizados para a construção da biblioteca de referência de *DNA barcodes* desta tese, juntamente com o nome da espécie, ordem, família encontram-se na tabela do anexo 2.

2.4.2 Cálculo de distâncias genéticas e construção de fenogramas

As distâncias genéticas entre os pares de sequências podem ser avaliadas a diferentes níveis taxonómicos (divergência intra e inter-específica, congénica e confamiliar) (Costa *et al.*, 2012) e que traduzem os padrões de variabilidade genética das sequências de *DNA barcodes*, foram calculadas utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980).

A construção do fenograma com todas as sequências de *DNA barcodes* foi baseada no modelo de substituição nucleotídica Kimura-2- parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987), ambos implementados no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). O grau de suporte dos nós das árvores foi determinado pelo método *bootstrap*, onde se efetuaram 1000 réplicas de *bootstrap*. Este modelo foi escolhido por ser o mais utilizado em estudos similares, permitindo assim a comparação direta de resultados.

2.4.3 Ferramentas de análise e de categorização de *DNA barcodes* da BOLD

O algoritmo BIN – *Barcode Index Number* é uma ferramenta de categorização de espécies implementada na BOLD (BINs; Ratnasingham & Hebert, 2013). A atribuição de uma sequência de *DNA barcode* a um determinado BIN é feita com base na divergência entre as sequências, apenas sequências com pelo menos 500 pb e contendo menos de 1% de bases ambíguas são aceitas na análise. Estas sequências correspondem na prática a Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU – *Operational Taxonomic Units*). No entanto, em abordagens semelhantes, onde os organismos são categorizados baseados na similaridade das suas sequências, utiliza-se o critério de Unidade Operacional Taxonômica Molecular (MOTU), sendo assim úteis para sondar padrões de biodiversidade em linhagens de animais onde a taxonomia baseada na morfologia é difícil. Deste modo, sequências de espécimes que agrupam num mesmo BIN, têm uma grande probabilidade de pertencerem à mesma espécie (Ratnasingham & Hebert, 2013). Neste trabalho utilizamos a ferramenta de análise dos BINs disponibilizada na base de dados BOLD para identificar congruências e incongruências entre os BINs existentes nos nossos dados. Na análise da composição dos BINs tomamos em consideração a possível existência de sinónimos através da consulta da base de dados da WoRMS (<http://www.marinespecies.org/>).

O sistema de classificação proposto por Costa *et al.* (2012) ("*Ranking System*") e modificado por Lobo *et al.* (2015) foi utilizado na atribuição de níveis de confiança a cada associação de espécie/*DNA barcodes* da biblioteca de referência desta tese. Este sistema consiste em cinco níveis de graus de fiabilidade, que vão desde A a E, conferidos mediante a comparação de sequências de COI-5P contra bases de dados públicas (GenBank e BOLD) e tendo em conta também os resultados obtidos pelo sistema BIN (Tabela 2). A implementação do "*ranking system*" atua deste modo como uma ferramenta de verificação final da congruência taxonômica das bibliotecas de referência, nomeadamente assegurando a validade da associação entre o nome da espécie e o conjunto de *DNA barcodes* que a diagnosticam (Costa *et al.*, 2012).

Tabela 2 – Critérios de classificação de *DNA barcodes* baseado em Costa *et al.* (2012), modificado por Lobo *et al.* (2015).

Grau de fiabilidade taxonômica	Descrição
Nível A	Concordância externa – BIN não apresenta ambiguidades, sequência agrupa com <i>DNA barcodes</i> de outros espécimes da mesma morfoespécie em bases de dados públicas.

Tabela 2 – Critérios de classificação de *DNA barcodes* baseado em Costa *et al.* (2012), modificado por Lobo *et al.* (2015) (continuação).

Grau de fiabilidade taxonómica	Descrição
Nível B	Concordância interna – sequência com correspondência interna na nossa biblioteca, espécies no nosso <i>dataset</i> estão agrupado num único BIN, com pelo menos 3 sequências. Não há correspondência com sequências encontradas em outros estudos.
Nível C	Concordância sub-ótima – Pelo menos 3 espécimes da mesma morfoespécie estão disponíveis na biblioteca, mas estão divididas em mais do que um BIN.
Nível D	Dados Insuficientes – Baixo número de espécimes analisados (1 ou 2 indivíduos) e nenhuma correspondência com sequências disponíveis na BOLD ou em outros repositórios públicos.
Nível E	<i>DNA barcodes</i> discordantes – sequências de uma espécie no nosso <i>dataset</i> não tem correspondência com o BIN ou BINs para a mesma espécie na BOLD. O espécime pode corresponder com um BIN de uma espécie diferente ou ser colocada numBIN separado.

3. Resultados

3.1 Compilação da biblioteca de referência

No âmbito desta tese e das parcerias entre equipas do CBMA/Universidade do Minho, do IMAR/Universidade Nova de Lisboa, do Instituto Português de Malacologia/Universidade Lusófona e do CIBIO/Universidade dos Açores foram obtidas 156 sequências de COI-5P de gastrópodes e bivalves da costa portuguesa. Deste total, 28 sequências de bivalves foram geradas no âmbito desta tese, 110 sequências de gastrópodes foram produzidas pelo nosso grupo de investigação e, recentemente submetidas para publicação (Borges *et al.*, submetido). Foram ainda incluídas 18 sequências entre bivalves (8 sequências) e gastrópodes (10 sequências) previamente publicadas em Lobo *et al.* (2013). A esta compilação foram adicionadas 104 sequências públicas obtidas após pesquisa no GenBank, compreendendo um total de 260 sequências de COI-5P analisadas neste estudo (Anexo 3/Tabela T2).

As 28 sequências geradas no âmbito desta tese pertencem à classe Bivalvia e estão distribuídas entre 3 ordens, 8 famílias e 10 géneros, compreendendo um total de 12 morfoespécies (com 3 espécimes identificados até ao género). As 120 sequências correspondentes à classe Gastropoda (Borges *et al.*, submetido; Lobo *et al.*, 2013) estão distribuídas entre 10 ordens, 17 famílias e 23 géneros, representando 34 morfoespécies (com 7 espécimes identificados até o género). As oito sequências restantes foram publicadas em Lobo *et al.* (2013) e correspondem às espécies: *Anadara* sp. (2), *Mytilus edulis* (3) e *Nucula sulcata* (3), distribuídas entre 3 famílias e 3 ordens. Cerca de 83% dos espécimes foram recolhidos na costa continental de Portugal, sendo que os restantes 17% foram recolhidos nas ilhas dos Açores (São Miguel e Terceira). Foram analisados entre 2 e 11 espécimes para cada espécie, sendo que 12 espécies estão representadas por apenas um indivíduo. Dos 36 géneros presentes no nosso conjunto de dados, dez estão representados por mais do que uma espécie, nomeadamente *Calliostoma*, *Gibbula*, *Littorina*, *Nassarius*, *Patella*, *Phorcus*, *Mytilus* e *Ruditapes*. A maioria das sequências utilizadas neste estudo (93%) possuem comprimento acima de 600 pb (variam entre 428 e 661 pb). Não foram encontrados quaisquer codões *STOP*, após o alinhamento. No entanto, foi verificada a ocorrência de *indels* no grupo dos bivalves e para uma espécie de gastrópode. Para todas as sequências presentes no *dataset* foi feita uma pesquisa de similaridade nas bases de dados públicas, GenBank e BOLD, sendo que 89% das sequências encontram correspondências ao nível de espécie com valores acima de 99%.

Na junção de todos os projetos envolvidos, foram produzidos novos *barcodes* para cinco espécies de gastrópodes, nomeadamente *Calliostoma virescens* Coen, 1933, *Cingula trifasciata* (Adams, 1800), *Gibbula delgadensis* Nordsieck, 1982, *Jujubinus pseudogravinae* Nordsieck, 1973, *Mitra cornea* Lamarck, 1811 e uma subespécie *Tricolia pullus azorica* (Dautzenberg, 1889), e também um bivalve, *Gari fervensis* (Gmelin, 1791). Para estes foi encontrada a correspondência mais próxima ao nível da família ou do género. Alguns espécimes que inicialmente foram apenas identificados morfologicamente ao nível do género, obtiveram sequências similares (>98%) a sequências COI-5P de espécies depositadas nas bases de dados. Este é o caso de *Gibbula* sp., *Calliostoma* sp., *Nassarius* sp., cujas sequências apresentaram identidade com as espécies *Gibbula pennanti* (Philippi, 1846) recolhida em França, *Calliostoma zizyphinum* (Linnaeus, 1758) e *Nassarius incrassatus* (Strøm, 1768) respetivamente. A identificação das espécies *Patella aspera* Röding, 1798 e *Patella ulyssiponensis* Gmelin, 1791 não pôde ser resolvida claramente através das pesquisas nas bases de dados públicas GenBank e BOLD.

3.2 Divergências moleculares intra e interespecíficas

As distâncias médias intra e interespecíficas encontram-se na tabela 3. O valor médio da divergência intraespecífica (dentro da espécie) foi de 1,24%, variando entre um mínimo de 0% e um máximo de 29,8%, registada para a espécie *Ruditapes decussatus* (Anexo 5/Tabela T3). A espécie *Pavicardium exiguum* apresentou também uma alta divergência intraespecífica de 8,43%. Retirando-se estas espécies da análise, observa-se uma diminuição da divergência intraespecífica, sendo a máxima registada para a espécie *Siphonaria pectinata*, com 2,03%. A divergência média congénérica foi de 8,91%, a mais baixa (0,2%) foi registada para o género *Mytilus*, sendo que a divergência congénérica máxima (37,7%) verificou-se para o género *Ruditapes* (Anexo 6/Tabela T4). Relativamente à divergência confamiliar, a família Littorinidae foi quem apresentou o menor valor (0%), e a família Cardiidae o maior valor (32,5%) (Anexo 7/Tabela T5).

Foram removidas as espécies representadas apenas por um espécime, ou identificadas apenas ao nível da família ou género e não tendo sido encontradas sequências similares no GenBank que servem como termo de comparação, e ainda espécies que se encontravam agrupadas num mesmo ramo do fenograma.

Tabela 3 – Distâncias intra e interespecíficas das espécies de gastrópodes e bivalves, gêneros e famílias analisadas neste estudo, calculadas com o modelo de substituição nucleotídica K2P.

	<i>Taxa</i>	Min Dist (%)	Mean Dist (%)	Max Dist (%)
Espécie	43	0	1,24	29,8
Gênero	11	0,2	8,91	37,7
Família	5	0	14,00	32,5

3.3 Fenogramas de *DNA barcodes*

Através da análise do fenograma (NJ) construído a partir de 260 sequências de *DNA barcodes* (62 morfoespécies) observa-se que, retirando-se os sete espécimes com apenas uma sequência, aproximadamente 76% das espécies agruparam-se em clados monofiléticos com menos de 2% de divergência intraespecífica, correspondendo às morfoespécies ou gêneros.

Das 47 morfoespécies (156 sequências) que representam o contributo inicial para a biblioteca de referência, aproximadamente 86% das espécies, com pelo menos dois espécimes, agruparam congruentemente em clados monofiléticos e com alto grau de suporte. Os espécimes identificados morfologicamente até o nível de gênero, nomeadamente *Gibbula* sp., *Nassarius* sp. e *Calliostoma* sp. agruparam respectivamente no mesmo clado que as espécies *Gibbula pennanti*, *Nassarius incrassatus* e *Calliostoma zizyphinum*, com uma distância patristica observada inferior a 2%. As exceções a este padrão estão representadas por complexos de espécies pertencentes ao gênero *Littorina* (Figura 4 e 5), *Ocenebrina* (Figura 6) e *Mytilus* (Figura 7) e espécies com alta divergência intraespecífica, como *Ruditapes decussatus* (Figura 8) e *Parvircardium exiguum* (Figura 9). Para o bivalve *Anadara* sp., não foi possível encontrar nenhuma correspondência próxima para espécie ou gênero. O fenograma NJ encontra-se em versão compacta na figura 3 e na sua totalidade no anexo 8/figura 2

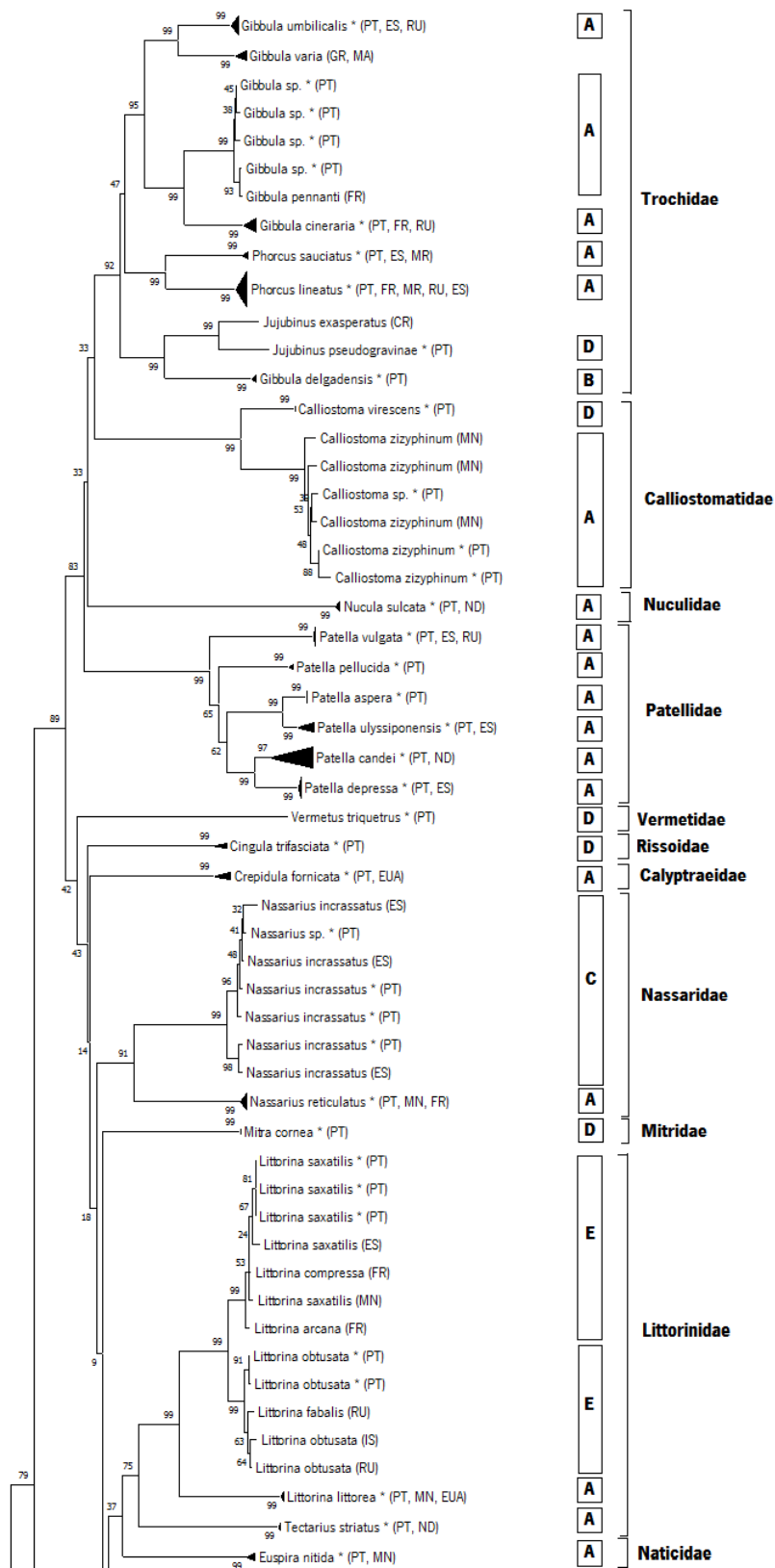


Figura 3 - Fenograma NJ compactado obtido pela análise de 260 seqüências de COI-5P de gastrópodes e bivalves da costa Portuguesa em conjunto com as seqüências públicas do GenBank, obtida com recurso ao modelo K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Os asteriscos representam as seqüências obtidas neste estudo.

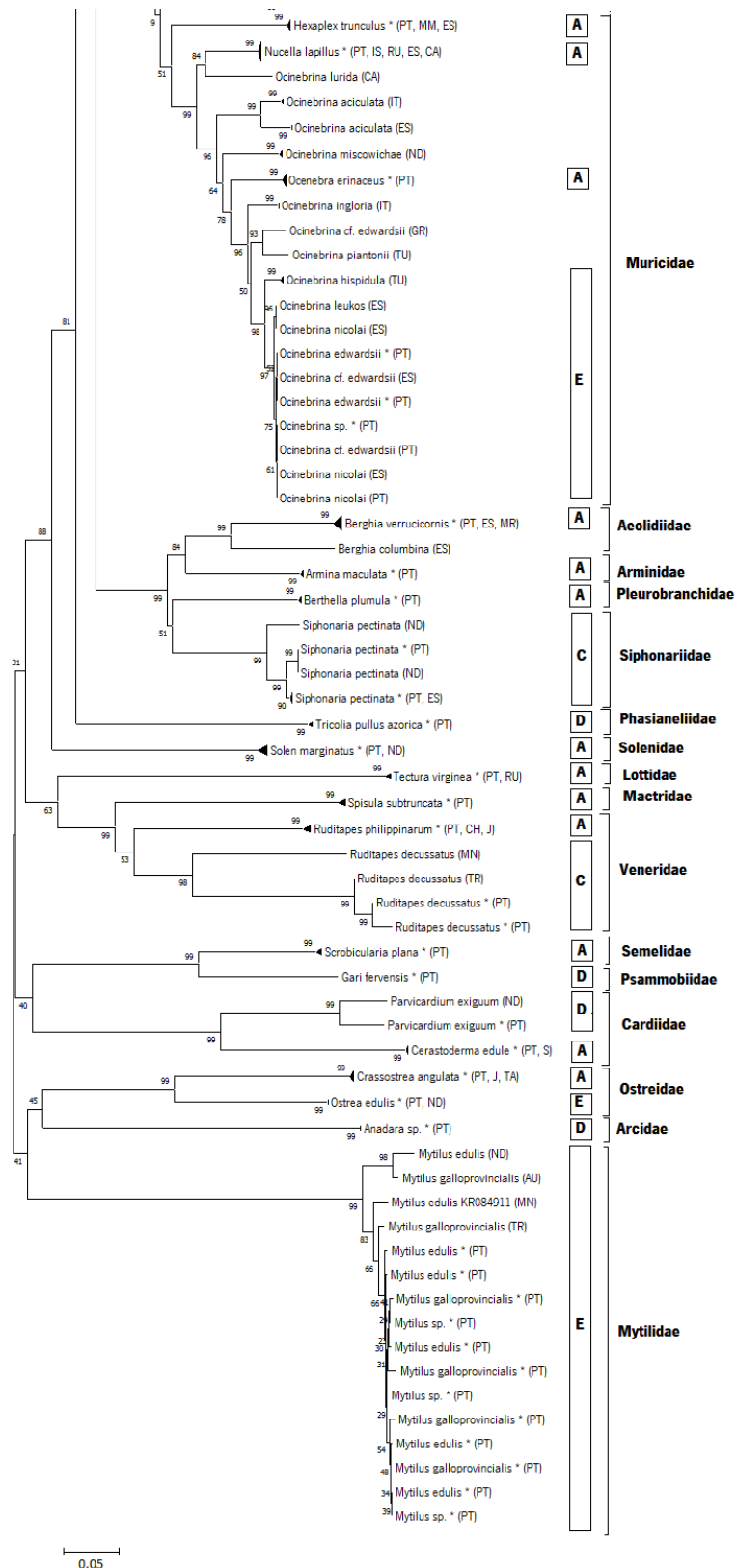


Figura 3 - Fenograma NJ compactado obtido pela análise de 260 seqüências de COI-5P de gastrópodes e bivalves da costa Portuguesa em conjunto com as seqüências públicas do GenBank, obtida com recurso ao modelo K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Os asteriscos representam as seqüências obtidas neste estudo (continuação).

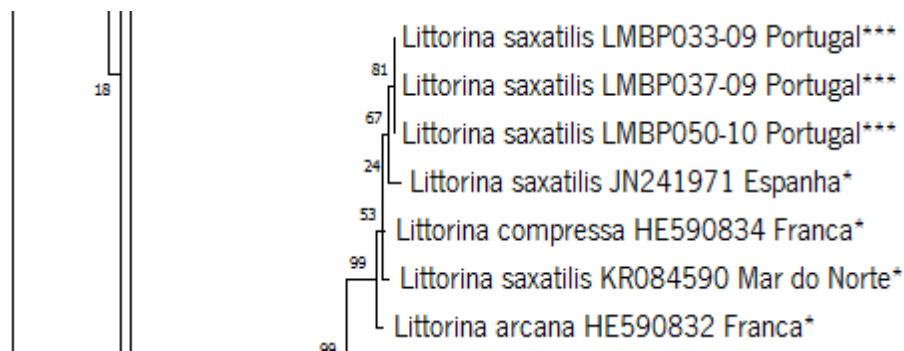


Figura 4 – Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies *Littorina saxatilis*, *Littorina compressa* e *Littorina arcana* com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

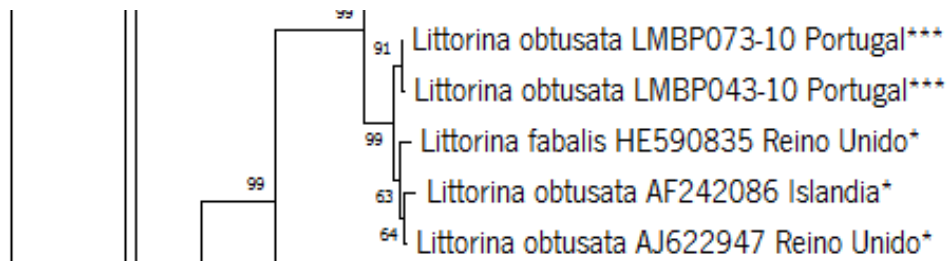


Figura 5 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies *Littorina obtusata* e *Littorina fabalis* com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

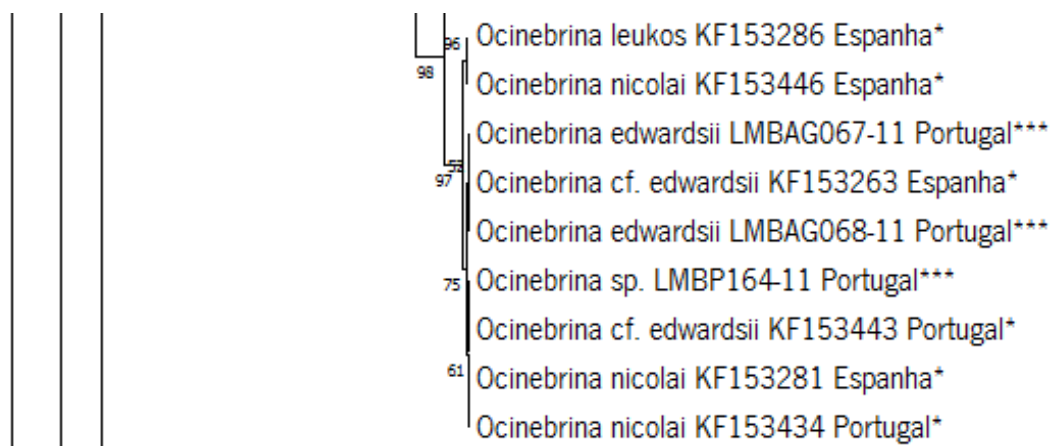


Figura 6 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies *Ocinebrina edwardsii*, *Ocinebrina hispidula*, *Ocinebrina nicolai* e *Ocinebrina leukos* com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

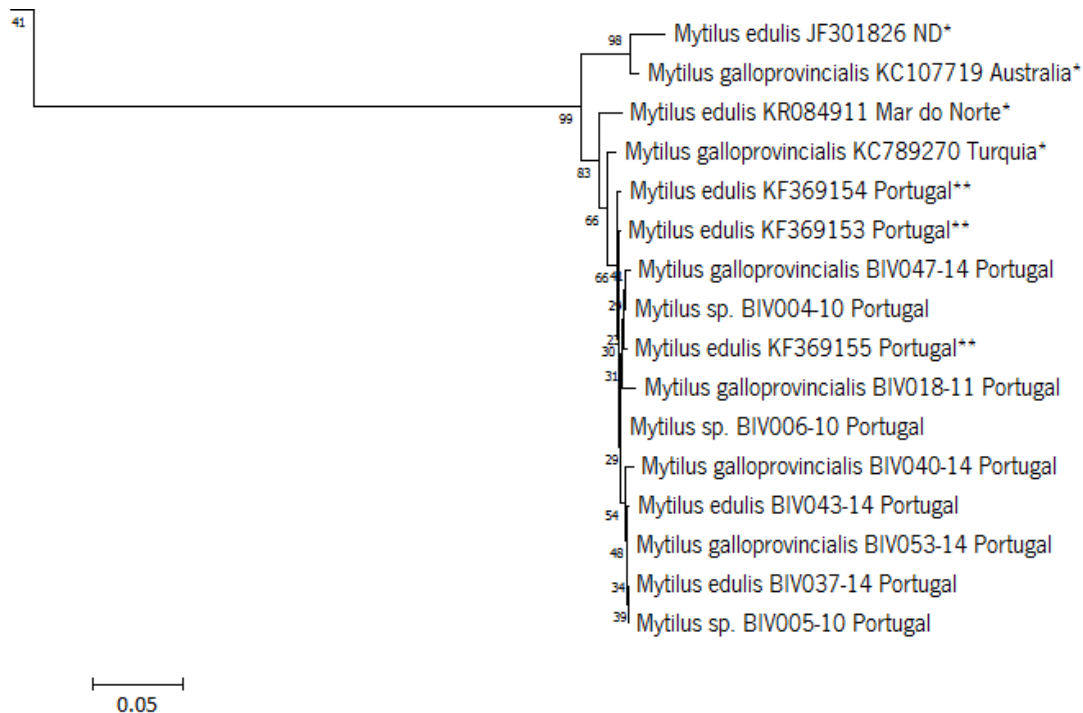


Figura 7 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P das espécies *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus* sp. com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

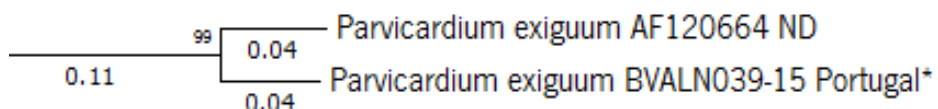


Figura 8 – Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P da espécie *Parvicardium exiguum* com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

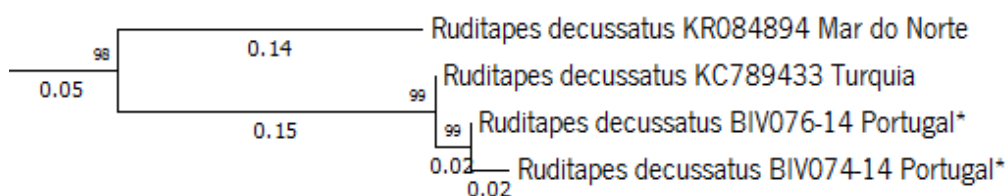


Figura 9 - Parte do fenograma NJ obtido pela análise de sequências de COI-5P da espécie *Ruditapes decussatus* com recurso ao modelo de substituição K2P. Em cada nó é apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

3.4 Análise de incongruências nos BINs e categorização dos *DNA barcodes*

As 47 morfoespécies de gastrópodes e bivalves presentes neste estudo foram atribuídas a 53 BINs, resultando em 28 BINs concordantes, 21 BINs discordantes e 4 BINs com apenas um membro (*singleton*). Todos os BINs discordantes foram analisados em detalhe, tendo sido 16 deles considerados concordantes (ACT4929; AAX5986; AAO2227; AAH7858; AAA322; AAW3393; AAZ9281; AAO2228; AAO6984; AAB1828; AAA9624; AAA9623; AAE1468; ACM2025; AAC2081; AAC5581), e 5 continuando a ser considerados discordantes (AAA7469; AAG1552; AAA2184; AAO6343; AAB1111). Estes BINs correspondem aos nossos espécimes pertencentes às espécies *Littorina obtusata*, *Littorina saxatilis*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus* sp., *Ocenebrina edwardsii* e *Ostrea edulis*, respetivamente. Após revisão, foram identificados 44 BINs concordantes, 5 BINs discordantes e 4 BINs com apenas um membro (*singleton*), resumidos na tabela 4. Os BINs que se apresentam com apenas um membro correspondem aos nossos espécimes de *Crassostrea angulata*, *Jujubinus pseudogravinae*, *Parvicardium exiguum* e *Vermetus triquetrus*.

Tabela 4 – Resumo do número de BINs e registos taxonomicamente concordantes, discordantes e com apenas um membro (*singleton*). Dos 156 registos da biblioteca, 155 tiveram a atribuição de um BIN, correspondentes a um total de 53 BINs.

	Número de BINs	Número de BINs (após revisão)	Número de Registos
Taxonomicamente Concordantes	28	44	73
Taxonomicamente Discordantes	21	5	78
Singletons	4	4	4

Com base no sistema de classificação proposto por Costa *et al.*, 2012 e modificado por Lobo *et al.*, 2015, explicado nos Materiais e Métodos, obtivemos 31 espécies com nível A, 1 com nível B, 3 com nível C, 9 com nível D e 6 com nível E.

4. Discussão

A compilação da biblioteca de referência de *DNA barcodes*, onde estão incluídas as sequências geradas nos diversos projetos envolvidos nesta tese permitiu o aumento da informação sobre os bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa. Este estudo contribuiu com 28 novas sequências de bivalves, avaliando-se também 128 outras sequências de bivalves e gastrópodes de Portugal, geradas pelo nosso grupo de investigação. A classe Gastropoda está representada com um maior número de sequências em relação aos bivalves. De acordo com o estudo de Bouchet (2006), este grupo representa a classe mais abundante e diversa do ambiente marinho. Na base de dados BOLD, o maior registo de espécies é encontrado para os gastrópodes, com 7455 espécies publicadas contra 1384 espécies de bivalves (acesso a 27 de Outubro de 2015). O número de bivalves neste estudo é entretanto, relativamente pequeno quando comparado à diversidade encontrada para a costa continental portuguesa num estudo publicado por Martins *et al.*, (2013). De qualquer modo, as sequências incluídas nesta tese são um pequeno contributo para o desenvolvimento de uma biblioteca de referência de *DNA barcodes*, que para ser representativa, necessita de um grande levantamento de *DNA barcodes* de modo a assegurar a diversidade da região em questão. Sendo que com a criação desta biblioteca se pretendeu dar início a um sistema de classificação mais rigoroso e auditável para os bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa.

Neste trabalho utilizamos diferentes conjuntos de *primers* para a amplificação de sequências de *DNA barcodes* de gastrópodes e bivalves. Os *primers* “Folmer” (Folmer *et al.*, 1994) comumente utilizados na obtenção de sequências de *DNA barcodes* de diversos organismos apresentaram uma taxa de sucesso de amplificação de aproximadamente 39% para os 156 espécimes analisados. Uma abordagem alternativa foi testada com recurso a *primers* degenerados, nomeadamente os pares LoboF/LoboR (Lobo *et al.*, 2013), dgLCO1490/dgHCO2198 (Meyer, 2003) e polyLCO/polyHCO (Carr *et al.*, 2011). A taxa de sucesso na amplificação observada para os primers Lobo foi de aproximadamente 31%. Estes *primers* revelaram taxas de sucesso de amplificação muito superiores em vários grupos de organismos marinhos, incluindo gastrópodes e bivalves (Lobo *et al.*, 2013). Por fim, o par dgLCO1490/dgHCO2198 gerou cerca de 29% das sequências presentes na nossa biblioteca de referência, enquanto que o par polyLCO/polyHCO gerou apenas cerca de 1% dos resultados. De um modo geral, analisando as distâncias moleculares obtidas durante esta tese, como seria de esperar, as distâncias médias intraespecíficas K2P, que incluem as sequências públicas obtidas no GenBank, foram inferiores a 2% em praticamente todas as espécies, mostrando que existe congruência entre as

identificações baseadas na morfologia e o *DNA barcodes*. Em duas morfoespécies, *Ruditapes decussatus* e *Parvicardium exiguum*, a distância intraespecífica máxima foi 29,8% e 8,43%, respetivamente. No caso da espécie *Ruditapes decussatus*, as nossas sequências apresentaram uma alta divergência com uma sequência recolhida no Mar do Norte (Barco *et al.*, 2015). Analisando os BINs onde se encontram os espécimes, é possível verificar que a amostra do Mar do Norte se encontra isolada num BIN e as nossas sequências encontram-se agrupadas num outro BIN com mais 77 sequências desta espécie, originárias de Espanha, Turquia, França, Namíbia, Tunísia e Portugal. Seria ideal a recolha de mais espécimes do Mar do Norte e de uma revisão mais aprofundada. Recentemente foram detetadas diferenças genéticas entre populações de *R. decussatus* recolhidas em 11 locais dispersos ao longo do Mediterrâneo, num estudo onde foram utilizadas aloenzimas (Gharbi *et al.*, 2010). Além disto, foi constatada a presença de herança uniparental dupla (DUI – *Doubly uniparental inheritance*) em algumas famílias de bivalves, entre elas, a família Veneridae, onde está inserida a espécie *R. decussatus*. Neste modo de herança, duas linhagens mitocondriais podem coexistir, uma transmitida pela fêmea e outra pelo macho (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010), o que pode explicar a alta divergência encontrada nas nossas análises comparativas.

No caso da morfoespécie *Siphonaria pectinata*, esta é encontrada nos dois lados do oceano Atlântico (este e oeste), sendo que a disjunção genética mostrou haver dúvidas da existência de duas linhagens diferentes (Kawauchi & Giribert, 2011). Os nossos espécimes de *S. pectinata* encontram-se divididos em dois BINs diferentes (ACF0865 e AAE1468) o que comprova a existências de duas linhagens.

Com a análise do relatório de BINs produzido pela BOLD, e após revisão de todos os casos de BINs que se apresentavam discordantes, é possível afirmar que 83% da nossa biblioteca apresenta BINs congruentes. Os principais problemas encontrados no caso dos BINs discordantes devem-se à falta de atualização da taxonomia das espécies nos repositórios públicos, à presença de complexos de espécies onde existe a dificuldade em identificar morfologicamente algumas espécies que se encontram dentro de um género, e o facto de algumas espécies distintas serem consideradas em alguns estudos como sendo uma espécie única. Um dos casos de discordância ocorre na nossa sequência de *Gari fervensis* (Gmelin, 1791) (BIN ACT4929). Este BIN foi discordante ao nível da família, devido à inclusão de 1 membro da família Tellinidae e 2 membros da Psammobiidae. O problema da incongruência prende-se com o facto de o registo com a família Tellinidae ainda não ter sido atualizado para o nome atualmente aceite Psammobiidae, o que é possível confirmar com pesquisas no WoRMS

(<http://www.marinespecies.org>) ou no ITIS (<http://www.itis.gov/>). Sendo agora o BIN considerado concordante.

O BIN AAX5986, que inclui a nossa sequência de *Euspira nitida* (Donovan, 1804) foi considerado discordante ao nível do género. Tendo sido pelo facto de neste estarem incluídos 5 membros do género *Euspira* e 1 membro do género *Lunatia*. A incongruência resulta da falta de atualização do género que agora é considerado válido, no caso *Euspira*. A partir de agora é considerado concordante. O mesmo acontece no BIN AAO2227 e que inclui as nossas sequências de *Phorcus lineatus* (da Costa, 1778), que foi também considerado discordante ao nível do género, e inclui 51 membros de *Phorcus* e 29 membros de *Osilinus*. A incongruência resulta do facto dos registos com o nome *Osilinus lineatus* ainda não terem sido alterados para o nome válido para a espécie, que no caso é *Phorcus lineatus* (Donald *et al.*, 2012). Após a análise, o BIN passa a ser considerado concordante. Os BINs AAH7858 e AAA3922, onde estão inseridas as nossas sequências de *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) e *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), respetivamente, discordam ao nível do género, tal como os casos anteriores. No caso do BIN AAH7858, este apresenta 75 membros do género *Ruditapes* e 6 membros do género *Venerupis*. No BIN AAA3922, este tem 201 membros do género *Ruditapes* e 63 membros do género *Venerupis*. Em ambos os casos, os registos presentes nos repositórios públicos ainda não foram atualizados para o género aceite (ver WoRMS). Ambos os BINs são agora considerados concordantes.

Os casos seguintes apresentam discordância o nível da espécie. Os nossos espécimes de *Berthella plumula* (Montagu, 1803) estão atribuídos ao BIN AAW3393, onde se encontra 1 membro classificado como *Berthella* sp. e 3 membros de *Berthella plumula*. O registo de *Berthella* sp. está apenas identificado morfológicamente ao nível do género, mas através da análise dos dados presentes na página do BIN é possível afirmar que este se trata de um espécime de *Berthella plumula*, passando por isso a ser considerado concordante. Três BINs AAZ9281, AAE1468 e AAO6984 foram considerados discordantes devido à inclusão de três espécimes identificados morfológicamente ao nível do género, *Calliostoma* sp., *Siphonaria* sp. e *Nassarius* sp., respetivamente. Nos três casos, estes podem ser identificados através do barcode como *Calliostoma zizyphinum* (AAZ9281), *Siphonaria pectinata* (AAE1468) e *Nassarius incrassatus* (AAO6984). O BIN AAO2228, onde se incluem 4 sequências de *Gibbula* sp. presentes neste estudo, que tiveram uma correspondência de 99% com uma sequência pública de um espécime de *Gibbula pennanti* (Williams *et al.*, 2010). Sendo que essa mesma sequência encontra-se também presente neste BIN, e podendo então as sequências de *Gibbula* sp. serem identificadas através do barcode como *Gibbula pennanti*. Os quatro BINs referidos anteriormente são agora todos considerados concordantes. O BIN AAO6343 onde se encontram as nossas sequências de

Ocenebra erinaceus (Linnaeus, 1758) é discordante ao nível da espécie, pois inclui espécimes identificados como *Ocenebra erinaceus* (8) e *Ocenebra erinacea* (24). Tal como acontece em casos referidos acima, o nome aceite é *Ocenebra erinaceus*, mas as espécies são consideradas sinónimas e existe a necessidade de atualizar as informações nos repositórios públicos (ver WoRMS ou ITIS).

O BIN AAA2184, que contém *Mytilus galloprovincialis* (279), *Mytilus edulis* (115), *Mytilus* sp. (87) e *Mytilus trossulus* (19) diverge ao nível da espécie. Este género apresenta uma elevada similaridade morfológica entre as suas espécies e alta frequência de haplótipos de *DNA* mitocondrial partilhados entre elas (Barco *et al.*, 2015). Espécies deste género são alvo de hibridização, extensos níveis de introgressão no *DNA* mitocondrial e de heteroplasmia (Quesada *et al.*, 1998). O BIN continua a ser considerado discordante, por não ser possível distinção dentro do mesmo.

O BIN AAA7469 onde se incluem espécimes de *Littorina obtusata* (100), *Littorina fabalis* (6) e *Littorina saxatilis* (1). No caso do registo de *Littorina saxatilis* neste BIN, este deve tratar-se provavelmente de algum erro de identificação ou de rotulagem, pois esta espécie apresenta um número representativo de espécimes noutra BIN, não existindo ambiguidades associadas à distinção morfológica das duas espécies (*L. obtusata* e *L. saxatilis*). Relativamente à ocorrência de *L. fabalis* neste BIN pode ser resultado da história evolucionária das duas espécies. As duas espécies, *L. obtusata* e *L. fabalis*, resultaram da invasão de uma linhagem de *Littorina* do Pacífico para o Atlântico, após a abertura do Estreito de Bering à 3,5-4 Ma. Estas apresentam divergências simpátricas ao longo da costa do Atlântico e estão bem separadas morfológicamente, ecologicamente e em alguns marcadores genéticos (aloenzimas e microssatélites) (Kemppainen *et al.*, 2009). Resultados obtidos do estudo de Kemppainen *et al.* (2009) mostram que existe uma falta de divergência mitocondrial entre as duas espécies e sugere que estas podem apresentar hibridização introgressiva. Sendo neste caso o BIN considerado discordante.

O BIN AAO6343, que inclui os nossos espécimes identificados morfológicamente como *Ocenebrina edwardsii*, foi discordante ao nível da espécie. Este BIN inclui sequências de *Ocenebrina cf. edwardsii* (41), *Ocenebrina edwardsii* (7), *Ocenebrina nicolai* (3), *Ocenebrina leukos* (2) e *Ocenebrina* sp. (1). O género *Ocenebrina* no noroeste Atlântico e Mar Mediterrâneo é tradicionalmente dividido em dois grupos com afinidades morfológicas, sendo um deles o complexo de *O. edwardsii*, que inclui espécies aceites como *O. hispidula* (Pallary, 1904), *O. nicolai* Monterosato, 1884 e *O. leukos* Houart, 2000 (Barco *et al.*, 2013b). A espécie *O. edwardsii* é uma das mais variáveis morfológicamente da Europa (Houart, 2000) e tendo sido o complexo acima citado alvo de estudo por utilizando marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares) na tentativa de delimitar as espécies (Barco *et al.*, 2013b). Apesar da adição de diferentes espécies deste género, incluídas em diversos estudos (Barco *et al.*, 2013b; Layton *et al.*,

2014; Barco *et al.*, 2015), o fenograma NJ mostrou uma mistura de morfoespécies, não sendo possível separar os espécimes de todas as sequências adicionadas a partir do GenBank, tendo o BIN continuado a ser considerado discordante.

O BIN AAB1111 onde se insere o nosso espécime de *Ostrea edulis* é discordante ao nível da espécie. Este apresenta 31 membros da espécie *Ostrea angasi* e 11 membros da espécie *Ostrea edulis*. As relações filogenéticas entre as ostras ainda não estão bem estudadas, estando a sua identificação e classificação dificultadas. No caso destas espécies, um estudo publicado por Salvi *et al.* (2014), mostrou que estas divergem pouco entre si, e que podem representar um único *taxon*. Sendo por isso o BIN considerado discordante.

Os BINs AAA9624 e AAA9623 são os mais problemáticos, e estão representados por *Patella aspera* e *Patella ulyssiponensis*, sendo que ambas as espécies estão presentes nos dois BINs. O BIN AAA9624 apresenta 21 membros de *Patella ulyssiponensis* e 10 membros de *Patella aspera*, enquanto o BINAAA9623 contem 147 membros de *Patella ulyssiponensis* e 8 de *Patella aspera*. O género *Patella* tem sido considerado um grupo taxonomicamente difícil, e tendo sido a ocorrência das duas espécies em estudos anteriores, considerada como uma espécie única (Weber & Hawkins, 2005). Como resultado da pesquisa de sequências no GenBank, foi possível encontrar sequências de espécimes recolhidos em Espanha (Europa) e identificados como *P. aspera*, e espécimes das Ilhas da Macarronésia (Açores) identificados como *P. ulyssiponensis*. Neste estudo, a sequência de *P. aspera* agrupou-se com as sequências de Portugal de *P. ulyssiponensis*, e a sequência de *P. ulyssiponensis* agrupou com as sequências de *P. aspera* de Portugal. Um estudo envolvendo aloenzimas mostrou que as populações da Macarronésia e da Europa Continental são duas espécies distintas, sendo que as populações da Macarronésia são consideradas como populações de *P. aspera* e as da Europa Continental consideradas como *P. ulyssiponensis* (Weber & Hawkins, 2005). A divergência interespecífica observada entre as duas espécies neste estudo é de 4%, suportando a ideia da existência de duas espécies diferentes, confirmando assim os resultados obtidos nos estudos mencionados, tendo sido por isso, utilizada neste estudo a nomenclatura proposta por Weber & Hawkins (2005).

Os BINs AAC2081 e AAC5581, onde se encontram os nossos espécimes de *Patella depressa* e *Patella vulgata* respetivamente. Os dois BINs são discordantes ao nível da espécie e caracterizam-se por apresentar nos seus BINs membros de *P. ulyssiponensis*, sendo que o primeiro apresenta 69 membros da espécie *P. depressa* e 3 da espécie *P. ulyssiponensis*, e o segundo apresenta 58 membros de *P. vulgata* e 2 de *P. ulyssiponensis*. A inclusão de espécimes de *P. ulyssiponensis* em ambos os BINs deve estar relacionada com algum erro de identificação ou contaminação, visto as espécies agruparem-se

bem e não estarem relatados casos de hibridização envolvendo as espécies referidas acima (Sá-Pinto *et al.*, 2005). Passando os dois BINs a ser considerados concordantes.

Relativamente ao BIN ACM2025, este diverge também ao nível da espécie e inclui os nossos espécimes de *Spisula subtruncata* e apresenta 10 membros de *S. subtruncata* e 1 membro de *Spisula solida*. Esta discordância prende-se com algum erro de identificação, pois os espécimes de *S. solida* encontram-se agrupados num outro BIN (ABV8598), sendo que o único espécime presente se encontra bem agrupado com os espécimes de *S. subtruncata*. Num estudo realizado por Barco *et al.* (2015), é possível verificar através da análise do fenograma NJ obtido, que as espécies se encontram bem separadas. Passando então o BIN a ser considerado concordante.

Com a aplicação do sistema de classificação proposto por Costa *et al.* (2012) e modificado por Lobo *et al.* (2015) ao conjunto de dados, foi possível verificar que os graus atribuídos mostram que existe uma alta confiabilidade taxonómica e que na sua maioria, as sequências obtidas se apresentam congruentes e externamente comprovadas, tendo-se obtido 31 espécies com grau A e 1 espécie com grau B. O que mostra que existe bastante concordância entre as nossas sequências e as sequências obtidas para as mesmas morfoespécies a partir de outros estudos. As espécies *Nassarius incrassatus*, *Siphonaria pectinata* e *Ruditapes decussatus* estão atribuídas ao grau C, e mostram a necessidade da realização de estudos mais aprofundados, de modo a comprovar se as morfoespécies estão atribuídas a mais que uma linhagem. As espécies de *DNA barcodes* atribuídas ao grau D (9) mostram a necessidade de continuar os trabalhos iniciados neste *taxa*, de forma a aumentar os conhecimentos e a biblioteca de referência para estas morfoespécies. Seis morfoespécies presentes neste estudo foram classificadas com grau E, nomeadamente *Littorina saxatilis*, *Littorina obtusata* e *Ocenebrina edwardsii*, *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*. Estas representam complexos de espécies bem conhecidos e estudados, mas que precisam ainda de ser mais aprofundados, de modo a perceber quais das espécies incluídas nos complexos representam espécies putativas ou ser consideradas sinónimas, havendo a necessidade de realizar revisões taxonómicas para esclarecer erros de identificação de espécies.

A espécie *Nucula sulcata* destaca-se das restantes espécies de bivalves, por se apresentar bastante afastada de todas as outras espécies de bivalves. Esta espécie agrupa-se num mesmo ramo contendo duas famílias de gastrópodes, Calliostomatidae e Trochidae, entretanto com baixo grau de suporte (33). Em estudos anteriores, espécimes da família Nuculoidea apresentavam-se agrupados entre gastrópodes e cefalópodes (Giribert & Wheeler, 2002). Este é um dos grupos mais basais dentro dos bivalves (Plazzi *et al.*, 2012). Situação similar é observada para o bivalve *Solen marginatus* e o gastrópode *Tectura virginea*. As relações filogenéticas dentro dos moluscos é ainda foco de intenso debate (Stöger

et al., 2013), assim como dentro dos gastrópodes (Zapata *et al.*, 2014) e dos bivalves (Plazzi *et al.*, 2011). Além disto, o número de bivalves no nosso estudo não é representativo, comparativamente com os presentes noutros estudos, tornando difícil avaliar as relações reais destes grupos no nosso conjunto de dados. De qualquer modo, estas análises filogenéticas encontram-se além do objetivo desta tese.

Foi verificada a presença de inserções e deleções em algumas famílias de bivalves e uma espécie de gastrópode. Para 16 espécimes pertencentes a duas famílias de bivalves (Arcidae e Mytilidae) e uma espécie de gastrópode (*Tectura virginea*) foi observada a inserção de um codão na mesma posição do alinhamento. Além disto, foi observada a deleção de três codões para a família Ostreidae (*Crassostrea angulata* e *Ostrea edulis*). Estes mesmos resultados foram reportados por Layton *et al.* (2014). Adicionalmente, uma deleção de dois codões foi verificada para a espécie *Gari fervensis*. Por fim, para as espécies endêmicas dos Açores, *Jujubinus pseudogravinae* e *Gibbula delgadensis*, foram produzidos os primeiros barcodes para ambas as espécies e para as quais não existem ainda estudos taxonómicos detalhados (Ávila *et al.*, 2011). Analisando o fenograma NJ obtido, este sugere que a espécie *G. delgadensis* se encontra mais próxima de *J. pseudogravinae* e *J. exasperatus*, do que das restantes espécies *Gibbula* presentes neste estudo. Foi ainda gerado o primeiro barcode para o bivalve *Gari fervensis*, único representante da família Psammobiidae neste estudo.

5. Conclusão

O *DNA barcodes* provou ser uma ferramenta útil na identificação rápida e eficiente de espécies, que se encontram incluídas em grupos ainda pouco estudados e aguardam descrição. Este trabalho contribuiu para a confirmação da eficácia do *DNA barcodes* na identificação de espécies de bivalves e gastrópodes da costa Portuguesa. E permitiu a atribuição até à espécie de praticamente todos os espécimes catalogados nesta tese com um *taxa* superior. De um modo geral, todas as espécies desta biblioteca de referência agruparam em clados monofiléticos, com divergências inferiores a 2%.

Os dados compilados nesta tese mostram que a biblioteca de referência de *DNA barcodes* para gastrópodes e bivalves da costa Portuguesa ainda se encontra numa fase inicial, existindo a necessidade de dar continuidade ao desenvolvimento da mesma, de modo a proporcionar um aumento no rigor de futuros trabalhos nesta área e do conhecimento destes grupos.

Verificaram-se casos de ambiguidade, incluindo casos de complexos de espécies, que comprovam a necessidade de haverem mais estudos de modo a ajudar a resolver ou entender melhor estas situações (por exemplo, *Nassarius incrassatus*), e ainda casos de espécies ou sub-espécies que precisam de revisões taxonómicas, como por exemplo, *Patella ulyssiponensis*, *Patella aspera*, *Tricolia pullus azorica*, *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*.

A universalidade das bibliotecas de referência de *DNA barcodes* irá revigorar a ciência da taxonomia, permitindo a deteção de incoerências nas identificações morfológicas e de potenciais espécies crípticas, ajudando desta forma na resolução de conflitos taxonómicos e na revisão taxonómica de espécimes. As bibliotecas de referência de *DNA barcodes* permitem ainda o aumento do conhecimento da biodiversidade, onde é possível examinar e estudar de uma forma mais rápida, eficiente e económica todas as espécies presentes.

No futuro, com o aumento de estudos semelhantes a esta tese, onde é feita a compilação da biblioteca de referência de *DNA barcodes* de gastrópodes e bivalves, será possível a utilização dos dados em estudos de biomonitorização de grande escala, com recurso a técnicas de sequenciação de alto débito, facilitando a identificação de comunidades ainda pouco estudadas e conhecidas. Sendo que com um maior investimento e esforço para aumentar as amostragens destes espécimes, e conseqüentemente o número de sequências de COI-5P para estas classes, será possível realizar mais comparações morfológicas e moleculares, permitindo a validação das bibliotecas de referência que ainda se encontram em desenvolvimento.

6. Referências bibliográficas

- Altschull SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol* 215: 403-410.
- Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, Angel MV *et al.* (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* 22: 2189-2202.
- Ávila SP, Borges JP, Martins AMF (2011). The littoral Trochoidea (Mollusca: Gastropoda) of the Azores. *Journal of Conchology* 40: 408-427.
- Barco A, Claremont M, Reid DG, Houart R, Bouchet P, Williams ST, Cruaud C, Couloux A, Oliverio M (2010). A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1025-1039.
- Barco A, Evans J, Schembri PJ, Taviani M, Oliverio M (2013a). Testing the applicability of DNA barcoding for Mediterranean species of top-shells (Gastropoda, Trochidae, Gibbula s.l.). *Marine Biology Research* 9: 785-793.
- Barco A, Houart R, Bonomolo G, Crocetta F, Oliverio M (2013b). Molecular data reveal cryptic lineages within the northeastern Atlantic and Mediterranean small mussel drills of the *Ocinebrina edwardsii* complex (Mollusca: Gastropoda: Muricidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 169: 389-407.
- Barco A, Raupach MJ, Laakmann S, Neumann H, Knebelberger T (2015). Identification of North Sea molluscs with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 288-297.
- Benson DA, Karsch-Mizrochi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2005). GenBank. *Nucleic Acid Research* 28: 15-18.
- Bettencourt AM, Bricker SB, Ferreira JG, Franco A, Marques JC, Melo JJ, Nobre A, Ramos L, Reis CS, Salas F, Silva MC, Simas T, Wolff W (2004). Typology and Reference Conditions for Portuguese Transitional and Coastal Waters, Development of Guidelines for the Application of the European Union Water Framework Directive. INAG/IMAR, Lisboa, Portugal (100 pp.).
- Bogan AE (2008). Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 139-147.
- Borges TC (2007). Biodiversidade nas pescas do Algarve (Sul de Portugal)/Biodiversity in the fisheries of Algarve (south of Portugal). Universidade do Algarve, Faro, Portugal. 658 pp.

- Borrel YJ, Romano F, Vázquez E, Blanco G, Sánchez Prado JA (2010). DNA Barcoding and Phylogeny of Pateledids from Asturias (Northern Spain). *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems* pp. 281-287.
- Bouchet P (2006). The magnitude of marine biodiversity in *Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological challenges* (ed. Duarte, C. M.) 31–62 (Fundación BBVA).
- Bresler V, Abelson A, Fishelson L, Feldstein T, Rosenfeld M, Mokady O (2003). Marine molluscs in environmental monitoring. *Helgoland marine research* 57: 157-165.
- Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, De Mattia F, Casiraghi M, Labra M (2015). A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry* 170: 308-315.
- Bucklin A, Steinke D, Blanco-Bercial L (2011). DNA barcoding of marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3, 471-508.
- Carr CM, Hardy SM, Brown TM, Macdonald TA, Hebert PDN (2011). A Tri-Oceanic Perspective: DNA Barcoding Reveals Geographic Structure and Cryptic Diversity in Canadian Polychaetes. *PLoS ONE* 6: e22232.
- Cordero D, Peña JB, Saavedra C (2014). Phylogeographic analysis of introns and mitochondrial DNA in the clam *Ruditapes decussatus* uncovers the effects of Pleistocene glaciations and endogenous barriers to gene flow. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 274–287.
- Costa FO & Antunes PM (2012) The contribution of the Barcode of Life initiative to the discovery and monitoring of Biodiversity. In: Mendonça A, Chakrabarti R and Cunha A (eds.) *Natural Resources, Sustainability and Humanity – A comprehensive View*, pp. 37-68. Springer, Dordrecht.
- Costa FO, Landi M, Martins R, Costa MH, Costa ME, Carneiro M, Alves MJ, Steinke D, Carvalho GR (2012). A Ranking System for Reference Libraries of DNA Barcodes: Application of Marine Fish Species from Portugal. *PLoS ONE* 7: e35858.
- Cox AJ & Hebert PDN (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371-386.
- Donald KM, Preston J, Williams ST, Reid DG, Winter D, Alvarez R, Buge B, Hawkins SJ, Templado J, Spencer HG (2012). Phylogenetic relationships elucidate colonization patterns in the intertidal grazers *Osilinus* Philippi, 2847 and *Phorcus* Risso, 1826 (Gastropoda: Trochidae) in the northeastern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 35-45.

- Doucet-Beaupré H, Breton S, Chapman EG, Blier PU, Bogan AE, Stewart DT, Hoeh WR (2010). Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC evolutionary biology* 10: 50.
- Drent J, Luttikhuisen PC, Piersma T (2004). Morphological dynamics in the foraging apparatus of a deposit feeding marine bivalve: phenotypic plasticity and heritable effects. *Func Ecol* 18: 349–356.
- Du G, Wu F, Guo H, Xue H, Mao Y (2015): DNA barcode assessment of Ceramiales (Rhodophyta) in the intertidal zone of the northwestern Yellow Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 33: 685-695.
- Feldstein T, Kashman Y, Abelson A, Fishelson L, Mokady O, Bresler V, Erel Y (2003). Marine molluscs in environmental monitoring. *Helgoland Marine Research* 57: 212-219.
- Fiúza AFG (1983). Upwelling patterns off Portugal. In: Suess, E., Thiede, J. (Eds.), Coastal Upwelling: Its Sediment Record. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 85–98.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vriegenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Gaspar MB, Leitão F, Santos MN, Chícharo L, Dias MD, Chícharo A, Monteiro CC (2003). A comparison of direct macrofaunal mortality using three types of clam dredges. *ICES J. Mar. Sci.* 60: 733–742.
- Gharbi A, Chatti N, Said K, Wormhoudt AV (2010). Genetic variation and population structure of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* along the Tunisian coast inferred from mtDNA and ITS1 sequence analysis. *Biologia* 65/4: 688–696.
- Gibson R, Hextall B, Rogers A (2001). *Photographic Guide to the Sea and Shore Life of Britain and Northwest Europe*. Oxford, UK, Oxford University Press, 450 pp.
- 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.
- Gosling E (2015). Phylogeny and evolution of bivalves molluscs. In: *Marine Bivalve Molluscs*. pp. 1-11. John Wiley & Sons, 2nd Edition.
- Hayward, PJ & Ryland, JS (2008). Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe. *Oxford: Oxford University Press*.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society, London B* 270: 313-321.
- Houart R (2000). New species of Muricidae (Gastropoda) from the northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea. *Zoosystema* 22: 459-469.

- Jennings RM, Bucklin A, Ossenbrügger H, Hopcroft RR (2010). Species diversity of planktonic gastropods (Pteropoda and Heteropoda) from six ocean regions based on DNA barcode analysis. *Deep-Sea Research II* 57: 2199–2210.
- Kawauchi GY & Giribert G (2011). On the ampho-Atlantic *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Heterobranchia: Siphonariidae): Invader from the east or endemic? *Journal of Molluscan Studies* 77: 196-201.
- Kempainen P, Panova M, Hollander J, Johannesson K (2009). Complete lack of mitochondrial divergence between two species of NE Atlantic marine intertidal gastropods. *J. EVOL. BIOL.* 22: 2000-2011.
- Kimura M (1980). A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Knowlton N & Weigt LA (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265: 2257-2263.
- Layton KKS, Martel AL, Hebert PDN (2014). Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs. *PLoS ONE* 9: e95003.
- Leitão F, Baptista V, Erzini K, Iritani D, Zeller D (2014). Reconstruction of mainland Portugal fisheries catches 1950-2010. Fisheries Centre, University of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews* 90: 157-166.
- Lobo J, Costa PM, Teixeira MAL, Ferreira MSG, Costa MH, Costa FO (2013). Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BioMed Central Ecology*, 13: 34.
- Lobo J, Teixeira MAL, Borges LMS, Ferreira MSG, Hollatz C, Gomes PT, Sousa R, Ravara A, Costa MH, Costa FO (2015). Starting a DNA barcode reference library for shallow water polychaetes from the southern European Atlantic coast. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12441.
- Lyra F (2007). Caracterização da Comunidade de Macroinvertebrados Bentônicos do Estuário do Rio Minho – Sua Relação com a Distribuição de Poluentes no Sedimento. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada.
- Macedo MC, Macedo MI, Borges J (1999). Conchas Marinhas de Portugal. Editora Verbo, Lisboa, Portugal (516 pp.).

- Marko PB & Moran AL (2009). Out of sight, out of mind: high cryptic diversity obscures the identities and histories of geminate species in the marine bivalve subgenus *Acar*. *J Biogeogr* 36: 1861–1880.
- Martins R, Azevedo MR, Mamede R, Sousa B, Freitas R, Rocha F, Quintino V, Rodrigues AM (2012). Sedimentary and geochemical characterization and provenance of the Portuguese continental shelf soft-bottom sediments. *J. Mar. Syst.* 91: 41–52.
- Martins R, Sampaio L, Quintino V, Rodrigues AM (2014). Diversity, distribution and ecology of benthic molluscan communities on the Portuguese continental shelf. *Journal of Sea Research* 93: 75-89.
- McLusky DS & Elliott M (2004). The estuarine ecosystem: Ecology, threats, and management. Oxford University Press.
- Meyer C (2003). Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 401-459.
- Mikkelsen NT, Schander C, Willassen E (2007). Local scale DNA barcoding of bivalver (Mollusca): a case study. *Zoologica Scripta* 36: 455-463.
- Milstein D & Saunders GW (2012). DNA barcoding of Canadian Ahnfeltiales (Rhodophyta) reveals a new species - *Ahnfeltia borealisp.* nov. *Phycologia* 51: 247-259.
- Mitchell A (2008). DNA barcoding demystified. *Australian Journal of Entomology* 47: 169-173.
- Nuryanto A, Duryado D, Soedharma D, Blohm D (2007). Molecular Phylogeny of Giant Clams Based on Mitochondrial DNA Cytochrome C Oxidase I Gene. *HAYATI Journal of Biosciences* 14: 162-166.
- Oliveira A, Santos AI, Rodrigues A, Vitorino J (2007). Sedimentary particle distribution and dynamics on the Nazaré canyon system and adjacent shelf (Portugal). *Mar. Geol.* 246: 105–122.
- Plazzi F, Ceregato A, Taviani M, Passamonti M (2011). A Molecular Phylogeny of Bivalve Mollusks: Ancient Radiations and Divergences as Revealed by Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 6: e27147.
- Puillandre N, Strong EE, Bouchet P, Boisselier M-C, Couloux A, Samadi S (2009). Identifying gastropod spawn from DNA barcodes: possible but not yet practicable. *Molecular Ecology Resources* 9: 1311-1321.
- Quesada H, Gallagher C, Skibinski DAG, Skibinski DOF (1998). Patterns of polymorphism and gene flow of gender-associated mitochondrial DNA lineages in European mussel populations. *Molecular Ecology* 7: 1041-1051.
- Radulovici AE, Archambault P, Dufresne F (2010). DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity* 2: 450-472.
- Ratnasingham S & Hebert PDN (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.

- Ratnasingham S & Hebert PDN (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE* 8: e66213.
- Rueda J, Gofas S, Urrea J, Salas C (2009). A highly diverse molluscan assemblage associated with eelgrass beds (*Zostera marina* L.) in the Alboran Sea: microhabitat preference, feeding guilds and biogeographical distribution. *Sci. Mar.* 73: 679–700.
- Saitou N & Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Saldanha (1995). Fauna Marinha Atlântica. Publicações Europa-America. Mem-Martins, Portugal (364 pp.).
- 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. *PLoS ONE* 9: e108696.
- Sá-Pinto A, Branco M, Harris DJ, Alexandrino P (2005). Phylogeny and phylogeography of the genus *Patella* based on mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325: 95– 110.
- Schander C & Willassen (2005). What can biological barcoding do for marine biology?. *Marine Biology Research* 1: 79-83.
- Sheehan D & Power A (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 123: 193-199.
- Smith MA, Eveleigh ES, McCann KS, Merilo M, McCarthy PC, Van Rooyen KI (2011). Barcoding a quantified food web: crypsis, concepts, ecology and hypotheses. *PLoS ONE* 6: e14424.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rarebiosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12115-12120.
- Solas MR, Hughes RG, Márquez F, Brantel A (2015). Early plastic responses in the Shell morphology of *Acanthina monodon* (Mollusca, Gastropoda) under predation risk and water turbulence. *Marine Ecology Progress Series* 527: 133-142.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are amplified. *Proceedings of the National Academy of Science* 105: 13486-13491.

- Stockinger H, Krüger M, Schübler A (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474.
- Stöger I, Sigwart JD, Kano Y, Knebelberger T, Marshall BA, Schwabe E, Schrödl M (2013). The Continuing Debate on Deep Molluscan Phylogeny: Evidence for Serialia (Mollusca, Monoplacophora + Polyplacophora). *BioMed research international*.
- Strong EE, Gargominy O, Ponder WF, Bouchet P (2008). Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 149-166.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence Alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2008). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110-117.
- Van Der Bank H, Herbertz D, Greenfield R, Yessoufou K (2013). Revisiting species delimitation within the genus *Oxystele* using DNA barcoding approach. *ZooKeys* 365: 337–354.
- Wares JP & Cunningham CW (2001). Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455-2469.
- Weber LI & Hawkins ESJ (2005). *Patella aspera* and *P. ulyssiponensis*: genetic evidence of speciation in the North-east Atlantic. *Marine Biology* 147: 153-162.
- Williams ST, Donald KM, Spencer HG, Nakano T (2010). Molecular systematics of the marine gastropod families Trochidae and Calliostomatidae (Mollusca: Superfamily Trochoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 783-809.
- Zapata F, Wilson NG, Howison M, Andrade SCS, Jörgen KM, Schrödl M, Goetz FE, Giribert G, Dunn CW (2014). Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 281: 1-26.
- Zou S, Li Q, Kong L (2012). Monophyly, Distance and Character-Based Multigene Barcoding Reveal Extraordinary Cryptic Diversity in *Nassarius*: A Complex and Dangerous Community. *PLoS ONE* 7: e47276.

7. Anexos

Anexo 1 - Protocolo E.Z.N.A. (Mollusc da OMEGA Bio-Tek):

1. Extração de uma secção do tecido da amostra (que vai depender do tamanho do organismo), homogeneizar com a ajuda de um bisturi, e transferir para um microtubo de 1,5 mL autoclavado, esterilizar o bisturi e pinça na chama antes e após cada utilização.
2. Adicionar 350 µl *ML1 Buffer* e 25 µl de *Proteinase K*. Agitar a solução no vortex para misturar tudo.
3. Incubar a 60°C por 30/60 minutos ou até que toda a amostra esteja solubilizada (Nota: o tempo de incubação varia e depende da elasticidade do tecido; a maioria das amostras requer mais de 4 h; a incubação pode ser realizada durante a noite a 37°C)
4. Adicionar 350 µl de *chloroform:isoamyl alcohol* (24:1). Agitar a solução no vortex para misturar tudo.
5. Centrifugar a 10,000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir a fase aquosa superior para um microtubo de 1,5 mL autoclavado. Evitar a interface turva pois contém contaminantes e inibidores. (Se a fase aquosa superior for pequena após a centrifugação, adicionar 200 µl de *ML1 Buffer* e agitar a solução no vortex para misturar tudo, e repetir os passos 5 e 6)
7. Adicionar um volume de *MBL Buffer* e 10 µl de *RNase*. Agitar a solução à velocidade máxima por 15 segundos no vortex. (Nota: por exemplo, para 500 µl de solução aquosa superior, no passo 6 adiciona-se 500 µl de *MBL Buffer*).
8. Incubar a 70°C por 10 minutos.
9. Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
10. Adicionar um volume de etanol 100%. Agitar a solução no vortex à velocidade máxima por 15 segundos (Nota: por exemplo, para 500 µl de solução aquosa superior, no passo 6 adiciona-se 500 µl de etanol 100 %).
11. Inserir a *HiBind® DNA Mini Column* num *Collection Tube* de 2 mL.

Protocolo opcional para o equilíbrio da coluna:

- a. Adicionar 100 µl de Equilibration Buffer no *HiBind® DNA Mini Column*.
- b. Centrifugar à velocidade máxima por 1 minuto.
- c. Descartar o filtrado e reutilizar o *Collection Tube*.

12. Transferir 750 µl de amostra do passo 9 para a *HiBind® DNA Mini Column*.
13. Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
14. Repetir os passos 12-14 até que toda a amostra tenha sido aplicada na *HiBind® DNA Mini Column*.
15. Descartar o filtrado e o *Collection Tube*.
16. Inserir a *HiBind® DNA Mini Column* num novo *Collection Tube* de 2 mL.
17. Adicionar 500 µl de *HBC Buffer*.
18. Centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos.
19. Descartar o filtrado e reutilizar o *Collection Tube*.
20. Adicionar 700 µl de *DNA Wash Buffer* (Nota: Antes de o *DNA Wash Buffer* ser diluído com etanol 100%)
21. Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
22. Descartar o filtrado e reutilizar o *Collection Tube*.
23. Repetir ao passos 21-23 para um segundo passo de *DNA Wash Buffer*.
24. Centrifugar a *HiBind® DNA Mini Column* vazia à velocidade máxima por 2 minutos para secar a membrana (Nota: É crítico remover algum traço de etanol, pois pode interferir com aplicações mais abaixo).
25. Transferir o *HiBind® DNA Mini Column* para um microtubo de 1,5 mL autoclavado.
26. Adicionar 50-100 µl de *Elution Buffer* pré-aquecido a 70°C.
27. Deixar repousar à temperatura ambiente por 2 minutos.
28. Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
29. Repetir os passos 27-29 para um segundo passo com *Elution Buffer* (pode ser usada qualquer uma das combinações).
 - a. Após adicionar o *Elution Buffer*, incubar a coluna por 5 minutos;
 - b. Aumentar o volume do *Elution Buffer*,
 - c. Repetir os passos com *Elution Buffer* novo;
 - d. Repetir os passos com o *Elution Buffer* do primeiro passo.
30. Armazenar o *DNA* a -20°C.

Anexo 2/Tabela T1 – Localização e coordenadas dos 27 locais onde os espécimes de bivalves e gastrópodes utilizados para a construção da biblioteca de referência foram colhidos entre 2009 e 2015.

Locais de Recolha	Coordenadas
1. Praia do Canto Marinho	41.73; -8.86
2. Praia Norte	41.70; -8.85
3. Praia do Cabedelo	41.68; -8.83
4. Praia do Cabedelo	41.68; -8.82
5. Apúlia	41.48; -8.87
6. São Jacinto	40.67; -8.77
7. São Jacinto 2	40.65; -8.72
8. Barra	40.64; -8.68
9. Ria de Aveiro	40.64; -8.65
10. Ria de Aveiro 2	40.62; -8.74
11. Lagoa de Óbidos	39.43; -9.22
12. Quatro Ribeiras	38.77; -27.20
13. Praia da Bafureira	38.70; -9.39
14. Troia 1	38.50; -8.84
15. Troia 2	38.49; -8.83
16. Troia 3	38.47; -8.87
17. Troia 4	38.46; -8.86
18. Canal do Alcácer	38.40; -8.64
19. Sines 1	37.93; -8.82
20. Sines 2	37.91; -8.80
21. Mosteiros	37.89; -25.82
22. Ponta Delgada	37.73; -25.66
23. Caloura	37.70; -25.50
24. Praia do Carvoeiro	37.10; -8.49
25. Praia de Faro	37.01; -8.00
26. Oceano Atlântico (Algarve)	36.87; -8.53
27. Oceano Atlântico (Algarve)	36.78; -8.42

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo.

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Anadara</i> sp. (2)	KF369106; KF369107		Bivalvia	Arcoida	Arcidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013
<i>Cerastoderma edule</i> (4)	KJ659784; JQ319615	BVALN033-14; BVALN032-14	Bivalvia	Veneroidea	Cardiidae	Este estudo; Vergara-Chen <i>et al.</i> , 2015; Mikhailova <i>et al.</i> , não publicado
<i>Crassostrea angulata</i> (5)	JQ027306; DQ659373; AB904879	BVALN038-15; BVALN037-15	Bivalvia	Ostreoida	Ostreidae	Este estudo; Cardoso <i>et al.</i> , 2006; Hsiao, 2011; Hamaguchi & Hamaguchi, 2014
<i>Gari fervensis</i> (1)		BVALN042-15	Bivalvia	Veneroidea	Psammobiidae	Este estudo
<i>Mytilus edulis</i> (7)	JF301826; KR084911; KF369155; KF369153; KF369154	BIV043-14; BIV037-14	Bivalvia	Mytiloidea	Mytilidae	Este estudo; Prieto-Araya <i>et al.</i> , 2011; Lobo <i>et al.</i> , 2013; Barco <i>et al.</i> , 2015
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (6)	KC107719; KC789270	BIV047-14; BIV018-11; BIV053-14; BIV040-14	Bivalvia	Mytiloidea	Mytilidae	Este estudo; Keskin, 2013
<i>Mytilus</i> sp. (3)		BIV004-10; BIV006-10; BIV005-10	Bivalvia	Mytiloidea	Mytilidae	Este estudo
<i>Nucula sulcata</i> (4)	KF369158; KF369160; KF369159; KC984746		Bivalvia	Nuculida	Nuculidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013
<i>Ostrea edulis</i> (2)	AF120651	BIV073-14	Bivalvia	Ostreoida	Ostreidae	Este estudo; Giribet & Wheeler, 1999
<i>Parvicardium exiguum</i> (2)	AF120664	BVALN039-15	Bivalvia	Veneroidea	Cardiidae	Este estudo; Giribet & Wheeler, 1999
<i>Ruditapes decussatus</i> (4)	KR084894; KC789433	BIV074-14; BIV076-14	Bivalvia	Veneroidea	Veneridae	Este estudo; Keskin, 2013; Barco <i>et al.</i> , 2015

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Ruditapes philippinarum</i> (3)	JN054584; GQ855265	BIV059-14	Bivalvia	Veneroidea	Veneridae	Este estudo; Chen <i>et al.</i> , 2009; Mao <i>et al.</i> , 2011
<i>Scrobicularia plana</i> (3)		BVALN047-15; BVALN045-15; BVALN046-15	Bivalvia	Veneroidea	Semelidae	Este estudo
<i>Solen marginatus</i> (5)	EU523672	BVALN028-14; BVALN029-14; BVALN031-14; BVALN030-14	Bivalvia	Veneroidea	Solenidae	Este estudo; Fernandez-Moreno <i>et al.</i> , 2008
<i>Spisula subtruncata</i> (3)	KR084599	BVALN040-15; BVALN041-15	Bivalvia	Veneroidea	Macridae	Este estudo; Barco <i>et al.</i> , 2015
<i>Armina maculata</i> (3)	KF369111	GTALE013-14; GTALE012-14	Gastropoda	Nudibranchia	Arminidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Berghia columbina</i> (1)	JX087544		Gastropoda	Nudibranchia	Aeolidiidae	Carmona <i>et al.</i> , 2012
<i>Berghia verrucicornis</i> (7)	JX087553; JX087554; HQ616749; HQ616750	LMBAG088-11; LMBAG087-11; LMBAG086-11	Gastropoda	Nudibranchia	Aeolidiidae	Carmona <i>et al.</i> , 2011; Carmona <i>et al.</i> , 2012; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Berthella plumula</i> (3)	KF369114; KF369115	GTALE003-09	Gastropoda	Pleurobranchomorpha	Pleurobranchidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Calliostoma</i> sp. (1)		LMBAG089-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Calliostomatidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Calliostoma virescens</i> (2)		LMBAG090-11; LMBAG091-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Calliostomatidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Calliostoma zyziphinum</i> (5)	KR084610; KR084821; KR084401	GTALE033-15; GTALE034-15	Gastropoda	Archaeogastropoda	Calliostomatidae	Barco <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Cingula trifasciata</i> (2)		LMBAG036-11; LMBAG035-11	Gastropoda	Sorbeoconcha	Rissoidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Crepidula fornicata</i> (3)	AF353124; AF353131	BIV075-14	Gastropoda	Littorinimorpha	Calyptraeidae	Collin, 2001; Borges <i>et al.</i> , submetido

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Euspira nitida</i> (3)	KR084384; KR084454	GTALE036-15	Gastropoda	Littorinimorpha	Naticidae	Barco <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Gibbula cineraria</i> (6)	AM049339; KJ183016	LMBAG065-11; LMBAG064-11; LMBAG204-11; LMBAG205-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Williams & Ozawa, 2005; Cowart <i>et al.</i> , 2014; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Gibbula delgadensis</i> (3)		LMBAG026-11; LMBAG025-11; LMBAG027-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Gibbula pennanti</i> (1)	GQ232365		Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Williams <i>et al.</i> , 2009
<i>Gibbula</i> sp. (4)		LMBP064-10; LMBP044-10; LMBP045-10; LMBP010-09	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Gibbula umbilicalis</i> (8)	JN686274; JN686278	LMBP080-11; LMBP173-14; LMBAG092-11; LMBAG093-11; LMBP174-14; LMBP079-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Donald <i>et al.</i> , 2011; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Gibbula varia</i> (4)	JQ839392; JQ839395; JX887429; JX887427		Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Evans <i>et al.</i> , 2012; Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Hexaplex trunculus</i> (5)	AM712610; AM712612; KF297420; EU391577	LMBAG076-11	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Claremont <i>et al.</i> , 2007; Gonzalez-Tizon <i>et al.</i> , 2007; Villamor <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Jujubinus exasperatus</i> (1)	GQ232368		Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Williams <i>et al.</i> , 2009
<i>Jujubinus pseudogravinae</i> (1)		LMBAG040-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Littorina arcana</i> (1)	HE590832		Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Reid <i>et al.</i> , 2012
<i>Littorina compressa</i> (1)	HE590834		Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Reid <i>et al.</i> , 2012
<i>Littorina fabalis</i> (1)	HE590835		Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Reid <i>et al.</i> , 2012

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Littorina littorea</i> (4)	KR084730; EU876214	LMBAG020-11; LMBAG021-11	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Blakeslee <i>et al.</i> , 2008; Barco <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Littorina obtusata</i> (4)	AF242086; AJ622947	LMBP043-10; LMBP073-10	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Wares <i>et al.</i> , 2002; Williams & Reid, 2004; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Littorina saxatilis</i> (5)	KR084590; JN241971	LMBP037-09; LMBP050-10; LMBP033-09	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Prado-Sanchez <i>et al.</i> , 2011; Barco <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Mitra cornea</i> (2)		LMBP130-11; LMBP131-11	Gastropoda	Neogastropoda	Mitridae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Nassarius incrassatus</i> (6)	NEOGA1001; NEOGA1002; NEOGA1003 (Bold system)	LMBP134-11; LMBP133-11; LMBP135-11	Gastropoda	Neogastropoda	Nassariidae	Puillandre & Gofas, não publicado; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Nassarius reticulatus</i> (7)	KR084429; KJ183015; KF369157; KF369156	LMBAG058-11; LMBP017-09; LMBP008-09	Gastropoda	Neogastropoda	Nassariidae	Cunha <i>et al.</i> , 2008; Cowart <i>et al.</i> , 2014; Barco <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Nassarius</i> sp. (1)		LMBP063-10	Gastropoda	Neogastropoda	Nassariidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Nucella lapillus</i> (9)	DQ501708; AF242153; KF644315; FN651945	LMBP081-11; LMBAG055-11; LMBP013-09; LMBP014-09; LMBP012-09	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Wares & Cunningham, 2000; Guerra-Varela <i>et al.</i> , 2006; Layton <i>et al.</i> , 2013; Barco, 2009; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Ocenebra erinaceus</i> (6)	KF369163; KF369161; KF369162	LMBP056-10; LMBP007-09; LMBP023-09	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Ocenebrina aciculata</i> (4)	FR851900; FR851905; KF199911; KF199917;		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2011; Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina edwardsii</i> (5)	KF153263; KF153478; KF153443	LMBAG068-11; LMBAG067-11	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Ocenebrina hispidula</i> (3)	KF153274; KF153302; KC883664		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina ingloria</i> (3)	KF153316; KF153394; KF153437		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina leukos</i> (1)	KF153286		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina lurida</i> (1)	KF643785		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Layton <i>et al.</i> , 2014
<i>Ocenebrina miscowichae</i> (3)	KF153350; KF153346; KF153417		Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina nicolai</i> (3)	KF153446; KF153281; KF153434		Gastropoda			Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina piantonii</i> (1)	KF153271		Gastropoda			Barco <i>et al.</i> , 2013
<i>Ocenebrina</i> sp. (1)		LMBP164-11	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Patella aspera</i> (5)	EF462971	LMBP138-11; LMBP097-11; LMBP099-11; LMBP098-11	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Borrel <i>et al.</i> , 2007; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Patella candei</i> (9)	JF763831; DQ089564	LMBP151-11; LMBP152-11; LMBP083-11; LMBP082-11; LMBP153-11; LMBP085-11; LMBP084-11	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Sá-Pinto <i>et al.</i> , 2005; Carreira <i>et al.</i> , 2011; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Patella depressa</i> (9)	JF937119; JF937156	LMBAG084-11; LMBP076-11; LMBAG085-11; LMBP075-11; LMBAG070-11; LMBAG071-11; LMBAG072-11	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Munoz-Colmenero <i>et al.</i> , 2011; Borges <i>et al.</i> , submetido

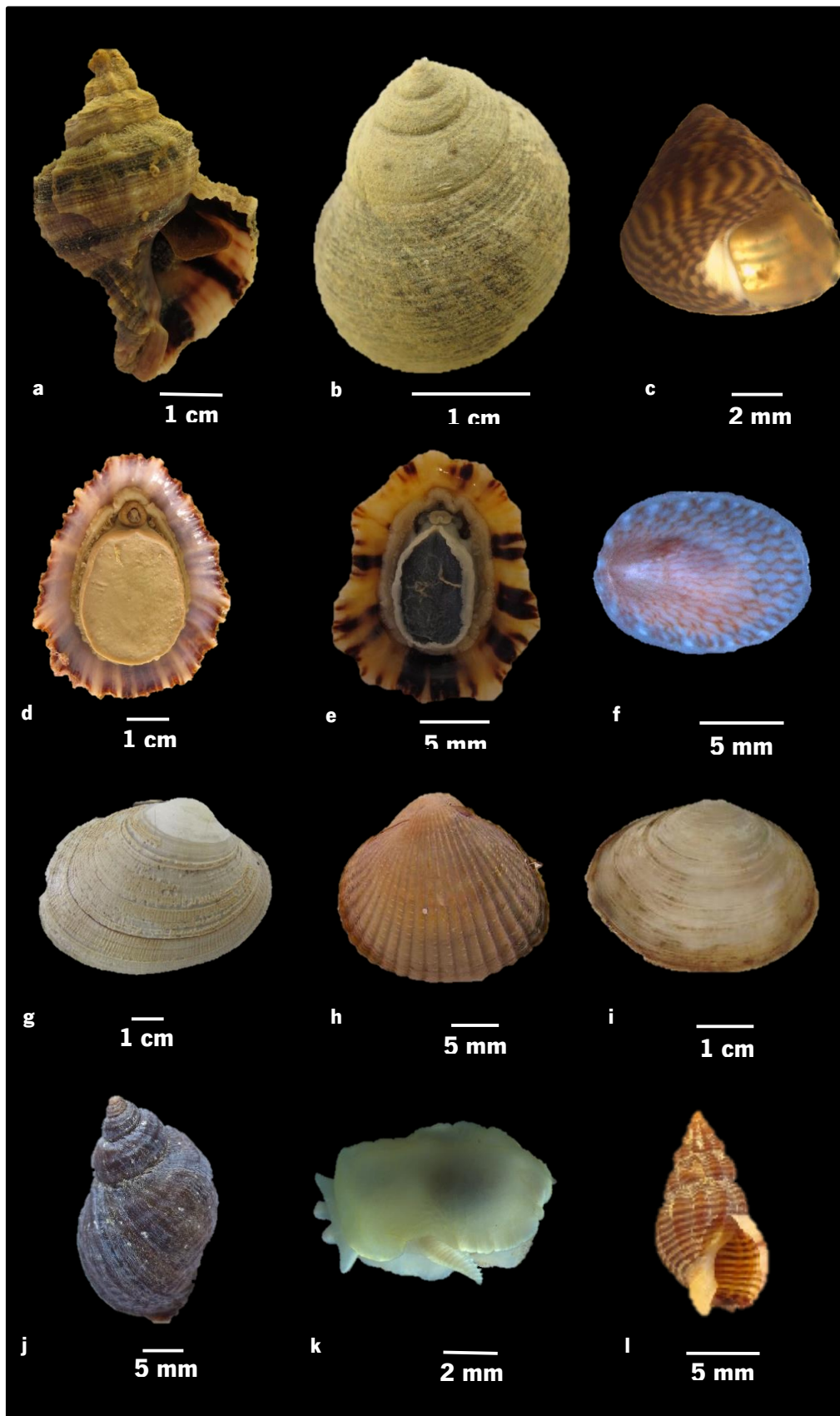
Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Patella pellucida</i> (2)	DQ089621	LMBP018-09	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Sá-Pinto <i>et al.</i> , 2005; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Patella ulyssiponensis</i> (4)	DQ089596	LMBP015-09; LMBP029-09; LMBP016-09	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Sá-Pinto <i>et al.</i> , 2005; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Patella vulgata</i> (8)	AB238580; JF937189	LMBP040-09; LMBP039-09; LMBP041-09; LMBP019-09; LMBP038-09; LMBP020-09	Gastropoda	Docoglossa	Patellidae	Nakano & Ozawa, 2005; Munoz-Colmenero <i>et al.</i> , 2011; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Phorcus lineatus</i> (15)	JN686332; JN686323; JN686326; KP064768	LMBAG061-11; LMBAG062-11; LMBAG081-11; LMBP009-09; LMBAG012-11; LMBAG245-11; LMBP096-11; LMBAG063-11; LMBAG083-11; LMBAG082-11; LMBAG011-11	Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Donald <i>et al.</i> , 2011; Munoz- Colmenero <i>et al.</i> , 2014; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Phorcus sauciatus</i> (3)	KF369166; JN686313; JN686311		Gastropoda	Archaeogastropoda	Trochidae	Donald <i>et al.</i> , 2011; Lobo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Siphonaria pectinata</i> (8)	AB871789; KJ407368; HQ386654	LMBP077-11; LMBP078-11; LMBAG054-11; LMBAG052-11; LMBAG053-11	Gastropoda	Pulmonata	Siphonariidae	Kawauchi & Giribet, 2010; Nakano, 2013; Giribet <i>et al.</i> , 2014; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Tectarius striatus</i> (3)	KC990635	LMBP086-11; LMBP144-11	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Galindo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Tectura virginea</i> (2)	AB238541	LMBP026-09	Gastropoda	Patellogastropoda	Lottiidae	Nakano & Ozawa, 2005; Borges <i>et al.</i> , submetido

Anexo 3/ Tabela T2: Espécies, número de espécimes, ordens e famílias, números de acesso do GenBank de todas as sequências incluídas neste estudo, números de identificação na BOLD de todas as sequências obtidas neste estudo (continuação).

Espécie (nº de espécimes)	Nº Acesso do GenBank	Nº Identificação da BOLD	Classe	Ordem	Família	Fonte
<i>Tricolia pullus azorica</i> (2)		LMBAG029-11; LMBAG028-11	Gastropoda	Vetigastropoda	Phasianellidae	Borges <i>et al.</i> , submetido
<i>Vermetus triquetrus</i> (1)	KF369193		Gastropoda	Sorbeoconcha	Vermetidae	Lobo <i>et al.</i> , 2013; Borges <i>et al.</i> , submetido

Anexo 4/Figura F1



Anexo 4/Figura F1 – Imagens selecionadas de alguns espécimes de gastrópodes e bivalves deste estudo. a – *Hexaplex trunculus*, b – *Littorina littorea*, c- *Gibbula cineraria*, d – *Patella aspera*, e – *Patella depressa*, f – *Tectura virginea*, g – *Ruditapes decussatus*, h – *Cerastoderma edule*, i – *Scrobicularia plana*, j – *Nucella lapillus*, k – *Berthella plumula*, l – *Nassarius incrassatus*.

Anexo 5/Tabela T3 - Divergência intraespecífica e desvio padrão, calculados com o modelo de substituição nucleotídica K2P.

Espécie (número de espécimes)	Divergência intraespecífica (K2P) ± d.p.
<i>Armina maculata</i> (3)	0,32 ± 0,002
<i>Berghia verrucicornis</i> (7)	0,87 ± 0,002
<i>Berthella plumula</i> (3)	0,41 ± 0,002
<i>Calliostoma virescens</i> (2)	0 ± 0
<i>Calliostoma zizyphinum</i> (5)	1,67 ± 0,003
<i>Cerastoderma edule</i> (4)	0,34 ± 0,002
<i>Cingula trifasciata</i> (2)	1,67 ± 0,005
<i>Crassostrea angulata</i> (5)	0,73 ± 0,002
<i>Crepidula fornicata</i> (3)	1,82 ± 0,004
<i>Euspira nitida</i> (3)	1,13 ± 0,003
<i>Gibbula cineraria</i> (6)	1,37 ± 0,003
<i>Gibbula delgadensis</i> (3)	0,51 ± 0,002
<i>Gibbula pennanti</i> (5)	0,84 ± 0,003
<i>Gibbula umbilicalis</i> (8)	0,83 ± 0,002
<i>Gibbula varia</i> (4)	1,34 ± 0,003
<i>Hexaplex trunculus</i> (5)	0,54 ± 0,002
<i>Littorina littorea</i> (4)	0,29 ± 0,002
<i>Mitra cornea</i> (2)	0 ± 0
<i>Nassarius incrassatus</i> (6)	1,81 ± 0,003
<i>Nassarius reticulatus</i> (8)	0,47 ± 0,001
<i>Nucella lapillus</i> (9)	0,24 ± 0,001
<i>Nucula sulcata</i> (4)	0,23 ± 0,001
<i>Ocenebra erinaceus</i> (6)	0,30 ± 0,001
<i>Ocenebrina hispidula</i> (3)	0,31 ± 0,002
<i>Ocenebrina ingloria</i> (3)	0 ± 0
<i>Ocenebrina miscowichae</i> (3)	0,31 ± 0,002
<i>Ostrea edulis</i> (2)	0 ± 0
<i>Parvicardium exiguum</i> (2)	8,43 ± 0,012
<i>Patella aspera</i> (5)	0,12 ± 0,001
<i>Patella candei</i> (9)	1,52 ± 0,002
<i>Patella depressa</i> (9)	0,18 ± 0,001
<i>Patella pellucida</i> (2)	0,50 ± 0,003
<i>Patella vulgata</i> (8)	0,12 ± 0,001
<i>Patella ulyssiponensis</i> (4)	1,35 ± 0,003

Anexo 5/Tabela T3 - Divergência intraespecífica e desvio padrão, calculados com o modelo de substituição K2P (continuação).

Espécie	Divergência intraespecífica (K2P) ± d.p.
<i>Phorcus lineatus</i> (15)	0,97 ± 0,002
<i>Phorcus sauciatus</i> (3)	0,52 ± 0,002
<i>Ruditapes decussatus</i> (4)	15,34 ± 0,014
<i>Ruditapes philippinarum</i> (3)	1,04 ± 0,003
<i>Scrobicularia plana</i> (4)	0,72 ± 0,003
<i>Siphonaria pectinata</i> (8)	2,03 ± 0,003
<i>Solen marginatus</i> (5)	0,99 ± 0,003
<i>Spisula subtruncata</i> (3)	0,92 ± 0,003
<i>Tectarius striatus</i> (3)	0,20 ± 0,001
<i>Tectura virginea</i> (2)	0,65 ± 0,003
<i>Tricolia pullus azorica</i> (2)	0,68 ± 0,003

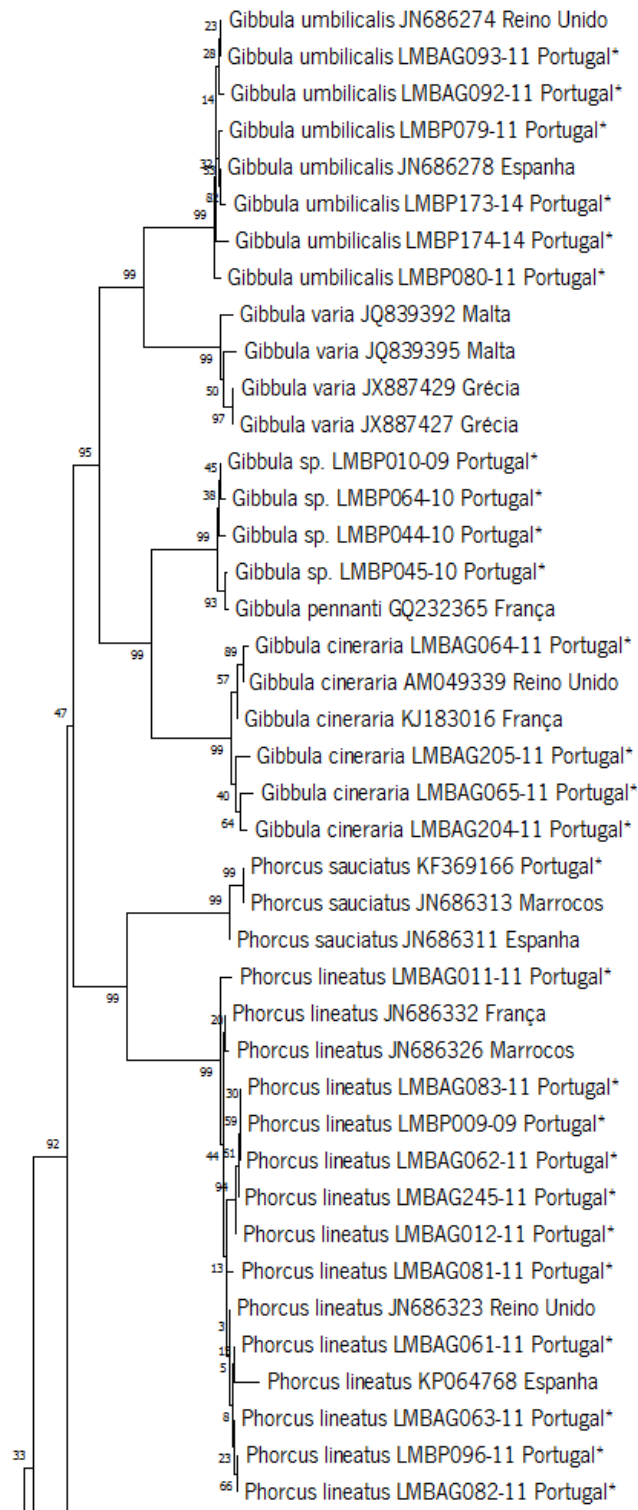
Anexo 6/Tabela T4 - Divergência congênica e desvio padrão, calculados com o modelo de substituição K2P.

Gênero	Divergência congênica (K2P) ± d.p.
<i>Berghia</i>	5,54 ± 0,005
<i>Calliostoma</i>	5,36 ± 0,006
<i>Gibbula</i>	12,90 ± 0,010
<i>Jujubinus</i>	7,18 ± 0,010
<i>Littorina</i>	7,15 ± 0,007
<i>Mytilus</i>	2,26 ± 0,003
<i>Nassarius</i>	9,88 ± 0,009
<i>Ocenebrina</i>	7,79 ± 0,007
<i>Patella</i>	10,73 ± 0,008
<i>Phorcus</i>	4,22 ± 0,005
<i>Ruditapes</i>	24,95 ± 0,018

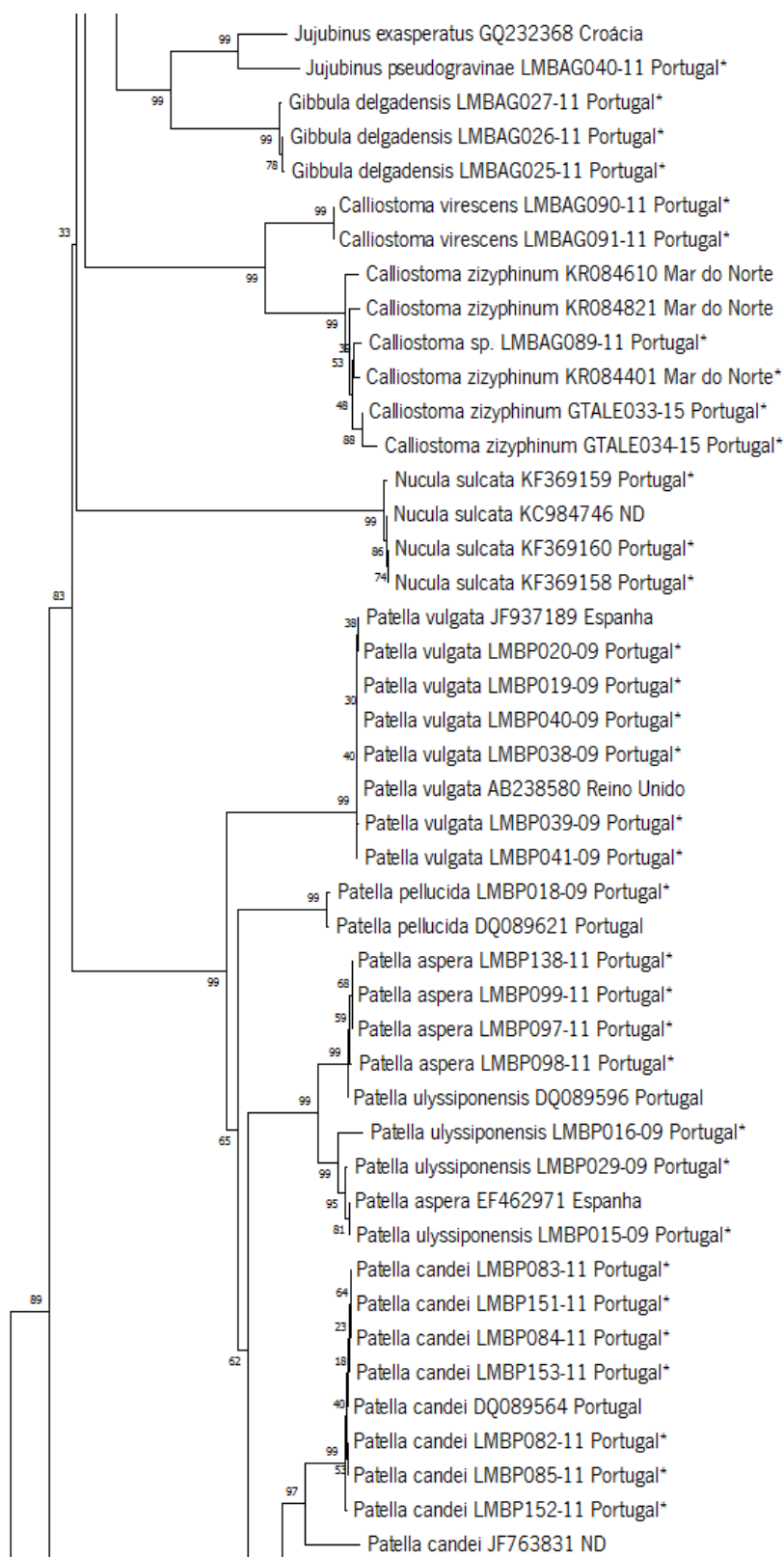
Anexo 7/Tabela T5 - Divergência confamiliar e desvio padrão, calculados com o modelo de substituição K2P.

Famílias	Divergência confamiliar (K2P) ± d.p.
Cardiidae	17,65 ± 0,013
Littorinidae	10,87 ± 0,008
Muricidae	11,81 ± 0,008
Ostreidae	14,74 ± 0,012
Trochidae	14,90 ± 0,010

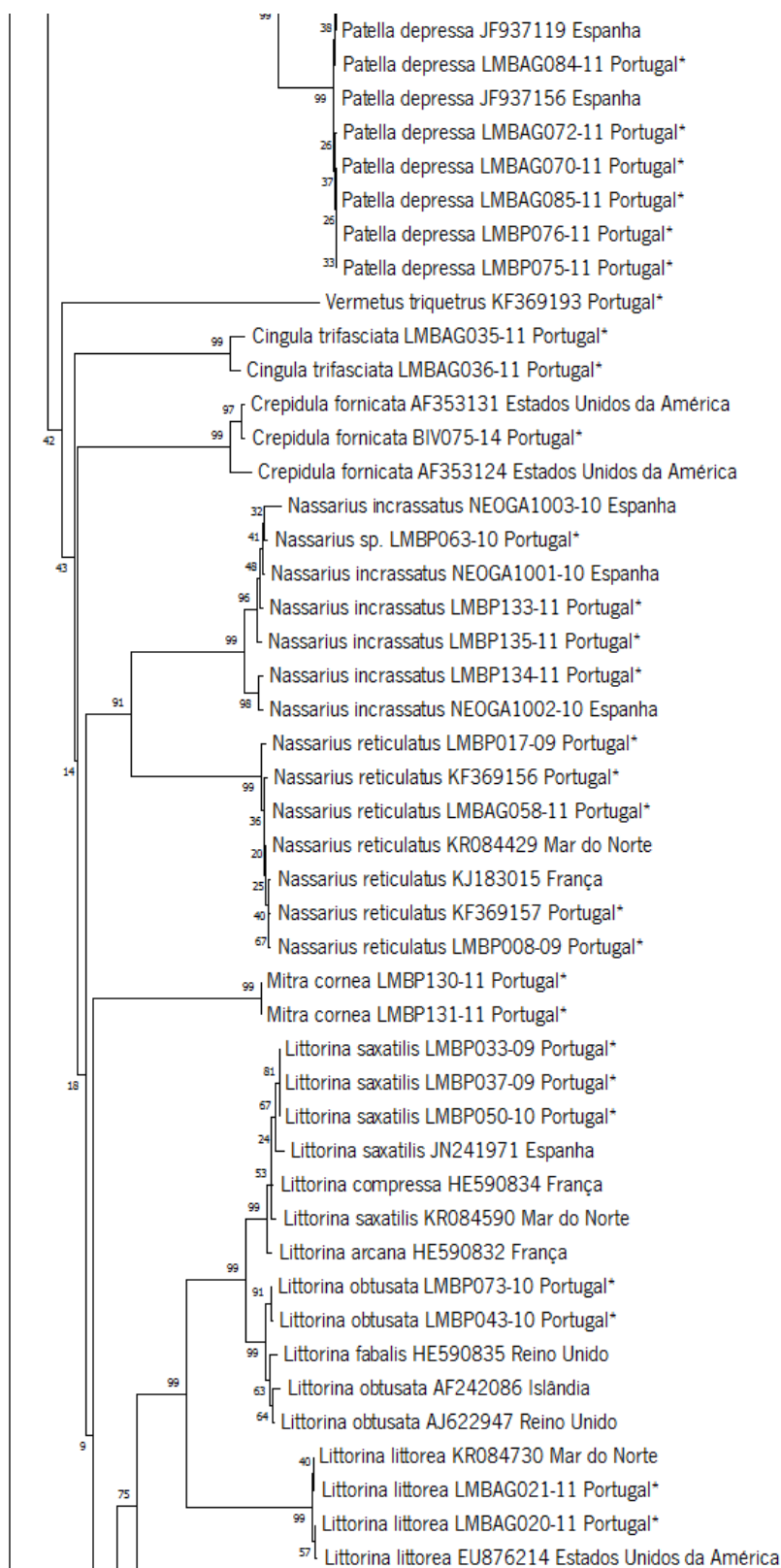
Anexo 8/Figura F2



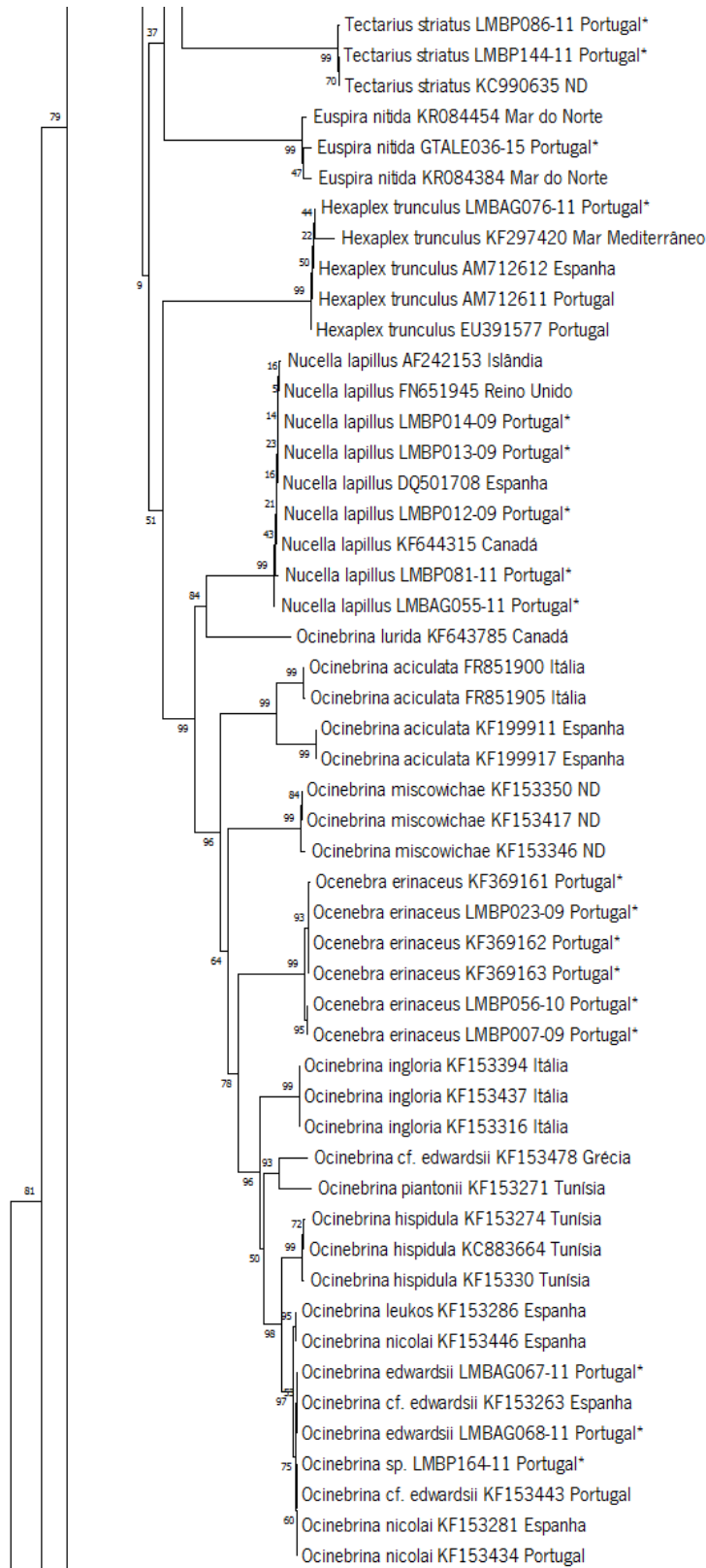
Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e em cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo.



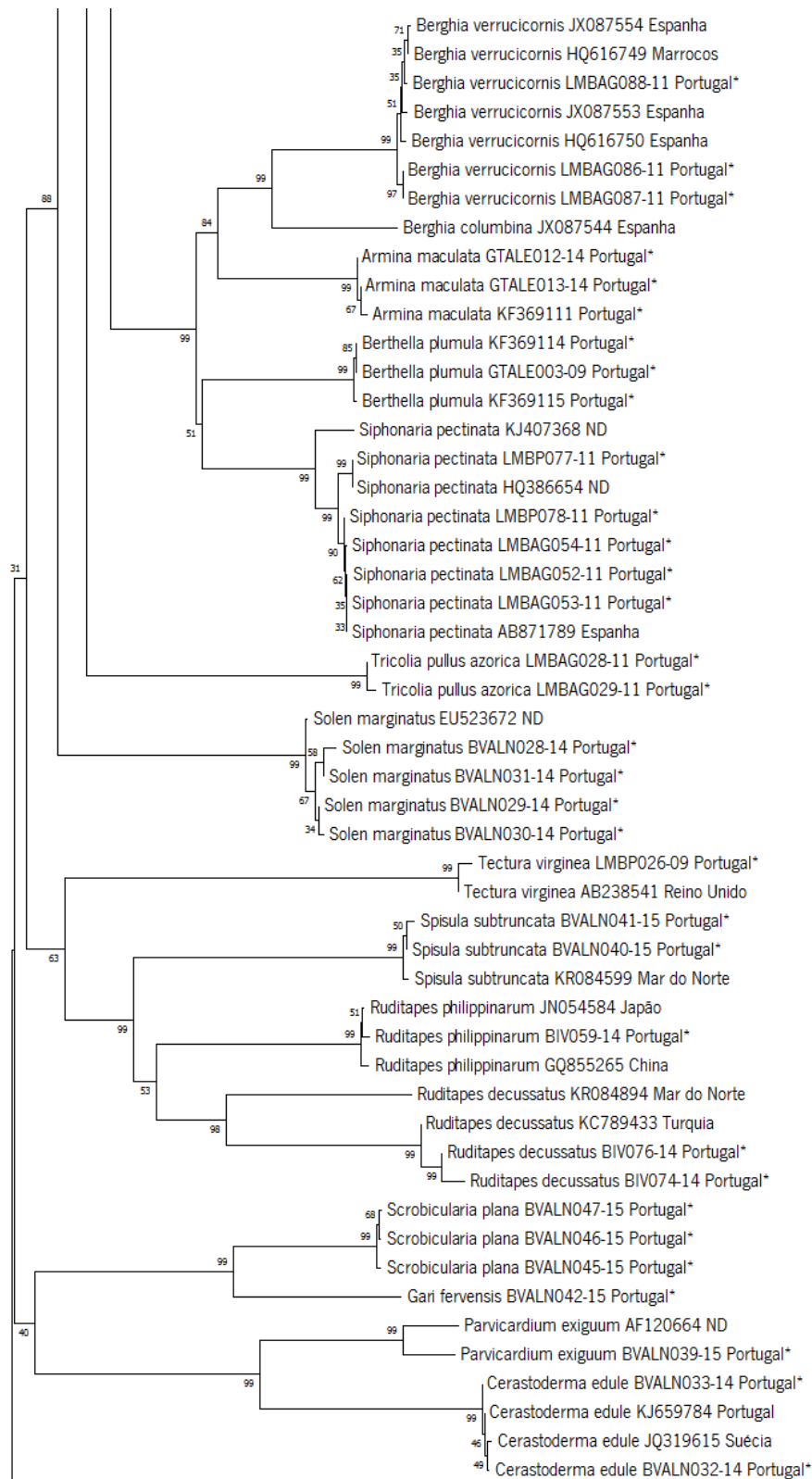
Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e me cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo (continuação).



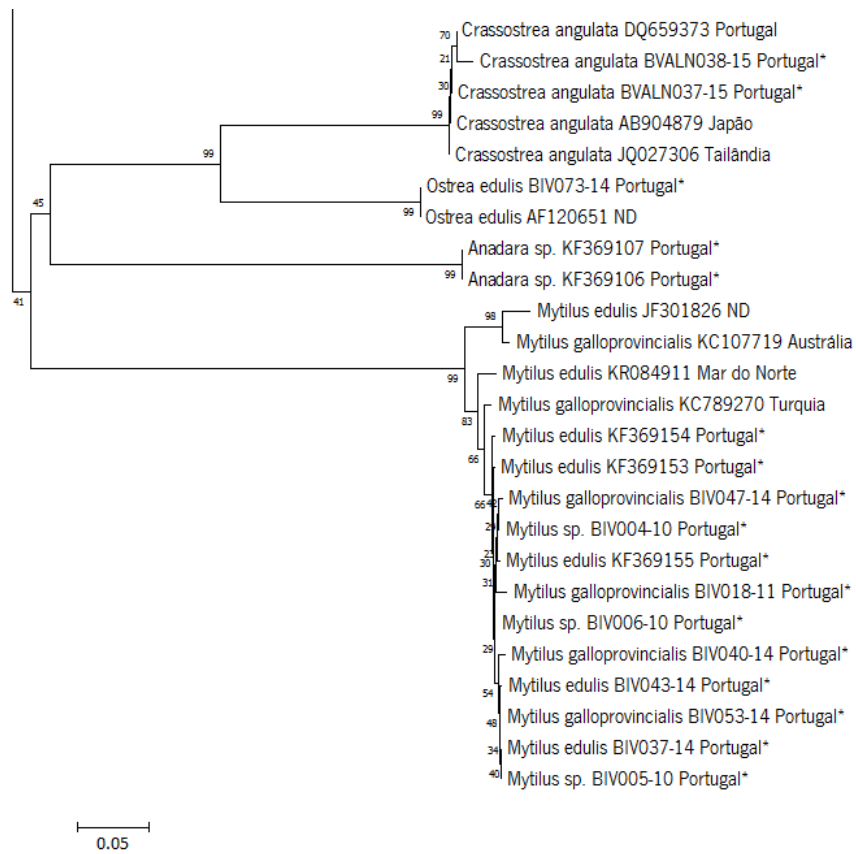
Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e em cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo (continuação).



Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e em cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo (continuação).



Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e em cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo (continuação).



Anexo 8/Figura F2 - Fenograma NJ de gastrópodes e bivalves de diversos locais geográficos. Foi aplicado o modelo de substituição K2P e em cada nó está apresentado o seu grau de suporte obtido através da análise *bootstrap* a partir de 1000 réplicas. Sequências marcadas com um asterisco representam as sequências deste estudo (continuação).