

Marina Nasri Sissini

**HAPALIDIACEAE (Corallinophycidae, Rhodophyta)  
no litoral brasileiro - diversidade e biogeografia**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Junior  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Cabral de Oliveira

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sissini, Marina Nasri  
HAPALIDIACEAE (Corallinophycidae, Rhodophyta) no  
litoral brasileiro - diversidade e biogeografia / Marina  
Nasri Sissini ; orientador, Paulo Antunes Horta ; co-  
orientadora, Mariana Cabral de Oliveira. - Florianópolis,  
SC, 2013.  
147 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.  
Hapalidiaceae. 3. DNA Barcoding. 4. Espécies crípticas. 5.  
Biogeografia. I. Horta, Paulo Antunes. II. Oliveira,  
Mariana Cabral de. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas. IV. Título.

**“HAPALIDIACEAE (Corallinophycidae, Rhodophyta)  
no litoral brasileiro - diversidade e biogeografia”**

por

**Marina Nasri Sissini**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 24/PPGFAP/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Junior  
(presidente/orientador - CCB/UFSC)

---

Dr. Rafael Riosmena Rodríguez  
(membro externo - UABCS)

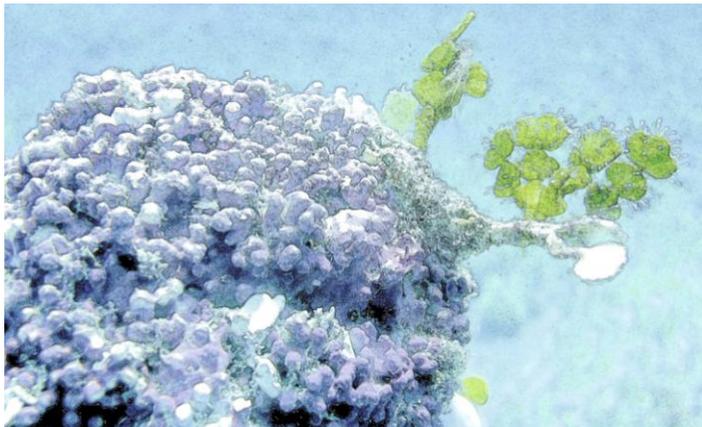
---

Dr. Sérgio Ricardo Floeter  
(membro interno - CCB/UFSC)

---

José Bonomi Barufi  
(membro interno - CCB/UFSC)





Rodolito com *Halimeda* epífita  
Ilha da Trindade|2012



## AGRADECIMENTOS

E-mail enviado no dia 18.X.2013:

*“Oi.. compartilho algo curioso, diria que muito inusitado, ocorrido agora há pouco...”*

*Saí para imprimir umas coisinhas e tomar um café (leia-se enrolar um pouco antes de fazer o que eu precisava fazer). Na saída do prédio, vi os moços (senhores na verdade) que limpam o Departamento sentados no banquinho e os cumprimentei como de costume "Bom dia, tudo bem?". Eles me responderam com o sorriso de sempre "Bom dia!" e algo mais... Um deles, o mais carismático, ao meu ver, completou: "Moça, quando que é sua defesa?". Levei um tempo para processar a frase, em questões de segundos vi meu cérebro percorrer áreas do inglês, francês, espanhol.. mas foi no português que ele encontrou a tradução para tal frase. Todos os dias quando os via, imaginava que eles nem sequer soubessem o que eu fazia ali, o que me motivava, durante anos, estar ali... Verdade que algumas temporadas mais ausentes, outras mais presentes. Sempre ficava a imaginar, secretamente, que eles não faziam nem ideia do que eu fazia! Não faziam ideia das coisas lindas que eu via, pelos lugares que andava.. Mas agora, meu "Bom dia" habitual me traz outras perguntas: Será que se questionavam por onde andava aquela menina alta meio atrapalhada da casinha branca durante minhas viagens? Enfim, respondi que seria dia 14 e o mesmo senhor me respondeu com um largo sorriso "Estamos aqui torcendo por você!" (!!!???)*

*Durante esse turbilhão final, o Paulo me disse: "Marina, é só uma dissertação". No momento, achei simplista demais para a complexidade do processo e o tanto de tensão que estava vivendo. Acho que agora compreendo. E concordo, em grau e número. É só uma dissertação, que afinal, são palavras e imagens cientificamente posicionadas tentando persuadir meu ponto de vista, que é mais empírico do que objetivo (contradições da ciência). São folhas que me garantirão outras folhas e linhas a mais nas já existentes.*

*Só uma dissertação. O que fica? São essas pessoas, os momentos vividos no dia-a-dia, o aprendizado que não pode ser traduzido em palavras, o tanto de pessoas que fizeram de tudo, para que tudo no final desse certo - e quantas não foram essas pessoas...”*

E a todas essas pessoas meu muitíssimo obrigado, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela paciência, pela amizade, pela confiança e pelos sorrisos:

Pai Luiz • Mãe Leyla • Vinicius • Paulo Horta • Mariana Oliveira • Allan • Anaclara • Anna • Bia • Carol Azevedo • Cecília • Cintia Iha • Cíntia Lhullier • Cíntia Martins • Clá e Davi • Dupla • Eduardo Bastos • Eliana • Eric • Eurico • Fábio Nauer • Gabiroba • Gui Longo • Ide • Jean Joyeux • João Lucas • José • Júlia Loc • Kaká • Letícia Canut • Letícia Maria • Lidiane • Lucas Cabral • Manuela • Mari Mungoli • Rosário • Sérgio Floeter • Talita • Thiony • Vanessa Borges

Agradeço ao Prof. Paulo e à Prof<sup>a</sup>. Mariana por me orientarem nesse início de jornada científica. À Capes pela bolsa de mestrado concedida e ao SISBIOTA por proporcionar parte das expedições de coleta.

À Marinha do Brasil, em nome do Comandante Otoch que possibilitou a Expedição na Ilha da Trindade e ao Miranda, Nobrega e Novaes que foram essenciais para a realização do nosso trabalho.

## RESUMO

As algas calcárias não articuladas compreendem cerca de 600 espécies e estão amplamente distribuídas em todos os oceanos, desde regiões tropicais até regiões polares e encontram-se da zona entre marés até 268m de profundidade. Muitas espécies são reconhecidas por ter uma ampla distribuição. Contudo, o uso de epítetos para espécimes morfológicamente semelhantes provenientes de localidades distantes, deve ser utilizado com cautela. Barreiras impostas à dispersão pela distância e condições ecofisiológicas, ou ainda, morfologias semelhantes como resultante de convergência evolutiva podem ter levado ao surgimento de espécies crípticas entre as Hapalidiaceae. No presente estudo, uma nova espécie de *Mesophyllum* é descrita para a província tropical brasileira e duas novas espécies de *Lithothamnion* para o estado do Espírito Santo, com base em dados morfológicos e moleculares. *M. cf. incisum* e *M. cf. engelhartii* também foram identificadas. Contudo, as divergências encontradas para os marcadores *psbA* e *rbcL*, quando comparadas a sequências disponíveis no *GenBank*, sugere a existência de espécies distintas sob o mesmo epíteto. Os espécimes brasileiros, incluindo a localidade tipo de *M. erubescens*, foram caracterizados morfológicamente e molecularmente. Após exaustiva comparação morfoanatômica, não foram observadas características diagnósticas de eventuais diferenças intra ou interespecíficas. Por outro lado, os dados de DNA plastidial indicam que as características morfológicas utilizadas na delimitação de *M. erubescens* não refletem a diversidade do taxa, este que deverá ser subdividido em pelo menos 12 novas espécies. Dessa forma, o uso da técnica de DNA *Barcoding* como uma ferramenta é fundamental na determinação de espécies e, eventualmente, de representantes deste complexo em outras regiões do planeta.

**Palavras-chave:** DNA *Barcoding*, Espécies Crípticas, *Mesophyllum erubescens*, Taxonomia Molecular.



## ABSTRACT

Non-geniculate coralline algae comprise about 600 species and are widely distributed in all oceans, from the tropics to the polar regions and are found from the intertidal zone to 268m depth. Many species are recognized to have a wide distribution. However, using epithets to morphologically similar specimens from distant localities should be used with caution. Barriers imposed to dispersal by distance and ecophysiological conditions, or even similar morphologies as the result of convergent evolution may have led to the emergence of cryptic species among Hapalidiaceae. In the present study, a new species of *Mesophyllum* is described for the Tropical Brazilian Province and two new species of *Lithothamnion* for the Espírito Santo state based on morphological and molecular data. *Mesophyllum* cf. *incisum* and *Mesophyllum* cf. *engelhartii* were also identified. However, the differences found for the markers *psbA* and *rbcL* compared to sequences available in *GenBank*, suggesting the existence of distinct species under the same epithet. Brazilian specimens, including the type locality of *M. erubescens*, were characterized morphologically and molecularly. After exhaustive morphological and anatomical comparison, diagnostic features were not found of any intra or interspecific differences. Plastidial DNA data indicate that morphological characteristics used in the delimitation of *M. erubescens* do not reflect the diversity of the taxa, which must be subdivided into at least 12 new species. In so doing, the use of DNA Barcoding is critical in determining species and eventually representatives of this complex in other regions of the world.

**Keywords:** DNA Barcoding, Cryptic Species, *Mesophyllum erubescens*, Molecular Taxonomy.



## LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Capítulo introdutório	
<b>Figura 1.1</b> Diversidade de algas calcárias não articuladas.....	20
<b>Figura 1.2</b> Proposta atual de posicionamento e hierarquização de algas calcárias segundo análises morfológicas e filogenéticas.....	23
Capítulo 2. Diversidade de Hapalidiaceae (Corallinophycidae, Rhodophyta) no litoral brasileiro - uma abordagem morfoanatômica e molecular	
<b>Figura 2.1</b> Localidades amostradas ao longo do litoral brasileiro..	40
<b>Figura 2.2</b> Filograma de distância de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) para as sequências do marcador UPA.....	50
<b>Figura 2.3</b> Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador <i>psbA</i> .....	52
<b>Figura 2.4</b> Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador <i>rbcL</i> .....	53
<b>Figura 2.5</b> Hábito e aspectos vegetativos de <i>Mesophyllum</i> sp. nov. 1.....	55
<b>Figura 2.6</b> Aspectos reprodutivos de <i>Mesophyllum</i> sp. nov. 1.....	56
<b>Figura 2.7</b> <i>Mesophyllum</i> cf. <i>incisum</i> .....	58
<b>Figura 2.8</b> <i>Mesophyllum engelhartii</i> .....	60
<b>Figura 2.9</b> Hábito e estrutura vegetativa de <i>Lithothamnion crispatum</i> .....	62
<b>Figura 2.10</b> Hábito e estrutura vegetativa de <i>Lithothamnion</i> sp. nov. 1.....	63
<b>Figura 2.11</b> Aspectos reprodutivos de <i>Lithothamnion</i> sp. nov. 1	64
<b>Figura 2.12</b> Hábito e estrutura vegetativa de <i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2.....	65
<b>Figura 2.13</b> Aspectos reprodutivos de <i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2.	67
<b>Figura 2.14</b> Árvore baseada na análise Bayesiana para as sequências do marcador SSU rDNA adaptada de Pena <i>et al.</i> , 2011	70
<b>Figura 2.15</b> Mapa de distribuição das espécies de Hapalidiaceae encontradas no presente estudo ao longo do litoral brasileiro	80
Capítulo 3 – <i>Mesophyllum erubescens</i> (Foslie) Me. Lemoine - quantas espécies em um epíteto?	
<b>Figura 3.1</b> Estados brasileiros amostrados no presente estudo, incluindo os arquipélagos oceânicos de Fernando de Noronha e Trindade-Martin Vaz.....	101

<b>Figura 3.2</b> Material tipo de <i>Mesophyllum erubescens</i> para o qual foi amplificada a terceira região do <i>rbcL</i> .....	104
<b>Figura 3.3</b> Filograma de distância de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) para as sequências do marcador UPA.....	108
<b>Figura 3.4</b> Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador <i>psbA</i> .....	110
<b>Figura 3.5</b> Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências de <i>rbcL</i> .....	112
<b>Figura 3.6</b> Localidades para quais foram obtidas sequências de <i>M. erubescens</i> .....	113
<b>Figura 3.7</b> Mapa de distribuição de <i>M. erubescens</i> no litoral brasileiro.....	116
<b>Figura 3.8</b> Aspecto geral dos espécimes em estudo de <i>M. erubescens</i> .....	117
<b>Figura 3.9</b> Aspectos vegetativos de <i>M. erubescens</i> .....	118
<b>Figura 3.10</b> Aspectos reprodutivos de <i>M. erubescens</i> vistos em MEV.....	119
<b>Figura 3.11</b> Aspectos anatômicos de conceptáculos gametangiais uniporados de <i>M. erubescens</i> vistos em MEV.....	120
<b>Figura 3.12</b> Linhagens de <i>M. erubescens</i> a partir do marcador <i>psbA</i> à esquerda e distribuição dos espécimes.....	126

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1. Capítulo Introdutório

<b>Tabela 1.1</b> Caracteres considerados diagnósticos para a delimitação das famílias de Corallinales.....	22
<b>Tabela 1.2</b> Espécies de Corallinophycidae (excluindo as formas articuladas) citadas para o litoral brasileiro.....	24

### Capítulo 2. Diversidade de Hapalidiaceae (Corallinophycidae, Rhodophyta) no litoral brasileiro - uma abordagem morfoanatômica e molecular

<b>Tabela 2.1</b> Espécimes de Hapalidiaceae coletados ao longo do litoral brasileiro para os quais foram obtidas sequências de UPA, <i>psbA</i> e <i>rbcL</i> .....	42
<b>Tabela 2.2</b> Ciclos de PCR utilizados para a amplificação de cada marcador molecular.....	44
<b>Tabela 2.3</b> Sequência dos primers utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento dos marcadores UPA, <i>psbA</i> e <i>rbcL</i> .....	45
<b>Tabela 2.4</b> Divergências intraespecíficas e interespecíficas para os marcadores UPA, <i>psbA</i> e <i>rbcL</i> entre as amostras sequenciadas para este estudo.....	54
<b>Tabela 2.5</b> Comparação de características morfológicas utilizadas na identificação de espécies de <i>Mesophyllum</i> encontradas no presente estudo.....	73
<b>Tabela 2.6</b> Comparação de características morfológicas utilizadas na identificação de espécies de <i>Lithothamnion</i> encontradas no presente estudo.....	77

### Capítulo 3. *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine - quantas espécies em um epíteto?

<b>Tabela 3.1</b> Dados de coleta e marcadores amplificados e sequenciados para cada amostra.....	102
<b>Tabela 3.2</b> Variação encontrada para os marcador molecular <i>psbA</i> , representada pela porcentagem (%) e quantidade de pares de base (pb) para espécimes identificados morfológicamente como <i>M. erubescens</i> .....	114
<b>Tabela 3.3</b> Comparação das características morfológicas de materiais posicionados em <i>M. erubescens</i> de diferentes localidades.....	123



# SUMÁRIO

## Capítulo 1. Capítulo Introdutório

1. Introdução geral.....	19
2. Histórico do grupo.....	20
3. Classificação.....	21
4. Diversidade do grupo.....	23
5. Papel ecológico.....	25
6. Importância econômica.....	26
Referências.....	29

## Capítulo 2. Diversidade de Hapalidiaceae (Corallinophycidae, Rhodophyta) no litoral brasileiro - uma abordagem morfoanatômica e molecular

1. Introdução.....	35
2. Material e Métodos.....	38
2.1 Área de estudo.....	38
2.2 Material biológico.....	41
2.3 Estudo molecular.....	43
2.3.1 Marcadores moleculares utilizados.....	43
2.3.2 Extração de DNA.....	44
2.3.3 Amplificação, purificação e sequenciamento.....	44
2.3.4 Alinhamento.....	46
2.3.5 Análises de agrupamento e filogenéticas.....	46
2.4 Estudo morfológico.....	47
3. Resultados.....	48
3.1 Estudo molecular.....	48
3.1.1 Análise do marcador UPA.....	49
3.1.2 Análise do marcador <i>psbA</i> .....	51
3.1.3 Análise do marcador <i>rbcL</i> .....	52
3.1.4 Variação intraespecífica dos marcadores moleculares.....	53
3.2 Estudo morfoanatômico.....	54
3.3 Chave de identificação de Hapalidiaceae no litoral brasileiro.....	68
4. Discussão.....	69
5. Conclusão.....	81
Referências.....	83
Apêndice A.....	93
Apêndice B.....	95
Apêndice C.....	95
Apêndice D.....	96

Capítulo 3. *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine - quantas espécies em um epíteto?

1. Introdução.....	97
2. Material e Métodos.....	99
2.1 Área de estudo.....	99
2.2 Material biológico.....	101
2.3 Estudo molecular.....	103
2.3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de material recente.....	103
2.3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de material de herbário.....	103
2.3.3 Alinhamento.....	104
2.3.4 Análises de agrupamento e filogenéticas.....	105
2.3.5 Depósito das sequências nos bancos de dados.....	105
2.3.6 Análise da variação “intraespecífica” dos marcadores moleculares.....	105
2.4 Estudo morfológico.....	105
3. Resultados.....	106
3.1 Estudo molecular.....	106
3.1.1 Análise do marcador UPA.....	106
3.1.2 Análise do marcador <i>psbA</i> .....	109
3.1.3 Análise do marcador <i>rbcL</i> .....	111
3.1.4 Variação “intraespecífica” dos marcadores moleculares.....	112
3.2 Estudo morfoanatômico.....	115
4. Discussão.....	120
5. Conclusão.....	129
Referências.....	131
Apêndice E.....	141
Apêndice F.....	143
Apêndice G.....	143
Apêndice H.....	144

## Capítulo 1. Capítulo Introdutório

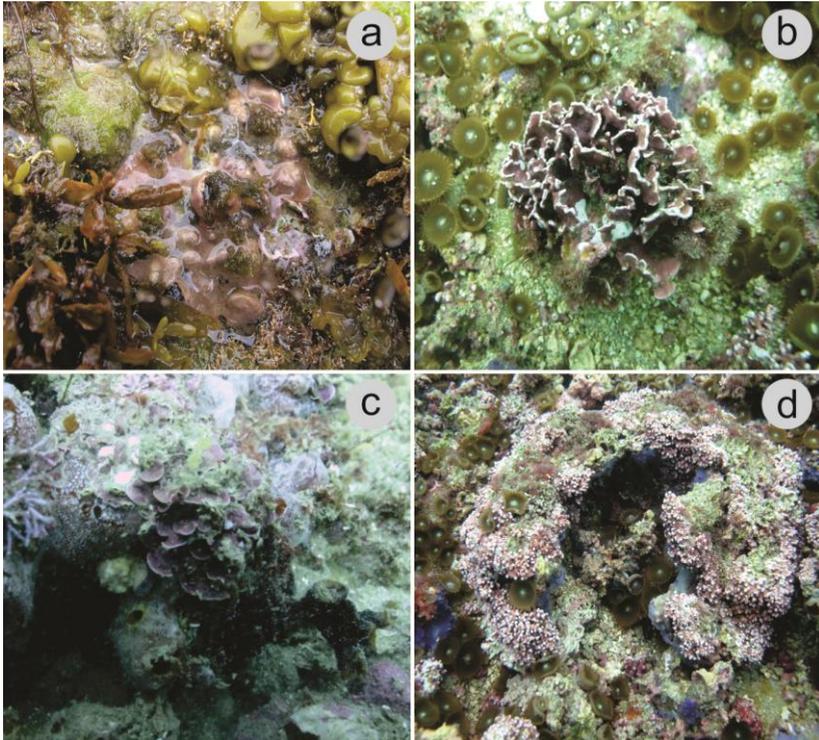
### 1 INTRODUÇÃO GERAL

As Rhodophyta, também conhecidas como algas vermelhas, são encontradas tanto em águas tropicais como em regiões de águas frias. Existem cerca de 6000 espécies, a maior parte de ambientes marinhos, sendo alguns poucos representantes de ambientes de água doce. O referido grupo apresenta cloroplastos com clorofila *a* e ficobilinas, e parede celular constituída por microfibrilas de celulose e uma matriz mucilaginosa de polissacarídeos sulfatados conhecidos como ágar ou carragenana.

Em determinados grupos de algas vermelhas esta parede apresenta depósito de carbonato de cálcio. Dentre estes grupos encontramos as algas conhecidas popularmente como calcárias que podem ser ainda subdivididas em dois subgrupos artificiais: algas calcárias articuladas e algas calcárias não articuladas. As calcárias articuladas possuem regiões não calcificadas (genículo) e intercaladas por regiões calcificadas (intergenículo). As calcárias não articuladas são inteiramente calcificadas, apresentam hábitos de vida variados, como formas ancoradas ou aderidas ao substrato, ou ainda, livres no fundo da plataforma continental de todos os oceanos (Broom *et al.*, 2008), como mostra a Figura 1.1. As formas que crescem desprendidas do substrato são chamadas de rodólitos, nódulos ou maërl e podem ocupar grandes áreas, constituindo bancos frequentemente associados a uma alta biodiversidade (Steller *et al.*, 2003; Riul *et al.*, 2009).

As algas calcárias não articuladas compreendem cerca de 600 espécies e estão amplamente distribuídas em todos os oceanos (Foster, 2001), desde regiões tropicais até regiões polares e encontram-se da zona entre marés até 268 m de profundidade nas Bahamas (Littler *et al.*, 1986). Compreendem o terceiro grupo mais diverso entre as rodófitas dos mares atuais, com aproximadamente 600 morfo-espécies reconhecidas (Brodie & Zuccarello, 2007; Guiry & Guiry, 2013). Caracterizam-se por depositar carbonato de cálcio na forma de calcita em suas paredes celulares, mineral que chega a perfazer 90% do peso seco destas algas (Woelkerling *et al.*, 1993; Oliveira, 1997) e que garante uma boa preservação no registro fóssil. Por esta característica, chamam atenção não apenas de ficólogos, mas também de paleontólogos e geólogos por estarem presentes em abundância nos depósitos calcários desde o Cretáceo (Littler, 1972), apesar do pico de diversificação ter

sido no Mioceno e se estabilizado durante o Neogênico (Aguirre *et al.*, 2000).



**Figura 1.1 (a-d).** Diversidade de algas calcárias não articuladas. (a) Forma incrustante na zona entre-marés; (b) forma livre com aspecto folioso; (c) forma aderida ao substrato com aspecto folioso; (d) diversidade associada a um nódulo de rodolito.

## 2 HISTÓRICO DO GRUPO

O levantamento histórico feito por Horta (2002) dos estudos taxonômicos das algas calcárias não articuladas realizados no mundo menciona que no início do século XVIII estes organismos eram considerados por alguns autores como estalactites inorgânicas. Enquanto outros, como Tournefort (1719) e Ray (1724) (*apud* Horta, 2002), as reconheceram como plantas pelo fato de serem fixas ao substrato, em analogia simplista às plantas terrestres. Ainda de acordo com o autor, Linnaeus, em 1767, baseado em sua natureza calcária e na existência de

pequenos poros (conceptáculos) incluiu o grupo como membro dos corais hermatípicos, Hydrozoa, formadores de recifes. O conceito de que algas vermelhas calcárias são corais permaneceu até 1837, quando Philippi (1837) demonstrou pela primeira vez, de forma clara e definitiva, que os representantes das Nullipores (Hydrozoa) eram plantas, estabelecendo os gêneros *Lithothamnion* e *Lithophyllum* (*apud* Horta, 2002).

Durante o século XX, muito se discutiu sobre quais características reprodutivas e vegetativas seriam taxonomicamente relevantes e filogeneticamente informativas. Embora a partir dos anos 60, levantamentos taxonômicos tenham sido feitos no mundo (Dawson, 1960; Chamberlain, 1983; Woelkerling & Campebel, 1992; Woelkerling, 1996), as algas calcárias ainda são pobremente conhecidas no Brasil (Horta, 2000; 2002). As primeiras citações foram feitas por pesquisadores estrangeiros no século XIX, como Harvey (1847), Dickie (1874; 1875) e Piccone (1886). Uma série de trabalhos foi feita com essas algas, no entanto, abordando mais aspectos geológicos/ecológicos a taxonômicos (Gherardi, 1995; Testa, 1997; Riul *et al.*, 2009). Este fato está relacionado às particularidades das técnicas necessárias para seu estudo anatômico, o qual é fundamental para a descrição de características diagnósticas deste grupo (Horta, 2000).

A partir do século XXI, estes organismos começaram a ganhar mais destaque. No cenário nacional, por exemplo, despontam trabalhos de caracterização dos bancos (Figueiredo & Steneck, 2000; Riul *et al.*, 2009; Pascelli *et al.*, 2013), mapeamento de habitats (Moura *et al.*, 2013), influência dos impactos antrópicos (Riul *et al.*, 2008), e taxonômicos (Farias, 2009; Nunes *et al.*, 2008; Horta *et al.*, 2011; Vieira-Pinto, 2011).

### 3 CLASSIFICAÇÃO

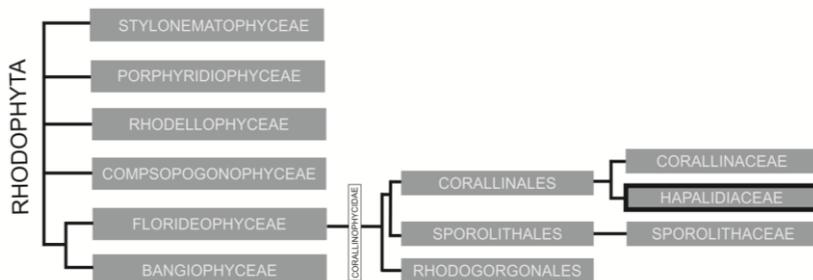
A classificação de algas calcárias vigente até pouco tempo atrás seguia a proposta de Harvey *et al.*, (2003), os quais baseados em uma combinação de dados morfológicos, anatômicos, bioquímicos, ultraestruturais e moleculares reconheciam três famílias pertencente à ordem Corallinales: Corallinaceae Lamouroux, Hapalidiaceae J. E. Gray e Sporolithaceae Verheij (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1** Caracteres considerados diagnósticos para a delimitação das famílias de Corallinales, retirado de Harvey *et al.*, (2003).

Caracter	Corallinaceae	Sporolithaceae	Hapalidiaceae
Arranjo dos esporos dentro do tetrasporângio	zonado	cruciado	zonado
Tetra/bisporângio produz plugue apical	não	sim	sim
Tetra/bisporângio produzidos embaixo de placas multiporadas	não	não	sim
Tetra/bisporângio se desenvolvem dentro de conceptáculos ou compartimentos calcificados	conceptáculos	compartimentos calcificados	conceptáculos

Na tentativa de obter uma melhor resolução nas relações filogenéticas de ordem e supra ordem dentre as Florideophyceae, Le Gall & Saunders (2007), sob uma perspectiva multigênica e ultra-estrutural (com base na anatomia dos *pit-plugs*) propõem a criação da subclasse Corallinophycidae para acomodar as Corallinales e Rhodogorgonales. Estas duas ordens, além das afinidades genéticas, possuem *pit-plugs* com a tampa externa em forma de cúpula (apesar de não ser exclusivo para esses dois taxa) e são as únicas entre as Rhodophyta marinhas a apresentar calcita.

No entanto, algumas características relacionadas ao desenvolvimento tetrasporangial (tetrassporângios dispostos crucialmente e ausência de conceptáculos tetrasporangiais) de Sporolithaceae, bem como ausência de representantes de *Sporolithon* em análises filogenéticas pretéritas (Le Gall & Saunders 2007), tornavam o posicionamento deste grupo discutível. Com a inclusão de *Sporolithon ptychoides* Heydrich, Le Gall *et al.* (2010) puderam confirmar a monofilia de Sporolithaceae dentro das Corallinophycidae, apesar de não representarem um agrupamento natural dentro de Corallinales devido às afinidades com Rhodogorgonales. Embasados na análise multigênica e nas diferenças morfológicas, propõem, então, a transferência de Sporolithaceae para uma nova ordem, Sporolithales L. Le Gall and G.W. Saunders, com uma família, Sporolithaceae (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Proposta atual de posicionamento e hierarquização de algas calcárias segundo análises morfológicas e filogenéticas (Le Gall *et al.*, 2010).

#### 4 DIVERSIDADE DO GRUPO

Os bancos de rodolitos estão amplamente distribuídos em todos os oceanos. Bancos abundantes são relatados para o Mar Mediterrâneo, Golfo da Califórnia e Oceano Atlântico – desde a Noruega, Irlanda, Escócia, Canadá, incluindo Caribe e Brasil. Entretanto, estes ambientes, considerando sua ampla distribuição e inúmeras particularidades, ainda representam universos pouco explorados ou até mesmo inexplorados, apesar dos avanços obtidos com a popularização do mergulho autônomo e do aumento dos investimentos na investigação de ambientes costeiros e oceânicos (Figueiredo & Steneck, 2000, para o Banco do Abrolhos, Brasil; Steller *et al.*, 2003, para o Golfo da Califórnia, México; Harvey & Bird, 2008 para Victoria, Australia; Amado-Filho *et al.*, 2007; 2012a e 2012b, para o Espírito Santo, Abrolhos e Fernando de Noronha, respectivamente; Teichert *et al.*, 2012, para o Arquipélago Svalbard, Noruega; Pereira-Filho *et al.*, 2012, para a Cadeia Vitória-Trindade; Pascelli *et al.*, 2013, para a Ilha do Arvoredo, Brasil).

Segundo Foster (2001), os maiores bancos de rodolitos ocorrem no litoral brasileiro. Porém, a ideia de uma ocorrência contínua como o autor retrata é uma concepção errônea que vem sendo empregada desde Kempf (1970) e pouco questionada. Moura *et al.*, (2013), usando sonar de varredura lateral associado e veículos operados remotamente, identificaram um mosaico de habitats altamente complexos, incluindo o maior banco de rodolitos contínuo já descrito (Amado-Filho *et al.*, 2012a). Este banco está localizado nos Bancos dos Abrolhos, onde também são relatados muitos bancos em manchas.

No litoral brasileiro, os bancos de rodolitos ocorrem de forma descontínua, tendo seu limite de distribuição setentrional no Maranhão e a Ilha do Arvoredo como limite sul (Gherardi, 2004 e Pascelli *et al.*,

2013). Para o Brasil, são reconhecidas 39 espécies de algas calcárias não articuladas (Corallinophycidae – excluindo as formas articuladas como *Amphiroa* spp.), 10 Sporolithaceae, 20 Corallinaceae e 9 Hapalidiaceae (Tabela 1.2). Quanto ao hábito de vida, ainda não há estudos que verifiquem a ocorrência de espécies exclusivamente formadoras de rodólitos ou incrustantes.

**Tabela 1.2.** Espécies de Corallinophycidae (excluindo as formas articuladas) citadas para o litoral brasileiro. (\* indica as espécies que ainda carecem de revisão a partir de técnicas e nomenclatura moderna; ° indica espécies que foram adicionadas nos últimos três anos).

## SPOROLITHALES

### Sporolithaceae

- Sporolithon episporum* (M.A.Howe) E.Y.Dawson
- Sporolithon africanum* (Foslie) J.Afonso-Carillo\*
- Sporolithon australasicum* (Foslie) N.Yamaguishi-Tomita ex M.J.Wynne\*
- Sporolithon dimotum* (Foslie & M.A.Howe) Yamaguishi-Tomita ex M.J.Wynne
- Sporolithon erythraeum* (Rothpletz) Kylin\*
- Sporolithon howei* (Lemoine) N.Yamaguishi-Tomita ex M.J.Wynne\*
- Sporolithon pacificum* E.Y.Dawson\*
- Sporolithon pychooides* Heydrich°
- Sporolithon tenue* Bahia, Amado-Filho, Maneveldt et W.H. Adey°
- Sporolithon molle* (Heydrich) Heydrich°

## CORALLINALES

### Corallinaceae

- Hydrolithon onkodes* (Heydrich) D.Penrose & Woelkerling°
- Hydrolithon rupestre* (Foslie) Penros°
- Hydrolithon farinosum* (J.V.Lamouroux) D.Penrose & Y.M.Chamberlain
- Hydrolithon boergesenii* (Foslie) Foslie
- Hydrolithon pachydermum* (Foslie) J.C.Bailey, J.E.Gabel, & D.W.Freshwater°
- Lithophyllum congestum* (Foslie) Foslie°
- Lithophyllum margaritae* (Hariot) Heydrich°
- Lithophyllum atlanticum* Vieira-Pinto, Oliveira & Horta°
- Lithophyllum stictaeforme* (Areschoug) Hauck
- Lithophyllum corallinae* (P.L.Crouan & H.M.Crouan) Heydrich

*Lithophyllum johansenii* Woelkerling & Campbell

*Lithophyllum depressum* Villas-Boas, Figueiredo & Riosmena-Rodriguez in Villas-Boas

*Neogoniolithon accretum* (Foslie & Howe) Setch & Mason

*Neogoniolithon brassica-florida* (Harvey) Setchell et Mason<sup>o</sup>

*Neogoniolithon fosliei* (Heydrich) Setchell & L.R.Mason\*

*Neogoniolithon mamillare* (Harvey) Setchell & L.R.Mason\*

*Pneophyllum conicum* (Dawson) Keats, Chamberlain and Baba<sup>o</sup>

*Pneophyllum fragile* Kützing\*

*Spongites fruticulosa* Kützing<sup>o</sup>

*Titanoderma pustulatum* (J.V.Lamouroux) Nägeli

#### Hapalidiaceae

*Lithothamnion steneckii* Mariath and Figueiredo<sup>o</sup>

*Lithothamnion crispatum* Hauck<sup>o</sup>

*Lithothamnion brasiliense* Foslie

*Lithothamnion occidentale* (Foslie) Foslie

*Lithothamnion sejunctum* Foslie

*Mesophyllum engelhartii* (Foslie) Adey<sup>o</sup>

*Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine

*Phymatolithon masonianum* Wilks & Woelkerling

*Phymatolithon calcareum* (Pallas) W.H.Adey & D.L.McKibbin

## 5 PAPEL ECOLÓGICO

Estas algas são capazes de transformar fundos homogêneos de sedimento suave em substratos heterogêneos duros, criando habitat para numerosos organismos (Steller *et al.*, 2003). Os rodolitos, em áreas tropicais, são essenciais na construção de recifes de corais, agindo como cimentadores, protegendo esse ecossistema contra a ação erosiva das ondas, possibilitando o desenvolvimento e manutenção desses ecossistemas (Foster, 2001).

Algas incrustantes são um dos organismos marinhos mais abundantes em substratos consolidados dentro da zona fótica (Oliveira, 1996). No Brasil, se estendem por quase toda plataforma continental; Millmann & Amaral (1974) estimam que o estoque de algas calcárias seja da grandeza de  $2 \times 10^{11}$  toneladas. O fato de esses organismos precipitarem grandes quantidades de CO<sub>2</sub> na forma de carbonatos levou

Oliveira (1996) a alertar sobre sua importância no balanço global de CO<sub>2</sub>. Além disso, os bancos de rodolitos servem de substrato para o crescimento de outras algas, como *Amansia multifida* e *Laminaria* spp., as quais possuem grande potencial na bioprospecção (Amado-Filho & Pereira-Filho, 2012); pela estrutura tridimensional que formam, representam um local de refúgio, reprodução e berçário para muitos grupos de invertebrados e peixes (Riul *et al.*, 2009).

## 6 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

As algas calcárias constituem grande parte dos granulados bioclásticos marinhos, (materiais mineirais de composição carbonática, constituídos por algas calcárias ou por fragmentos de conchas) e são muito visadas para exploração no Brasil, já que nossa plataforma continental representa a maior extensão coberta por este tipo de sedimento, o qual represeta matéria-prima em muitas indústrias, como: na agricultura, onde são usadas na produção de cal; na indústria de cosmético, sendo empregadas na produção de pastas dentais e sais de banho; na indústria de alimentos são usadas como complemento alimentar; em implantes ósseos uma vez que apresenta compatibilidade estrutural, química e biológica com os tecidos ósseos (Dias, 2001).

Os bancos de rodolitos têm sido ameaçados por atividades humanas, especialmente pela exploração em larga escala para fins agrônômicos. Adicionalmente, a taxa de crescimento relativamente baixa (cerca de 1,0 mm por ano, Blake & Maggs, 2003) conferem ao recurso que, eventualmente representa o grupo, a característica de não renovável (Wilson *et al.*, 2004). Indiretamente, o fino sedimento, resultante do processo de dragagem, recobre os rodolitos de áreas adjacentes diminuindo a produção líquida dessas algas em até 70% (Riul *et al.*, 2008).

Considerando a grande importância ecológica destes organismos, a falta de conhecimento ainda existente a cerca da diversidade, a ameaça que vêm sofrendo por atividades humanas além daquelas relacionadas à acidificação dos oceano ou mesmo às mudanças no clima, o presente estudo tem como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade morfológica e molecular das Hapalidiceae no litoral brasileiro, fornecendo subsídios para discussões biogeográficas e processos evolutivos no Atlântico Sul. Esta dissertação está dividida em três capítulos, o primeiro de caráter introdutório sobre as algas em estudo, no segundo busca-se acessar a diversidade da família através de análises morfoanatômicas e moleculares e discute-se a

utilização de epítetos correspondentes a materiais provenientes de outras localidades para materiais do Brasil. Enquanto no Capítulo 3 é apresentado um estudo de caso a fim de se investigar a hipotética ampla distribuição de *Mesophyllum erubescens*. Para subsidiar as discussões, foram obtidas sequências de materiais morfológicamente identificados sob este epíteto ao longo do litoral brasileiro e México, incluindo a localidade tipo.



## REFERÊNCIAS

- Aguirre, J.; Riding, R. & Braga, J.C. (2000) Diversity of coralline red algae: origination and extinction patterns from the Early Cretaceous to the Pleistocene. *Paleobiology* 26: 651-667.
- Amado-Filho, G.M.; Maneveldt, G.; Manso, R.C.C.; Marins-Rosa, B.V.; Pacheco, M.R. & Guimarães, S.M.P.B (2007) Estructura de los mantos de rodolitos de 4 a 55 metros de profundidad en la costa sur del estado de Espírito Santo, Brasil. *Ciencias Marinas* 33: 399-410.
- Amado-Filho, G.M.; Moura, R.L.; Bastos, A.C.; Salgado, L.T.; Sumida, P.Y.; Guth, A.Z.; Francini-Filho, R.B.; Pereira-Filho, G.H.; Abrantes, D.P.; Brasileiro, P.S.; Bahia, R.G.; Leal, R.N.; Kaufman, L.; Kleypas, J.A.; Farina, M. & Thompson, F.L. (2012a) Rhodolith Beds Are Major CaCO<sub>3</sub> Bio-Factories in the Tropical South West Atlantic. *PlosOne* 7: e35171.
- Amado-Filho, G.M. & Pereira-Filho, G.H. (2012) Rhodolith beds in Brazil: a new potential habitat for marine bioprospection. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 782-788.
- Amado-Filho, G.M.; Pereira-Filho, G.H.; Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Veras, P.C. & Matheus, Z. (2012b) Occurrence and distribution of rhodolith beds on the Fernando de Noronha Archipelago of Brazil. *Aquatic Botany* 101: 41-45.
- Blake, C. & Maggs, C.A. (2003) Comparative growth rates and internal banding periodicity of maerl species (Corallinales, Rhodophyta) from northern Europe. *Phycologia* 42: 606-6012.
- Brodie, J. & Zuccarello, G.C. (2007) Systematics of the species rich algae: red algal classification, phylogeny and speciation. In: Hodkinson, T.R. (Ed.) *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*. Florida: CRC/Taylor and Francis, Boca Raton, pp.317-330.
- Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. (2008) Utility of *psbA* and *nSSU* for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958- 973.

- Chamberlain, Y.M. (1983) Studies in the Corallinaceae with special reference to *Fosliella* and *Pneophyllum* in the British Isles. *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series* 11: 291-463.
- Dawson, E.Y. (1960) New records of marine algae from Pacific Mexico and Central America. *Pacific Naturalist* 1: 31-52.
- Dias, G.T.M. (2001) Granulados bioclásticos – algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics* 18: 307-318.
- Dickie, G. (1874) Enumeration of algae collected at Fernando de Noronha. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 363-365.
- Dickie, G. (1875) Enumeration of algae collected from Bahia, collected by H.N. Mosely, M.A. naturalist, to H.M.S. “Challenger”. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 377.
- Farias, J. (2009) *Aspectos taxonômicos de Lithothamnion superpositum e Mesophyllum engelhartii (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Figueiredo, M.A.O. & Steneck, R.S. (2000) Floristic and ecological studies of crustose coralline algae on Brazil’s Abrolhos reefs. *In Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*, Bali, p.493-498.
- Foster, M.S. (2001) Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37: 659-667.
- Gherardi, D.M. (1995) A windward coralline algal ridge on Rocas Atoll, Atlantic Ocean. *Coral Reefs* 14: 34.
- Gherardi, D.F.M. (2004) Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 52: 207-224.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013) AlgaeBase. World-wide electronic publication, *National University of Ireland, Galway*. <http://www.algaebase.org>; acesso em 20 de outubro de 2013.

Harvey, W.H. (1847) Corallineae. *Phycologia Britannica* 1: 124.

Harvey, A.S. & Bird, F.L. (2008) Community structure of a rhodolith bed from cold-temperate waters (southern Australia). *Australian Journal of Botany* 56: 437-450.

Harvey, A.S.; Broadwater, S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski, P.J. (2003) *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988–998.

Horta, P.A. (2000) *Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Horta, P.A. (2002) Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.

Horta, P.A. ; Scherner, F.; Bouzoun, Z.L.; Riosmena-Rodriguez, R. & Oliveira, E.C. (2011) Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lenoime (Corallinales, Rhodophyta) of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 125-134.

Kempf, M. (1970) Notes on the benthic bionomy of the N-NE Brazilian shelf. *Marine Biology* 5: 213-224.

Le Gall, L. & Saunders, G.W. (2007) A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: Establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1118-1130.

Le Gall, L.; Payri, C.E.; Bittner, L. & Saunders, G.W. (2010) Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 302-305.

Littler, M.M. (1972) The crustose Corallinaceae. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review* 10: 311-347.

Littler, M.M.; Littler, D.S.; Blair, S.M. & Norris, J.N. (1986) Deep-water plant communities from an uncharted seamount off San Salvador Island, Bahamas: distribution, abundance, and primary productivity. *Deep-sea Research* 33: 881-892.

Millimann, J.D. & Amaral, C.A.B. (1974) Economic potential of Brazilian continental margin sediments. *Anais do Congresso Brasileiro de Geógrafos* 28: 335-344.

Moura, R.L.; Secchin, N.A.; Amado-Filho, G.M.; Francini-Filho, R.B.; Freitas, M.O.; Mente-Vera, C.V.; Teixeira, J.B.; Thompson, F.L.; Dutra, G.F.; Sumida, P.Y.G.; Guth, A.Z.; Lopes, R.M. & Bastos, A.C. (2013) Spatial patterns of benthic megahabitats and conservation planning in the Abrolhos Bank. *Continental Shelf Research, In press*.

Nunes, J.M.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Donangelo, A., Farias, J. & Horta, P.A. (2008) Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59:75-86.

Oliveira, E.C. (1997) Letters. *Science* 277: 1991.

Oliveira, E.C. (1996) Is there a relation among the global warming, the missing carbon and the calcareous algae? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 68: 18-21.

Pascelli, C.; Riul, P.; Riosmena-Rodriguez, R.; Scherner, F.; Nunes, M. Hall-Spencer, J.M.; Oliveria, E.C. & Horta, P.A. (2013) Seasonal and depth-driven changes in rhodolith bed structure and associated macroalgae off Arvoredo island (southeastern Brazil). *Aquatic Botany, In Press*.

Pereira-Filho, G.H.; Amado-Filho, G.M.; Moura, R.L.; Bastos, A.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Salgado, L.T.; Francini-Filho, R.B.; Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Guth, A.Z. & Brasileiro, P.S. (2012) Extensive Rhodolith Beds Cover the Summits of Southwestern Atlantic Ocean Seamounts. *Journal of Coastal Research* 28: 261-269.

Piccone, A. (1886) Nota sulle raccolte algologiche fatte durante il viaggio di circumnavigazione della “Vettor Pisani” *Notarisia* 3: 150-151.

Riul, P.; Lacouth, P.; Pagliosa, P.R.; Christoffersen, M.L. & Horta, P.A. (2009) Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90: 315-320.

Riul, P.; Targino, C.H.; Farias, J.N.; Visscher, P.T. & Horta, P.A. (2008) Decrease in *Lithothamnion* sp. (Rhodophyta) primary production due to the deposition of a thin sediment layer. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 17-19.

Steller, D.L.; Riosmena-Rodríguez, R.; Foster, M.S. & Roberts, C.A. (2003) Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: the importance of rhodolith structure and consequences of disturbance. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13: S5-S20.

Teichert, S.; Woelkerling, W.; Rüggeberg, A.; Wisshak, M.; Piepenburg, D.; Meyerhöfer, M.; Form, A.; Büdenbender, J. & Freiwald, A. (2012) Rhodoliths beds (Corallinales, Rhodophyta) and their physical and biological environment at 80°31'N in Nordkappbukta (Nordaustlandet, Svalbard Archipelago, Norway). *Phycologia* 51: 371-390.

Testa, V. (1997) Crustose Corallines, macroalgae, herbivores and sediments: Complex interactions along productivity gradients. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium* 1: 737-742.

Vieira-Pinto, T. (2011) *Aspectos morfoanatômicos, reprodutivos e moleculares do gênero Lithophyllum (Lithophylloideae, Corallinales, Rhodophyta) para o sul do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Wilson, S.; Blake, C.; Berges, J.A. & Maggs, C.A. (2004) Environmental tolerances of free-living coralline algae (maërl): implications for European marine conservation. *Biological Conservation* 120: 279-289.

Woelkerling, W.J. (1993) Growth-forms in Non-geniculate Coralline Red Algae (Corallinales, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 277-293.

Woelkerling, W.J. (1996) The order Corallinales. In: Womersley, H.B.S. (ed). *The marine Benthic Flora of Sothern Australia, Part IIIB*. Adelaide: Graphic Print Group, p. 146-323.

Woelkerling, W.J. & Campbell, S.J. (1992) An account of southern Australian species of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series* 22: 1-107.

## Capítulo 2. Diversidade de Hapalidiaceae (Corallinophycidae, Rhodophyta) no litoral brasileiro - uma abordagem morfoanatômica e molecular

### 1 INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm exercido um estrondoso impacto no meio ambiente. Muitos cientistas acreditam que as alterações no planeta, em todas as escalas, podem interferir até mesmo em forças geológicas, propondo então o início de uma nova era, o Antropoceno (Ruddiman, 2003; Crutzen, 2006; Steffen *et al.*, 2007).

A busca pelo desenvolvimento está intimamente relacionada à exploração e produção de combustíveis fósseis, como petróleo, gás natural e carvão. As áreas de maior concentração desses recursos são extamente locais com alta riqueza de espécies (Butt *et al.*, 2013). Ainda, a demanda por produção de alimentos em larga escala para uma população que cresce a 1,3% ano<sup>-1</sup> (Cincotta *et al.*, 2000), leva a um desmatamento desenfreado de áreas de florestas para monocultura e produção de gado. Em terra, o desmatamento da Amazônia avança a 23,8 x 10<sup>3</sup> km<sup>2</sup> ano<sup>-1</sup> (dados para 2002, Fearnside, 2005), nos mares o colapso é iminente, a extinção ecológica de vários peixes economicamente importantes já é observada (Luiz & Edwards, 2011) e outros já vem mostrando sinais de redução, tanto em abundância como em tamanho. Todos esses fatos são reflexo de um processo em cascata, causado tanto pela sobrepesca como por distúrbios aos ecossistemas costeiros (Jackson *et al.*, 2001; Myers & Worm, 2003).

Desde o início da Revolução Industrial, a concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera aumentou de 280 partes por milhão (ppm) para 380 ppm por conta das atividades humanas (Solomon *et al.*, 2007) e a previsão é de 700 ppm até o final do século XXI (IPCC, 2007). A mudança na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico implica em muitas outras consequências para o clima na Terra, como aumento da temperatura superficial dos oceanos, alteração no ciclo do carbonato, diminuição do pH da água do mar. A acidificação devido ao aumento na pCO<sub>2</sub> irá influenciar no processo de calcificação de diversos organismos marinhos calcários, como corais, algas calcárias, foraminíferos e cocolitofórídeos. As algas calcárias estão entre os que mais sofrerão com a acidificação, pois a deposição do carbonato de cálcio ocorre na forma de calcita, sendo esta sua forma mais solúvel. As algas calcárias são algas vermelhas que, juntamente com os corais, são os principais estruturadores de ambientes recifes. Estas algas apresentam formas

livres, conhecidas como maërl, nódulos ou rodolitos, ocupam extensas áreas de fundo de areia, transformando-os em ambientes altamente complexos, oferecendo uma grande quantidade de nichos ecológicos e abrigando uma alta diversidade associada (Sumida & Pires-Vanin, 1997).

Os bancos de rodolitos formam uma das quatro maiores comunidades bentônicas do mundo (Foster, 2001) e são sensíveis a impactos diretos, como exploração de nódulos para aquariofilia (Simon *et al.*, 2007), produção de estabilizante de solo e outras indústrias (Dias, 2001) com a impactos indiretos. Riul *et al.*, (2008) mostraram que o sedimento fino, resultante do processo de dragagem, recobre os rodolitos de áreas adjacentes o que diminui a produção fotossintética líquida dessas algas em até 70%. Este fator relacionado em conjunto com o total soterramento, ou com a poluição por metais pode levar à morte destes organismos (Wilson *et al.*, 2004) levando ao colapso de todo o ambiente (Hall-Spencer, comunicação pessoal).

Em uma era em que as atividades humanas tem impactado os ecossistemas numa escala global (Halpern *et al.*, 2008) causando mudanças na fenologia, composição de espécies e distribuição das mesmas e, uma consequente fragmentação e/ou perda de habitats, muito tem se discutido sobre a criação de unidades de conservação. No Brasil, apenas 2 % do território marinho é protegido e dos bancos de rodolitos já estudados, apenas um está enquadrado dentro de uma Unidade de Conservação de proteção integral (Reserva Biológica do Arvoredo, conforme o SNUC, 2000).

Dentre os táxons formadores de rodolitos, o gênero mais frequente e abundante nos bancos do Atlântico Sul é o *Lithothamnion* Heydrich, presente desde os bancos do nordeste do Brasil (Riul *et al.*, 2009), na maior extensão contínua no Banco dos Abrolhos (Amado-Filho *et al.*, 2012a) até seu limite sul de distribuição, na Ilha do Arvoredo (Pascelli *et al.*, 2013). São conhecidas cinco espécies e três foram detalhadamente estudadas (Horta, 2000; Farias *et al.*, 2010; Mariath *et al.*, 2012). A sistemática do grupo mudou muito nas últimas décadas, principalemnte pelo uso de características ultraestruturais e ferramentas moleculares. Atualmente, *Lithothamnion*, juntamente com *Choreonema* F.Schmitz, *Clathromorphum* Foslie, *Mastophoropsis* Woelkerling, *Mesophyllum* Me.Lemoine, *Phymatolithon* Foslie e *Synarthrophyton* R.A. Townsend pertecem à família Hapalidiaceae, a qual compreende os táxons cujos tetrasporângios e bisporângios zonados se desenvolvem dentro de conceptáculos multiporados e

produzem plugues apicais, impedindo a saída dos tetra/bisporângios, até que estejam maduros (Harvey *et al.*, 2003a, 2003b).

Globalmente, são referenciadas 203 espécies de Hapalidiaceae (Guiry & Guiry, 2013), sendo 20 registradas para o Atlântico Ocidental (Wynne, 2011), das quais nove ocorrem no litoral brasileiro. Estudos taxonômicos com esses organismos no Brasil foram escassos até o início do século XXI, visto a dificuldade imposta pela grande variabilidade fenotípica, ausência de estruturas reprodutivas (principal caractere diagnóstico de gêneros e espécies), além das técnicas necessárias para sua identificação. Contudo, com o avanço das técnicas moleculares, muitos obstáculos encontrados pela taxonomia tradicional (baseada em caracteres morfológicos) puderam ser contornados (Bickford *et al.*, 2006). O advento da reação em cadeia da polimerase (sigla em inglês *PCR - Polymerase Chain Reaction*) possibilitou a amplificação de diversos genes a partir de um pequeno pedaço de tecido do organismo, impulsionando e popularizando a identificação a nível molecular dos organismos (Hebert *et al.*, 2003; Radulovici *et al.*, 2010). A fim de comparar os resultados, tem-se buscado uma região que seja universal, surge então, a proposta do *DNA Barcoding*. Fundamentado na ideia de que existiria uma região no DNA que identificaria todos os organismos, em analogia aos códigos de barra dos produtos manufaturados no supermercado (Stoeckle, 2003). É uma técnica rápida, confiável e relativamente barata de se identificar espécies, servindo para acelerar a descoberta de novos táxons.

Entre as algas calcárias não articuladas, Bailey & Chapman (1996, 1997) são os pioneiros no uso de sequências de DNA que transcrevem para a subunidade pequena do RNA ribossomal (SSU rDNA) para a reconstrução filogenética do grupo. No trabalho de 1997, sugerem que a separação fenotípica das algas calcárias em duas categorias baseadas apenas na presença ou ausência de genículo, não refletem a história evolutiva do grupo e os resultados indicam, pelo menos, quatro linhagens dessas algas. Sob uma perspectiva taxonômica, Vidal *et al.* (2003) utilizam um fragmento do SSU rDNA para identificar representantes de Corallinales do Chile e concluem que são efetivas na identificação de todas as amostras até gênero, e em alguns casos até espécie, sugerindo a utilização de marcadores menos conservados para esse fim. Na tentativa de encontrar uma região que apresentasse menor variação interespecífica para espécies próximas, Broom *et al.* (2008) obtiveram, adicionalmente às sequências de SSU rDNA, sequências de *psbA* (gene que codifica para a proteína D1 do fotossistema II) para espécimes da Nova Zelândia, que se mostraram

aparentemente eficazes na reconstrução filogenética do grupo, como na identificação de espécies.

O presente estudo tem como objetivo investigar a diversidade de Hapalidiaceae a partir de estudos morfoanatômicos e moleculares, bem como avaliar a utilização dos marcadores tipo *Barcode*, UPA, *psbA* e *rbcL* na delimitação de espécies.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes analisados no presente estudo foram coletados em 15 localidades ao longo do litoral brasileiro, com limite norte no Parcel Manuel Luís, MA e sul na Ilha do Xavier, SC (Figura 2.1). Também foram incluídos espécimes coletados em Bocas Del Toro, Panamá a fim de avaliar prováveis diferenças moleculares entre espécies morfológicamente semelhantes, imposta por barreiras biogeográficas. Foram coletadas tanto formas livres (rodolitos\*) como incrustantes, exclusivamente no infralitoral, em profundidades que variaram de 5 a 30 metros, através de mergulho autônomo.

As localidades amostradas contemplaram ambientes diversos, em vários aspectos, como:

- Estrutura do ambiente: bancos de rodolitos, parciais, costões rochosos;
- Proximidade da costa: de 3 km a 1200 km;
- Latitude: 0°S a 27°S;
- Status de proteção ambiental: de nenhum a Reserva Biológica.

No Maranhão, o limite norte de distribuição de ambientes recifais no Brasil e o primeiro abaixo do Rio Amazonas, as amostragens foram realizadas dentro do Parque Estadual Marinho do Parcel Manuel Luís (PEMPML), localizado a 86 km da costa e a 182 km a noroeste da cidade de São Luís. A região é formada por cabeços que se elevam de profundidades de 30 m a 5 m, ficando expostos em algumas marés de

---

\*No presente estudo, considera-se como rodolito formas livres, constituídas, exclusivamente, por uma ou mais espécies de algas calcárias (Corallinophycidae, Rhodophyta).

sizígia (Figura 2.1 a). Apesar do grande interesse ecológico e biogeográfico em se estudar a região, poucos estudos foram realizados devido a sua dificuldade de acesso, às condições adversas de ventos e marés. O conhecimento existente a cerca de organismos bentônicos contempla apenas corais (Amaral *et al.*, 1998; Moura *et al.*, 1999). A primeira expedição a amostrar algas marinhas foi realizada em abril de 2011, contemplando as Hapalidiaceae analisadas no presente estudo.

Assim como o PEMPML, o Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (PEMPRM) é uma das poucas áreas protegidas totalmente submersas no Atlântico Sudoeste Tropical. Está localizado a 18,5 km da cidade de Fortaleza (Soares *et al.*, 2011). O ambiente é caracterizado por cabeços que variam de 25 m a 17 m. Foram coletadas formas incrustantes e esparsamente soltas no fundo de areia.

O Arquipélago Oceânico Fernando de Noronha está localizado a 545 km da cidade de Recife e é formado por 21 ilhas e ilhotas que representam o topo emerso de uma cadeia de montanhas situadas na zona de fratura E-W do assoalho oceânico. O Arquipélago faz parte do Parque Nacional Marinho Fernando de Noronha e os bancos de rodolitos são conhecidos em profundidades que variam dos 10 m aos 100 m e sete espécies de Corallinophycidade já foram registradas para a região (Amado-Filho *et al.*, 2012b; Burgos, 2010).

A amostragem na Paraíba foi realizada próxima à costa de Cabedelo e esta região é considerada com uma das áreas prioritárias para conservação, incluindo bancos de rodolitos ainda não impactados pela exploração (Riul *et al.*, 2009).

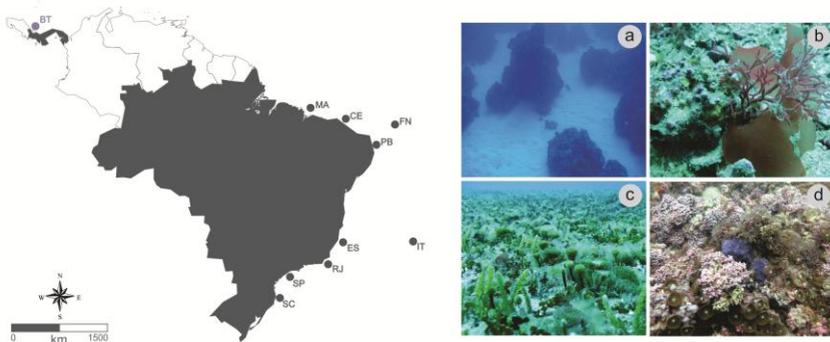
No estado do Espírito Santo (ES), foram amostradas duas ilhas: uma costeira e outra oceânica, nenhuma delas sob alguma forma de proteção ambiental. A Escalvada (Figura 2.1 b) está localizada a oito km da costa, no município de Guarapari e foram amostradas tanto formas incrustantes, como rodolitos, estes muitas vezes epifitados por algas vermelhas foliosas. Já a Ilha da Trindade está localizada a 1200 km da cidade de Vitória, o ponto mais distante da costa amostrado no presente estudo. Faz parte da cadeia de montes submarinos denominada Cadeia Vitória-Trindade, cujos únicos a submergirem são a Ilha da Trindade e as Ilhas de Martin Vaz. Biogeograficamente, faz parte da zona de transição que corresponde o estado do ES e, apesar da distância do continente, as populações de peixes recifais e de outros organismos com mecanismos de dispersão limitada parecem se comunicar com as populações costeiras pela teoria dos *stepping stones* (trampolins) (Floeter *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2009). Os recifes na Ilha da Trindade são formados principalmente pela cimentação de algas

calcáreas, contudo, formas livres também foram encontradas formando o Banco do Farol (Figura 2.1 c).

No Rio de Janeiro, as coletas foram realizadas em duas ilhas costeiras, Âncoras e dos Papagaios e foram amostradas formas incrustantes.

No estado de São Paulo (SP), obtiveram-se amostras de quatro ilhas costeiras. Ilhabela e Ilha das Cabras fazem parte Parque Estadual de Ilhabela, situado no litoral norte de SP. São Sebastião é uma região importante no estudo das Hapalidiaceae, especialmente pelo fato de ser a localidade tipo de *Lithothamnion brasiliense* e *L. heteromorphum*, espécies propostas pelo pioneiro Foslie no final do século XIX. A Ilha das Palmas também está situada no litoral norte de SP e faz parte do Parque Estadual da Ilha da Anchieta. No litoral sul, as coletas foram realizadas na Ilha Queimada Grande, Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) e localizada a 35 km do Município de Itanhaém. O ambiente amostrado dessas ilhas foi muito semelhante, fundo composto por pedras e areia e as formas incrustantes foram amostradas.

No limite sul de ocorrência de bancos de rodolitos no Atlântico Sul (Gherardi, 2004), as coletas foram realizadas no banco do Rancho Norte (Figura 2.1 d), Ilha do Arvoredo, cuja área está inserida na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, localizada a 11km ao norte da Ilha de Santa Catarina.



**Figura 2.1 (a-d).** Localidades amostradas ao longo do litoral brasileiro. (a) Parcel Manuel Luís/MA. (b) Ilha Escalvada/ES. (c) Ilha da Trindade/ES. (d) Ilha do Arvoredo/SC. Legenda: MA: Maranhão; CE: Ceará; FN: Fernando de Noronha; PB: Paraíba; ES: Espírito Santo; IT: Ilha da Trindade; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; SC: Santa Catarina; BT: Bocas Del Toro.

## 2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Após a coleta, os espécimes foram limpos para a remoção de epífitas e fauna associada, lavados em água doce. Para as análises moleculares, o material (ou parte dele) foi seco à sombra e armazenado em sílica em gel (a Tabela 2.1 apresenta os dados resumidos e o Apêndice A contém os dados completos). Para o estudo morfológico, o material foi fixado em formol 4% e depois de 24 horas transferido para a solução de etanol (70%) com glicerol (10%). Os espécimes serão depositados no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Tabela 2.1.** Espécimes de Hapalidiaceae coletados ao longo do litoral brasileiro para os quais foram obtidas sequências de UPA, *psbA* e *rbcL* (✓ = presença, - ausência).

Código amostra	Espécie	Local	Marcadores Moleculares		
			UPA	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>
LUC02	<i>M. erubescens</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	-	-
ES04	<i>M. erubescens</i>	Ilhas Rasas, ES	-	✓	-
ES01	<i>M. erubescens</i>	Ilhas Rasas, ES	-	-	✓
SP04	<i>M. erubescens</i>	Ilha das Cabras, SP	-	-	✓
PB01	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Cabedelo, PB	✓	-	✓
CE09	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Risca do Meio, CE	✓	-	-
PML01	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Parcel Manuel Luís, MA	✓	-	-
PML02	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Parcel Manuel Luís, MA	✓	-	-
IT85	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT74	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT54	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT39	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT35	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT34	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT29	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT25	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT13	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
FN03	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Baia Sueste, FN	✓	-	-
IT10	<i>Mesophyllum</i> sp.1	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
BT01	não identificado	Sandfly Bay, PN	✓	✓	-
IT32	não identificado	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
BT10	não identificado	Isla Bastimento, PN	✓	-	-
BT16	não identificado	Isla Bastimento, PN	✓	-	-
IT72	não identificado	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
IT84	não identificado	Ilha da Trindade, ES	✓	-	-
AJ01	não identificado	Arraial d' Ajuda, BA	✓	-	-
CE11	não identificado	Risca do Meio, CE	✓	-	✓
IA09	<i>L. crispatum</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	✓	✓
LUC04	<i>L. crispatum</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	-	-
LUC08	<i>L. crispatum</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	-	-
RN06	<i>M. engelhartii</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	-	✓
CB01	<i>M. engelhartii</i>	Ilha dos Papagaios, RJ	✓	-	✓
CB04	<i>M. engelhartii</i>	Ilha dos Papagaios, RJ	✓	-	-
IA04	<i>M. engelhartii</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	✓	✓
MS42	<i>M. engelhartii</i>	Ilha do Xavier, SC	✓	-	-
RN04	<i>M. engelhartii</i>	Ilha do Arvoredo, SC	✓	✓	-
CAB20	<i>M. engelhartii</i>	Ilha das Cabras, SP	✓	✓	-
PAL29	<i>M. engelhartii</i>	Ilha das Palmas, SP	✓	✓	-
IBC1068	<i>M. engelhartii</i>	Ilha Âncora, RJ	✓	-	-
ES13	<i>Lithothamnion</i> sp.1	Ilha Escalvada, ES	✓	-	-
ES18	<i>Lithothamnion</i> sp.1	Ilha Escalvada, ES	✓	-	-
ES02	<i>Lithothamnion</i> sp.3	Ilha Escalvada, ES	✓	-	-
CE06	<i>Lithothamnion</i> sp.2	Risca do Meio, CE	✓	✓	-
CE10	<i>Lithothamnion</i> sp.2	Risca do Meio, CE	✓	-	-
ES15	<i>Lithothamnion</i> sp.2	Ilha Escalvada, ES	✓	-	-
ES20	<i>Lithothamnion</i> sp.2	Ilha Escalvada, ES	✓	✓	-
IT66	não identificado	Ilha da Trindade, ES	✓	-	✓

## 2.3 ESTUDO MOLECULAR

### 2.3.1 Marcadores moleculares utilizados

#### (a) UPA (*Universal Plastid Amplicon*)

Sugerido como outro possível candidato a *DNA Barcode* em organismos fotossintetizantes (Presting, 2006). Este marcador tem origem plastidial, é uma região curta, com aproximadamente 410 pb, e menos variável do que o *cox1* (gene que transcreve para a citocromo *c* oxidase). Sherwood & Presting (2007) analisaram os níveis de divergência deste marcador molecular para 62 sequências de algas vermelhas, 19 de algas verdes, 14 de algas pardas, oito de cianobactérias, duas de diatomáceas, uma xantófita e uma euglenófita e, foi possível distinguir a maioria das espécies incluídas na análise. As seguintes características fortalecem o UPA como candidato a *DNA Barcode*: região pequena, *primers* universais, fácil amplificação e presente nas linhagens fotossintetizantes.

#### (b) *psbA*

Gene de origem plastidial, transcreve para proteína D1 da membrana do tilacóide do fotossistema II. Um pouco menor que o *rbcL*, possui cerca de 1.050 pb. Os *primers* externos foram desenvolvidos por Yoon *et al.*, (2002) e amplamente utilizados entre as florideofíceas (Yang & Boo, 2004; Kim *et al.*, 2006; West & Zuccarello, 2009). Entre as calcárias, Broom *et al.*, (2008) tiveram uma boa resolução na reconstrução filogenética de espécimes da Nova Zelândia. Este marcador vem mostrando variação interespecífica suficiente para a separação de espécies e identificação de novas espécies entre as Corallinophycidae, como *Lithophyllum atlanticum* Vieira-Pinto, Oliveria *et Horta* (Vieira-Pinto *et al.*, em avaliação) e *Sporolithon tenue* Bahia, Amado-Filho, Maneveldt *et W.H. Adey* (Bahia *et al.*, 2013).

#### (c) *rbcL* (RuBisCO)

O *rbcL*, gene que transcreve para a subunidade maior da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase, com aproximadamente 1.350 pb, é um marcador que vem sendo utilizado com sucesso para elucidar posicionamento de espécies e em reconstruções filogenéticas de muitos grupos de Rhodophyta (Freshwater & Rueness, 1994). Apesar de nenhum trabalho ainda ter sido publicado usando o *rbcL* para a reconstrução filogenética de Corallinophycidae, esta região vem sendo utilizada no sequenciamento de material de herbário, os quais são uma

promessa na resolução de muitas confusões taxonômicas (Saunders & McDevit, 2012; Hughey & Gabrielson, 2012).

### 2.3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA, pequenos pedaços de alga calcária foram selecionados sob a lupa e triturados, com o auxílio de um almofariz e um pistilo, previamente congelados, em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A extração de DNA foi feita com o *kit NucleoSpin Plant II* (Macherey-Nagel, Düren, Germany), de acordo com o protocolo do fornecedor.

### 2.3.3. Amplificação, purificação e sequenciamento

Os marcadores moleculares foram amplificados a partir da PCR. Para um volume final de 50  $\mu$ L, foram utilizados: 1x PCR buffer, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada primer (*Foward* e *Reverse*), 5-10 ng de DNA total e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Os ciclos da PCR variaram de acordo com a região a ser amplificada, conforme segue na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Ciclos de PCR utilizados para a amplificação de cada marcador molecular.

Marcador	Desnaturação inicial (1)	Desnaturação (2)	Anelamento (3)	Extensão (4)	Extensão final (5)	Ciclos (etapas 2 a 4)
<b>UPA</b>	94°C por 2'	94°C por 20"	55°C por 30"	72°C por 30"	72°C por 10'	35 ciclos
<i>rbcL</i>	94°C por 4'	94°C por 30"	45°C por 1'	72°C por 2'	72°C por 7'	35 ciclos
<i>psbA</i>	94°C por 2'	94°C por 30"	47°C por 1'	72°C por 2'	72°C por 7'	30 ciclos

Para a amplificação do UPA, foram utilizados os *primers* UPA F (a sequência de todos os *primers* estão na Tabela 2.3) e UPA R (Presting, 2006). Para o *psbA*, utilizou-se o par de *primers*: *psbAF* e *psbAR2* (Yoon *et al.*, 2002) para a PCR, enquanto para o sequenciamento, foram necessários outros dois *primers* internos (500F e 600R, Yoon *et al.*, 2002). Contudo, o *primer* 600R não funcionou para

algumas amostras, assim sendo, foi desenhado um novo *primer* em uma região próxima ao 600R, denominado 550R.

**Tabela 2.3.** Sequência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento dos marcadores UPA, *psbA* e *rbcL*.

<i>Primer</i>	Sequência
UPA F	5'- GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA - 3'
UPA R	5'- TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG - 3'
<i>psbA</i> F	5'- ATG ACT GCT ACT TTA GAA AGA CG - 3'
<i>psbA</i> R2	5'- TCA TGC ATW ACT TCC ATA CCT A - 3'
<i>psbA</i> 500F	5'- CTC TGA TGG WAT GCC WYT AGG - 3'
<i>psbA</i> 600R	5'- CCA AAT ACA CCA GCA ACA CC - 3'
<i>psbA</i> 550R*	5'- TTR TGT TCR GCY TGR AAT AC - 3'
F753	5'- GGA AGA TAT GTA TGA AAG AGC - 3'
<i>RbcS</i>	5'- GTT CTT GTG TTA ATC TCA C - 3'

\* *primer* desenvolvido para o presente estudo.

O *rbcL* foi amplificado e sequenciado apenas para sua segunda parte a partir dos par de *primers* F753 e o *RbcS* (Freshwater & Rueness, 1994).

A PCR foi feita em um termociclador de gradiente (Techne TC-512, Techne Techgene, Burlington, USA) e após a reação, os fragmentos de DNA foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 0,7%. Os produtos amplificados foram purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com o protocolo do fornecedor. A quantificação do produto de PCR foi feita no aparelho Nanodrop®. A concentração de DNA obtida foi importante para mensurar a quantidade de produto de PCR purificado a ser utilizado na reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram feitas com o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, California USA), conforme o protocolo do fornecedor, usando os *primers* específicos para cada marcador molecular e o mesmo termociclador da PCR. Ao todo, foram 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 54°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA foram precipitados com 1 µL de EDTA 125 mM, 1µL de acetato de sódio 3M, 25 µL de etanol 100% e lavados em 35 µL de etanol 70%. As

amostras foram analisadas no sequenciador automático *ABI 3730 DNA Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Carlsbad, California USA).

### 2.3.4 Alinhamento

As sequências foram alinhadas e editadas no *BioEdit version 5.0.6* (Hall, 1999), os cromatogramas foram conferidos à olho para a validação de nucleotídeos ambíguos e então gerada uma sequência-consenso. Alinhamentos múltiplos foram gerados para cada marcador (excluindo as regiões dos *primers* externos, pois estes representam sequências artificiais) usando o *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) disponível no *BioEdit*.

Para o UPA, foi construída uma matriz com 63 sequências a partir das sequências geradas no presente estudo e oito disponíveis no banco de dados *GenBank* (Apêndice B), incluindo *Gracilaria dotyi* (EF426613) como grupo externo, ao todo foram analisados 328 nucleotídeos. Na matriz de *psbA*, 570 posições de 21 sequências foram usadas para inferir as relações filogenéticas. Nove sequências provenientes do *GenBank* (Apêndice C) foram incluídas e *Rhodogorgon* sp. (GQ917504) foi usado como grupo externo. Ainda, 642 pares de base, iniciado na posição 826 do marcador *rbcL*, foram analisados em uma matriz de 12 sequências, três dessas obtidas no *GenBank* (Apêndice D).

### 2.3.5 Análises de agrupamento e filogenéticas

Para o UPA, *psbA* e *rbcL* foram construídas árvores de agrupamento utilizando o método de distância (*Neighbor-Joining* - NJ) no programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) com 2000 replicações de *bootstrap*. Para as análises filogenéticas foram utilizados os marcadores *psbA* e *rbcL*, os modelos evolutivos selecionados através do *jModeltest* 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2011) e analisadas usando Máxima Verossimilhança (MV) e Análise Bayesiana (MB). A MV foi estimada no MEGA5, através do método de *bootstrap* (2000 réplicas) e modelo evolutivo apropriado. Foram plotados apenas os valores iguais ou maiores que 70% para *bootstrap* e considerou-se a seguinte escala arbitrária para descrever as porcentagens de suporte: 70 a 89% - suporte moderado e, 90 a 100% - suporte alto. Já a MB foi feita no *MrBayes* v3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2011), utilizando-se duas corridas com quatro

cadeias de Markov, 4.000.000 de gerações. As cadeias foram iniciadas em árvores aleatórias, amostradas a cada 100 gerações e as gerações iniciais correspondentes ao *burn-in*, foram descartadas. A probabilidade *a posteriori* é dada nos ramos das árvores e representa a probabilidade daquele clado ser verdadeiro.

## 2.4 ESTUDO MORFOLÓGICO

As lâminas permanentes e os suportes de alumínio (*stubs*) utilizados para a observação em microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente, foram preparados de acordo com os procedimentos apresentados por Horta (2002) e Moura *et al.* (1997).

Para a MEV, foram separadas pequenas fraturas do material (no caso de fixado em álcool: glicerina, foram secas por 48 horas em estufa a 60°C), e então fixadas em *stubs* de alumínio com fita adesiva de carbono. O material foi recoberto com uma camada de ouro de 20-25 nm (tempo de exposição de 60 segundos, a uma corrente de 50 mA) e então foi observado em microscópio (JEOL JSM-6390LV), sob voltagem de 10 kV, a qual mostrou melhor resolução para o material analisado.

Para observação em ML, o material foi submerso em ácido clorídrico 5% até sua completa descalcificação. Em seguida, foi desidratado gradualmente em soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes em 100%, a intervalos de 20 minutos) para evitar que as estruturas celulares colapsassem. O material foi infiltrado por, no mínimo, 12 horas em solução de metacrilatoglicol e embocado segundo as instruções do fabricante (*Histo-resin embedding Kit Leica*, marca Reichert-Jung). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2125 RT, com navalha de aço. Os cortes variaram de 5-10µm de espessura e foram corados em azul de toluidina acidificado com ácido bórico (Horta, 2002) e foram montadas lâminas permanentes.

Na análise do material, foram consideradas tanto características vegetativas como reprodutivas. A forma de crescimento seguiu terminologia proposta por Woelkerling (1993) e, características anatômicas conforme Woelkerling (1988), Keats & Chamberlain (1994), Wilks & Woelkerling (1995).

Os caracteres vegetativos observados e mensurados foram:

- Hábito, cor e textura dos talos;

- Tipo de fixação ao substrato;
- Forma, comprimento e diâmetro das células epiteliais, subepiteliais, do peritalo e do hipotalo;
- Presença de conexões secundárias entre as células de filamentos adjacentes;
- Presença de fusões celulares entre células de filamentos adjacentes;
- Forma de crescimento do talo.

Apesar de nem sempre presentes, as estruturas reprodutivas também foram examinadas, essas guardam as principais características no posicionamento de espécie. Foram observados e mensurados os caracteres:

- Forma, diâmetro e altura do conceptáculo tetrasporangial;
- Posição dos poros em relação ao teto do conceptáculo tetrasporangial;
- Número de células do filamento do teto do conceptáculo tetrasporangial e espessura do teto;
- Número e forma das células que delimitam o canal do poro;
- Diâmetro e altura dos tetrasporângio;
- Forma, diâmetro e altura dos conceptáculos gametangiais.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ESTUDO MOLECULAR

Foram geradas no presente estudo 62 novas sequências: 44 sequências de UPA, nove sequências de *psbA* e nove sequências parciais de *rbcL*. O marcador UPA foi amplificado e sequenciado para as amostras a fim de gerar o panorama inicial da diversidade do grupo. Após a análise do agrupamento, exemplares foram selecionados e sequenciados para os outros dois marcadores. Foram geradas e incluídas nas análises três sequências de UPA, uma de *psbA* e uma de *rbcL* de material proveniente de Bocas del Toro, Panamá. Nove sequências de UPA, provenientes de ilhas costeiras de Santa Catarina, geradas em estudos pretéritos (Sissini, 2011) também enriqueceram as análises.

### 3.1.1 Análise do marcador UPA

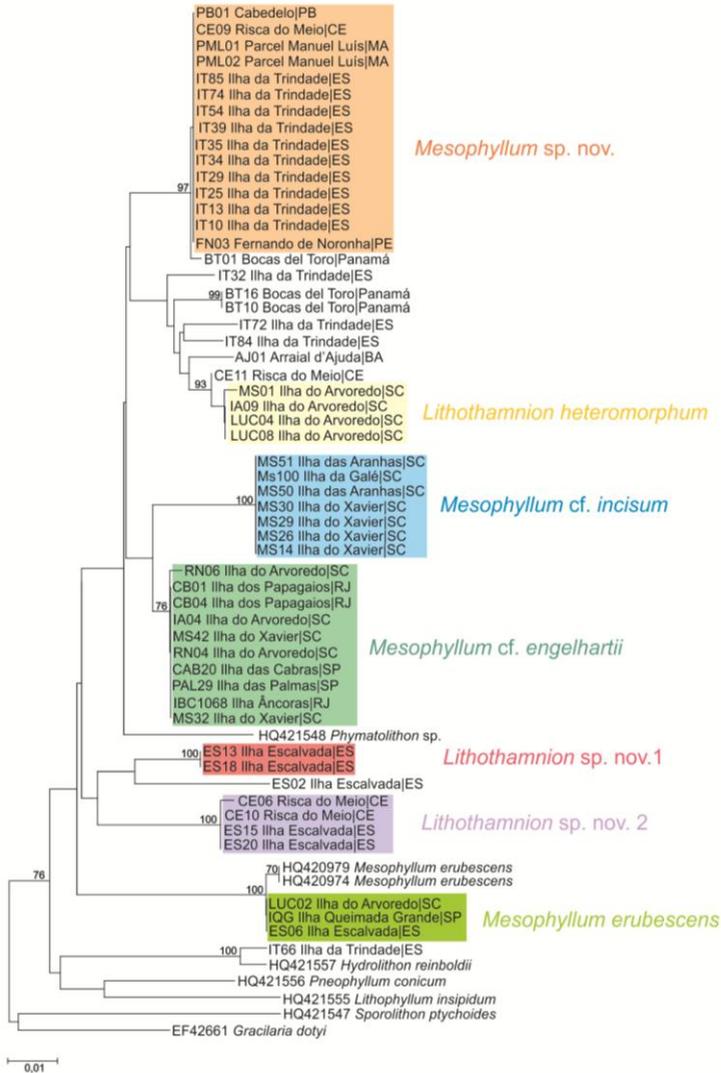
O marcador UPA (Figura 2.2) revelou um agrupamento com alto suporte (97% de *bootstrap*) de sequências de espécimes provenientes de regiões tropicais: Parcel Manuel Luís, Ceará, Fernando de Noronha, Paraíba, Ilha da Trindade e Bocas del Toro. Por outro lado, sete sequências de espécimes de ilhas costeiras de Santa Catarina agruparam-se também com alto suporte (100% de *bootstrap*), representando, neste caso, a província ficogeográfica Temperada Quente (Horta *et al.*, 2001).

Outro grande clado agrupou com suporte moderado (76% de *bootstrap*) materiais provenientes da Ilha do Arvoredo/SC, Ilha do Xavier/SC, Ilha de Palmas/SP, Ilha das Cabras/SP e Cabo Frio/RJ. Estes materiais foram posicionados em *Mesophyllum* sp., *M. cf. incisum* e *M.cf. engelhartii*, respectivamente.

Os espécimes da Ilha do Arvoredo, morfologicamente identificados com *Lithothamnion heteromorphum*, agruparam-se em um clado com baixo suporte (66% de *bootstrap*). Contudo, a divergência entre as sequências é de 0,3%. Sequências de espécimes identificados como *Lithothamnion* sp. nov. 1 da Ilha Escalvada formaram um clado com alto suporte (100% de *bootstrap*). *Lithothamnion* sp. nov. 2 do ES e CE posicionaram-se em um mesmo clado fortemente sustentado (100% de *bootstrap*). As sequências de *Lithothamnion* sp. nov. 1 são 6,1% divergentes de *L. heteromorphum* e de 5,8% a 6,1% divergentes de *Lithothamnion* sp. nov. 2.

O material brasileiro de *Mesophyllum erubescens* agrupou-se com 100% de *bootstrap* com sequências de material proveniente do Havaí. Esses dados serão apresentados e discutidos em maior profundidade no Capítulo 3.

O UPA segregou outras cinco prováveis espécies provenientes da Ilha da Trindade, Arraial d'Ajuda e Ilha Escalvada. No entanto, como foi coletado apenas um indivíduo, não foi realizada uma análise detalhada de suas morfologias no presente estudo.



**Figura 2.2.** Filograma de distância de *Neighbor-Joining* (NJ) para as sequências do marcador UPA. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 70 foram plotados. As sequências disponíveis no *GenBank* e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso. Como grupo externo, foi utilizada a sequência de *Gracilaria dotyi*. A escala representa o número de substituições.

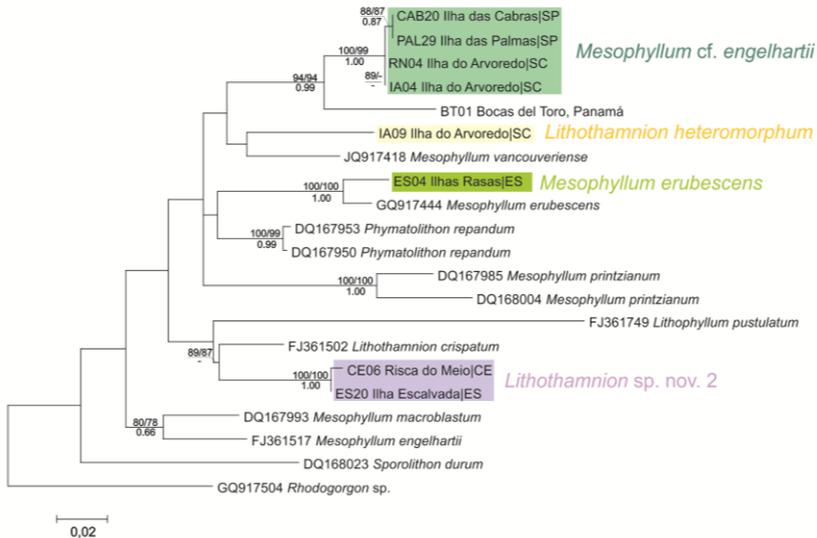
### 3.1.2 Análise do marcador *psbA*

A matriz do marcador *psbA* foi formada com 21 sequências e 570 posições analisadas. A Figura 2.3 apresenta o filograma referente às análises de MV e os valores obtidos referente as outras análises estão plotados nos ramos.

*Mesophyllum* cf. *engelhartii*, proveniente de SP e SC, formou um clado monofilético e com alto suporte de *bootstrap* para NJ e MV e 1,00 de probabilidade *a posteriori* para MB. O marcador *psbA* evidenciou uma maior identidade entre as sequências de SP (que agruparam com valores de *bootstrap* 88% e 87% para NJ e MV, respectivamente). A divergência encontrada entre as amostras de SC e de SP foi de 0,4 a 0,6%.

O material de *M. erubescens* agrupou-se com 100% de *bootstrap* para NJ e MV e 1,00 de probabilidade *a posteriori* na MB ao material de mesmo epíteto específico oriundo de Vanuatu, a divergência entre as sequências do material proveniente do Brasil e de Vanuatu é de 3%.

Na análise do marcador *psbA*, o material identificado como *L. heteromorphum* para a Ilha do Arvoredo (IA09), com base nas características do conceptáculo tetrasporangial, posicionou-se em um ramo distante da sequência de *L. crispatum* da Nova Zelândia. Esta última sequência, agrupou-se com suporte moderado (89% e 87% de *bootstrap* para NJ e MV, respectivamente) às sequências de *Lithothamnion* sp. nov. 2.



**Figura 2.3.** Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as seqüências do marcador *psbA*. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 70 foram plotados. Os valores em cima dos ramos e à esquerda são referentes à análise de *Neighbor-Joining* (NJ) e à direita à MV. Os valores de probabilidade *a posteriori* da Análise Bayesiana (MB) estão abaixo do ramo. As seqüências disponíveis no GenBank e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso. Como grupo externo, foi utilizada a seqüência de *Rhodogorgon* sp. A escala representa o número de substituições.

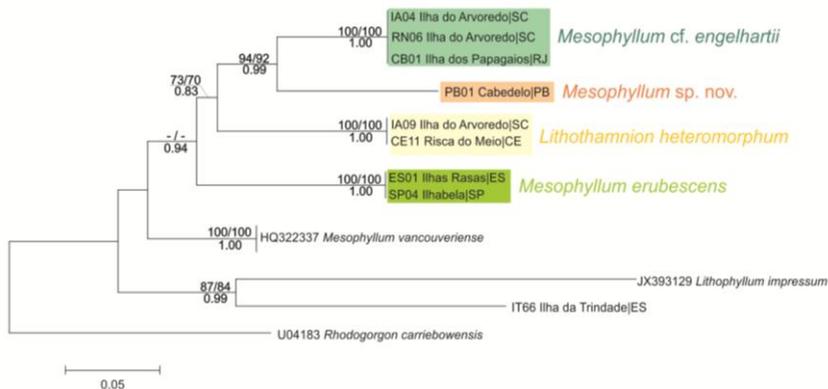
### 3.1.3 Análise do marcador *rbcL*

A Figura 2.4 apresenta a árvore referente às análises de MV para o marcador *rbcL*. A monofilia do gênero *Mesophyllum* não foi recuperada. As seqüências do presente estudo posicionaram-se em quatro clados fortemente sustentados. Diferentemente das seqüências de *psbA* de *Mesophyllum* cf. *engelhartii*, não houve separação entre os materiais provenientes do RJ e SC.

A seqüência de *L. heteromorphum* de SC agrupou-se com a seqüência de material proveniente do CE em clado com alto suporte (100% de *bootstrap* para NJ e MV) e 1,00 de probabilidade *a posteriori* para MB.

As seqüências do material do ES e SP, morfologicamente posicionado em *M. erubescens*, constituíram um clado basal fortemente

sustentado (100% de *bootstrap* para NJ e MV) e 1,00 de probabilidade *a posteriori* para MB.



**Figura 2.4.** Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador *rbcL*. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 70 foram plotados. Os valores em cima dos ramos e à esquerda são referentes à análise de *Neighbor-Joining* (NJ) e à direita à MV. Os valores de probabilidade *a posteriori* da Análise Bayesiana (MB) estão abaixo do ramo. As sequências disponíveis no *GenBank* e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso. Como grupo externo, foi utilizada a sequência de *Rhodogorgon carriebowensis*. A escala representa o número de substituições.

### 3.1.4 Variação intraespecífica dos marcadores moleculares

A Tabela 2.4 apresenta de forma resumida os valores de divergência intraespecífica e interespecífica para os três marcadores moleculares utilizados no presente estudo. O UPA mostrou-se mais conservado na segregação de espécies distintas, com valores de divergência variando entre 2,5% e 8,3%. O *psbA* e o *rbcL* mostraram maior variação interespecífica (9,5% a 11,1% para o *psbA* e 10,2% a 14,7% para o *rbcL*).

**Tabela 2.4.** Divergências intraespecíficas e interespecíficas para os marcadores UPA, *psbA* e *rbcL* entre as amostras sequenciadas para este estudo (pb - número de pares de base).

Marcadores Moleculares	variação intraespecífica		variação interespecífica	
	%	pb	%	pb
UPA	0,3	1	2,5-8,3	8-27
<i>psbA</i>	0,2-0,6	1-3	9,5-11,1	54-63
<i>rbcL</i> (parcial)	0	0	10,2-14,7	65-94

### 3.2 ESTUDO MORFOLÓGICO

SUBCLASSE Corallinophycidae

ORDEM Corallinales

FAMÍLIA Hapalidiaceae

SUBFAMÍLIA Melobesioideae

GÊNERO *Mesophyllum* Me. Lemoine, 1928

*Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine

Resultados apresentados no Capítulo 2 desta dissertação.

*Mesophyllum* sp. nov. 1

LOCALIDADE TIPO: Parcel Manuel Luís, Maranhão

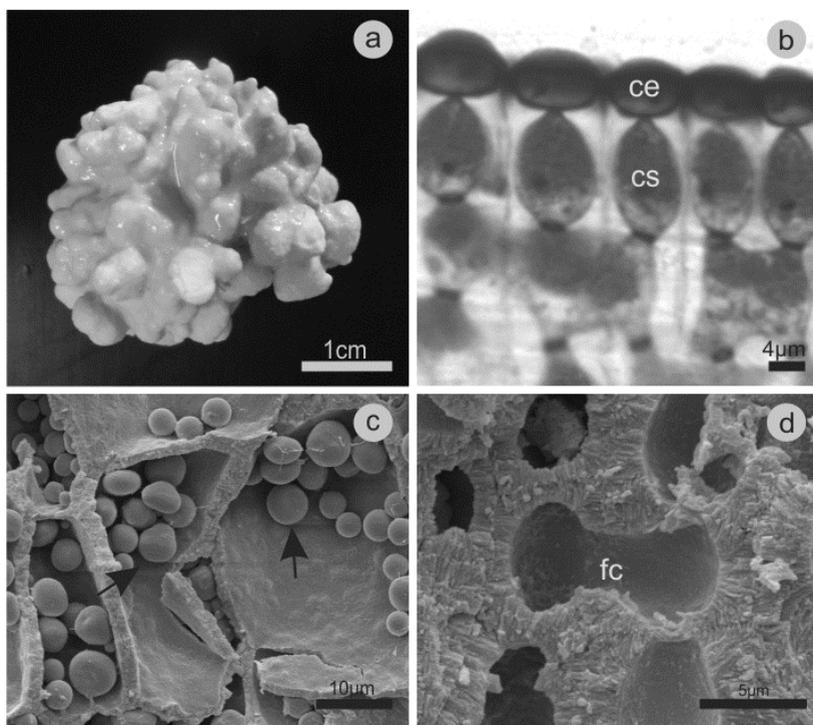
HOLÓTIPO: PML01

ISÓTIPO: PML02

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **MARANHÃO**, Parcel Manuel Luís. **CEARÁ**, Risca do Meio. **PERNAMBUCO**, Arquipélago Fernando de Noronha. **PARAÍBA**, Cabedelo. **ESPÍRITO SANTO**, Ilha da Trindade.

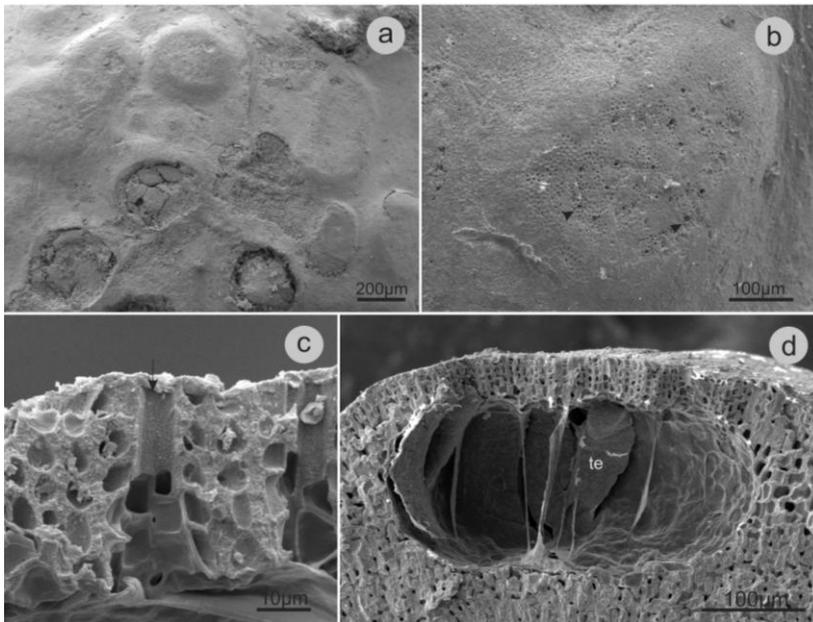
MATERIAL EXAMINADO: **MARANHÃO**, Parcel Manuel Luís, 8.IV.2012, P. Horta. **CEARÁ**, Risca do Meio, 18.IV.2012, M. Sissini. **PERNAMBUCO**, Arquipélago Fernando de Noronha, 22.XI.2011, F. Scherner & D. Burgos. **PARAÍBA**, Cabedelo, 9.IV.2012, L. Lucena. **ESPÍRITO SANTO**, Ilha da Trindade, 31.VII.2012, 01.VIII.2012, 02.VIII.2012, M. Sissini.

**HÁBITO E ESTRUTURA VEGETATIVA:** Plantas não articuladas, incrustantes e formadoras de rodolitos. Aspecto fruticoso a granuloso (Figura 2.5 a), com protuberâncias curtas, apresentando 2-4 mm de altura e 2 mm de diâmetro. Plantas pseudoparenquimatosas. Células epiteliais arredondadas a achatadas, mas nunca em forma de taça (Figura 2.5 b), com 3-9  $\mu\text{m}$  de altura e 8-12  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Células subepiteliais mais longas do que as demais do filamento (Figura 2.5 b), com 7-16  $\mu\text{m}$  de altura e 8-13  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Foram observados grãos de amidos em abundância dispostos na parede celular (Figura 2.5 c). Células dos filamentos adjacentes unidas lateralmente por fusão celular (Figura 2.5 d) e conexões celulares secundárias não foram observadas.



**Figura 2.5 (a-d).** Hábito e aspectos vegetativos de *Mesophyllum* sp. nov. 1. **(a)** Aspecto geral do holótipo (PML01). **(b)** Células epiteliais (ce) arredondadas a achatadas e subepiteliais (cs) mais alongada do que as demais células do filamento. **(c)** Grãos de amido, indicados pela seta, dispostos na parede celular. **(d)** Células de filamentos adjacentes ligadas por fusão celular (fc).

**ESTRUTURA REPRODUTIVA:** Conceptáculos tetrasporangiais multiporados dispersos ou aglomerados no talo. Conceptáculos tetrasporangiais enterrados. Teto do conceptáculo tetrasporangial plano, não diferenciado em um aro periférico e o centro em depressão (Figura 2.6 a) e poros no mesmo plano do teto do conceptáculo (Figura 2.6 b), não foram observados poros afundados. Teto do conceptáculo tetrasporangial com 32-85  $\mu\text{m}$  de espessura e composto por filamentos de 5-7 células. Filamento que delimita o canal do poro composto por células, de forma e tamanho semelhante às demais células dos filamentos adjacentes; forma um alargamento na base do poro, em corte longitudinal apresenta forma de sino (Figura 2.6 c). Câmara do conceptáculo tetrasporangial com 140-345  $\mu\text{m}$  de altura e 222-456  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 2.6 d). Tetrasporângios dispersos no assoalho, medindo 108  $\mu\text{m}$  de altura e 77  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Não foram encontradas plantas masculinas e femininas.



**Figura 2.6 (a-d).** Aspectos reprodutivos de *Mesophyllum* sp. nov. 1. (a-c) Conceptáculos tetrasporangiais multiporados. (a) Vista superficial. (b) Teto do conceptáculo tetrasporangial não diferenciado em um aro periférico e centro em depressão. Ponta da seta indicando os poros. (c) Detalhe do canal do poro mais

largo na porção basal, em forma de sino. Seta indicando a abertura do poro. (d)  
 Conceptáculo com tetrasporângios (te) no interior da câmara.

*Mesophyllum* cf. *incisum* Foslie (Adey)

LOCALIDADE TIPO: Bay of Islands, Nova Zelândia

LECTÓTIPO: TRH (voucher n° 6354)

#### BASINÔMIO

*Lithothamnion patena* f. *incisa* (Foslie)

#### SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

*Lithothamnion patena* f. *incisa* Foslie

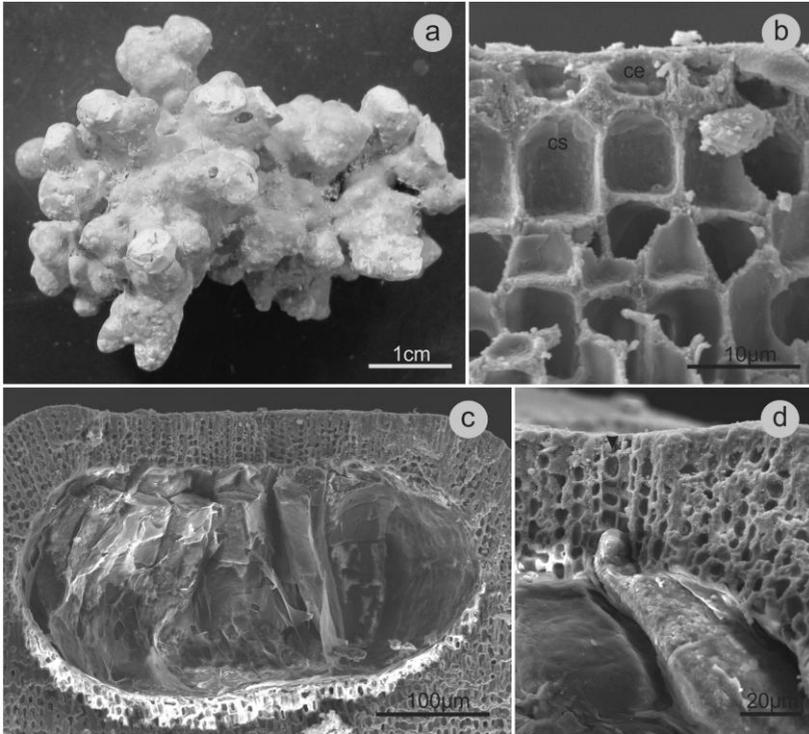
*Lithothamnion incisum* (Foslie) Foslie

*Polyporolithon patena* var. *incisa* (Foslie) Chapman & Parkinson

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **SANTA CATARINA**. Ilha do Xavier, Ilha da Galé, Ilha das Aranhas.

MATERIAL EXAMINADO: BRASIL. **SANTA CATARINA**. Ilha do Xavier, 18.I.2010, M. Sissini; Ilha da Galé, 8.VII.2010, E. Bastos; Ilha das Aranhas, 1.II.2011, M. Sissini & E. Bastos.

DIAGNOSE: Plantas não articuladas, incrustantes. Protuberâncias curtas e não ramificadas, com 4-5 mm de altura e 3-6 mm de diâmetro (Figura 2.7 a). Plantas pseudoparenquimatosas. Células epiteliais arredondadas a achatadas, mas nunca em forma de taça com 7-8 µm de altura e 4-5 µm de diâmetro; células subepiteliais mais alongadas do que as demais células do filamento, 10-14 µm de altura e 6-7 µm de diâmetro (Figura 2.7 b). Conceptáculos tetrasporangiais multiporados (Figura 2.7 c), filamento do teto do conceptáculo com 41-65 µm de espessura. Células do filamento que delimita o canal do poro mais estreitas do que as demais células do teto do conceptáculo (Figura 2.7 d). Câmara do conceptáculo tetrasporangial medindo 227-306 µm de altura e 311-449 µm de diâmetro. Tetrasporângios dispersos, 157-213 µm de altura e 55-73 µm de diâmetro.



**Figura 2.7 (a-d).** *Mesophyllum* cf. *incisum*. **(a)** Aspecto geral. **(b)** Células epiteliais arredondadas a achatadas (ce) e células subepiteliais (cs) mais alongada do que as demais células do filamento. **(c)** Conceptáculo tetrasporangial com tetrasporângios dispersos no assoalho. **(d)** Detalhe do tetrasporângio saindo pelo canal do poro, ponta da seta indicando a abertura do poro.

*Mesophyllum* cf. *engelhartii* (Foslie) W.H. Adey

BASINÔMIO: *Lithothamnion engelhartii* Foslie

HOLÓTIPO: TRH, sem número

LOCALIDADE TIPO: Cape Jaffa, Sul da Austrália

SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

*Lithothamnion engelhartii* Foslie 1900

SINÔNIMOS HETEROTÍPICOS

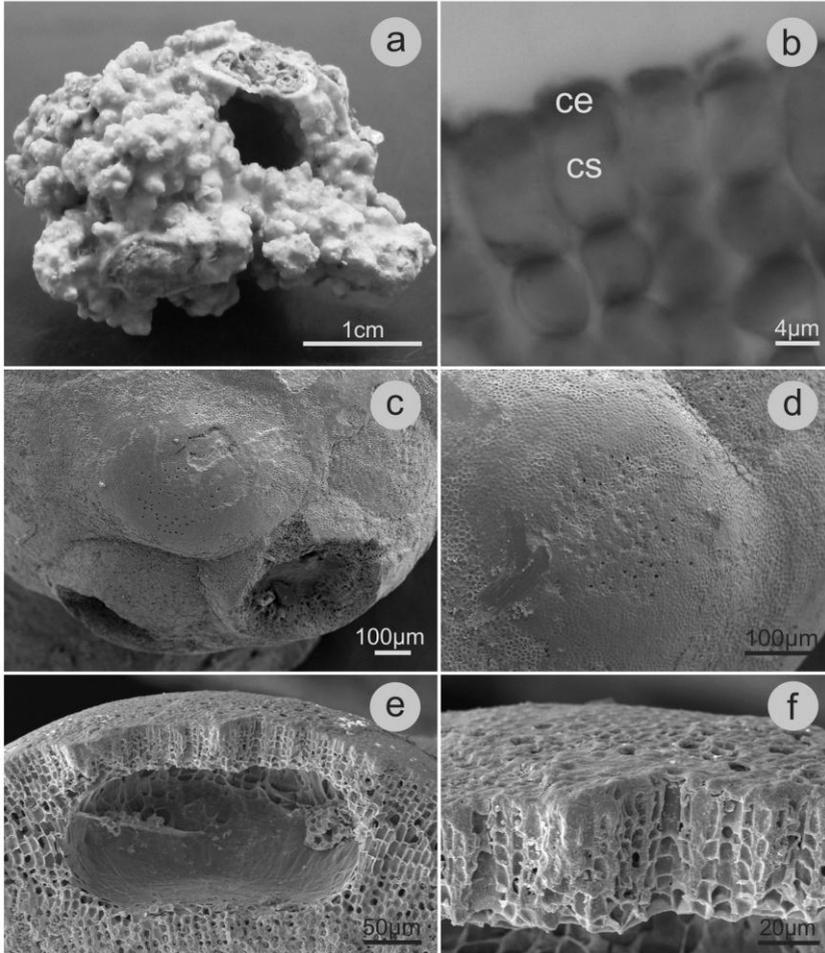
*Lithothamnion synanablastum* f. *speciosum* Foslie  
*Lithothamnion engelhartii* f. *umbonata* Foslie  
*Lithothamnion engelhartii* f. *imbricata* Foslie  
*Lithothamnion fumigatum* Foslie  
*Lithothamnion fumigatum* f. *aucklandica* Foslie  
*Lithothamnion aucklandicum* (Foslie) Foslie  
*Lithothamnion speciosum* (Foslie) Foslie  
*Lithothamnion discrepans* Foslie  
*Lithothamnion patena* f. *engelhartii* (Foslie) Heydrich  
*Lithothamnion versicolor* Foslie  
*Lithothamnion lemniscatum* Foslie  
*Mesophyllum discrepans* (Foslie) Me.Lemoine  
*Mesophyllum speciosum* (Foslie) Adey  
*Mesophyllum aucklandicum* (Foslie) W.H.Adey  
*Mesophyllum fumigatum* (Foslie) W.H.Adey  
*Mesophyllum lemniscatum* (Foslie) W.H.Adey  
*Mesophyllum versicolor* (Foslie) Adey

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **PERNAMBUCO**, Arquipélago Fernando de Noronha (Amado-Filho *et al.*, 2012a). **BAHIA**, Banco dos Abrolhos (Amado-Filho *et al.*, 2012b). **ESPÍRITO SANTO**, Cadeia Vitória-Trindade (Pereira-Filho *et al.*, 2012); Aracruz (Farias, 2009). **RIO DE JANEIRO**, Ilha dos Papagaios, Cabo Frio (presente estudo), Ilha Âncora, Armação dos Búzios (presente estudo). **SÃO PAULO**, Ilha das Palmas (presente estudo), Ilha das Cabras (presente estudo). **SANTA CATARINA**, Ilha do Xavier (Farias, 2009, presente estudo), Ilha do Arvoredo (presente estudo).

MATERIAL EXAMINADO: **SANTA CATARINA**, Ilha do Xavier; Ilha do Arvoredo, 25.II.2012, M. Sissini & B. Torrano. **RIO DE JANEIRO**, Ilha do Papagaio, 27.I.2013, M. Sissini & C. Martins.

DIAGNOSE: Plantas não articuladas de aspecto incrustante a verrucoso (Figura 2.8 a). Protuberâncias curtas e não ramificadas. Plantas pseudoparenquimatosas. Células epiteliais arredondadas a achatadas, mas nunca em forma de taça com 3-5 µm de altura e 7-11 µm de diâmetro; células subepiteliais mais alongadas do que as demais células do filamento, 11-16 µm de altura e 6-11 µm de diâmetro (Figura 2.8 b). Células de filamentos adjacentes conectados por fusão celular, conexões secundárias não foram observadas. Conceptáculos tetrasporangiais multiporados (Figura 2.8 c-e), filamento do teto do conceptáculo com

41-55  $\mu\text{m}$  de espessura. Células do filamento que delimita o canal do poro em número de seis, com forma e tamanho semelhante às demais células do teto do conceptáculo (Figura 2.8 f). Câmara do conceptáculo tetrasporangial medindo 104-245  $\mu\text{m}$  de altura e 202-356  $\mu\text{m}$  de diâmetro.



**Figura 2.8 (a-f).** *Mesophyllum cf. engelhartii*. (a) Aspecto geral. (b) Células epiteliais arredondadas a achatadas (ce) e células subepiteliais (cs) mais alongada do que as demais células do filamento. (c-e) Conceptáculo

tetrasporangial em vista superficial. (e) Câmara do conceptáculo tetrasporangial.  
(f) Detalhe do canal do poro.

GÊNERO *Lithothamnion* Heydrich, 1897  
*Lithothamnion heteromorphum* Foslie (Foslie)

BASINÔMIO: *Lithophyllum brasiliense* f. *heteromorpha* Foslie

LOCALIDADE TIPO: São Sebastião, Brasil

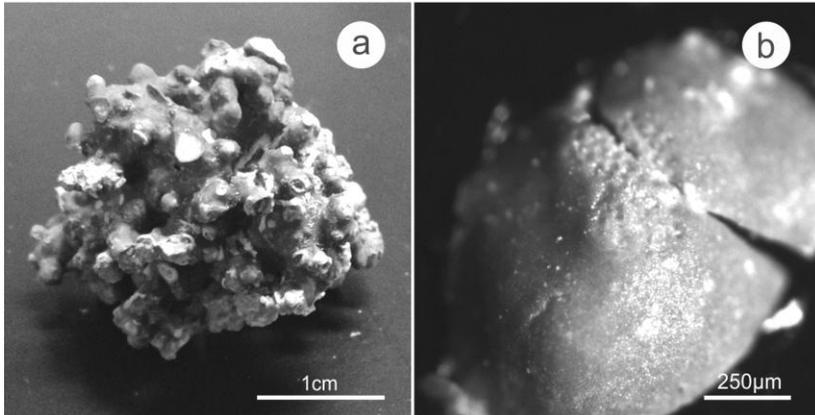
HOLÓTIPO: TRH, C16-3262

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **RIO GRANDE DO NORTE**, Guamaré (Farias *et al.*, 2010). **PERNAMBUCO**, Fernando de Noronha (Amado-Filho *et al.*, 2012b). **BAHIA**, Itamaracá (Farias *et al.*, 2010). **SANTA CATARINA**, Ilha do Arvoredo (Farias *et al.*, 2010, presente estudo).

IMAGENS DO MATERIAL BRASILEIRO: Farias *et al.*, 2010

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. SANTA CATARINA**, Ilha do Arvoredo, 25.II.2012, M. Sissini & B. Torrano; 28.XI.2012, M. Sissini & L. Ferreira. **SÃO PAULO**, São Sebastião, 1896.

DIAGNOSE: Plantas com aspecto fruticoso (Figura 2.9 a). Conceptáculos tetrasporangiais multiporados com teto elevado em relação plano e poros em depressão (Figura 2.9 b); filamento que delimita o canal do poro constituído por três células, sendo a basal mais alongada.



**Figura 2.9 (a-b).** Hábito e estrutura vegetativa de *Lithothamnion crispatum* (a) Aspecto geral. (b) Conceptáculo esporangial multiporado com poros em depressão.

*Lithothamnion* sp. nov. 1

LOCALIDADE TIPO: Ilha Escalvada, Guarapari/ES

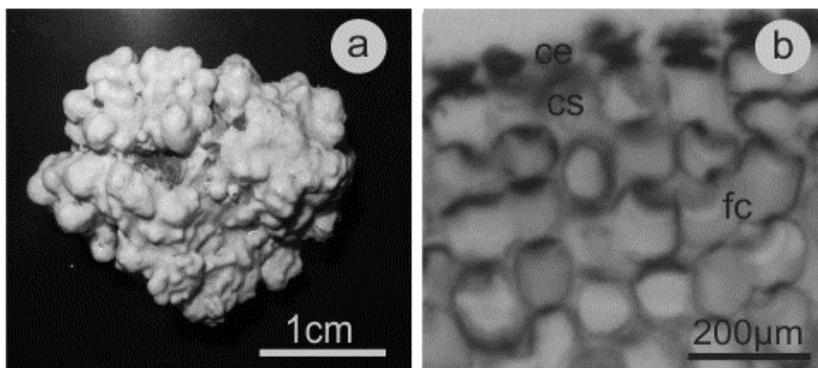
HOLÓTIPO: ES13

ISÓTIPO: ES18

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **ESPÍRITO SANTO**, Ilha Escalvada.

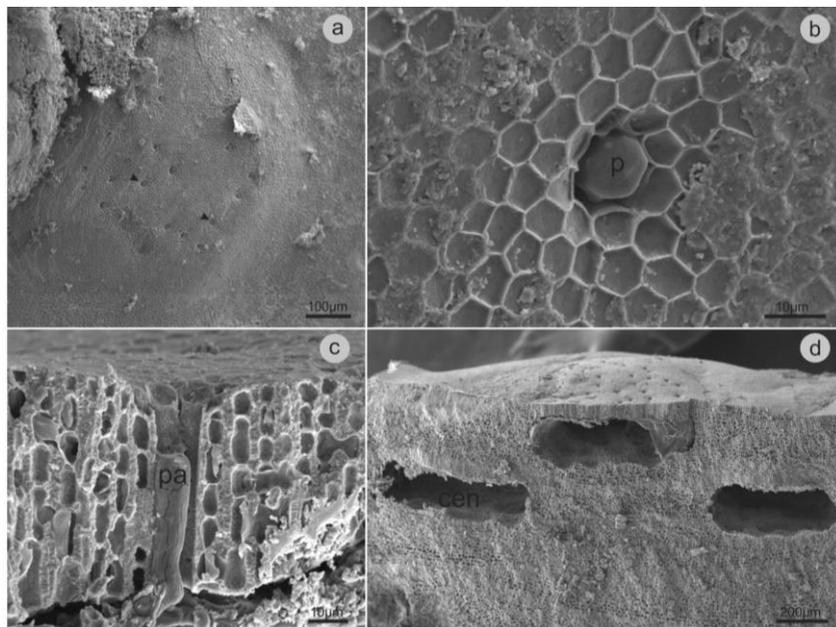
MATERIAL EXAMINADO: **ESPÍRITO SANTO**, Ilha Escalvada, 28.III.2012, P. Horta & M. Sissini.

**HÁBITO E ESTRUTURA VEGETATIVA:** Plantas não geniculadas, formadoras de rodolitos com aspecto granuloso (Figura 2.10 a). Protuberâncias inicialmente cilíndricas tornando-se mais arredondadas, na sua maior parte com 3-12 mm de diâmetro e 5-10 mm de altura. Talo pseudoparenquimatoso. Células de filamentos adjacentes ligados por fusões celulares; conexões secundárias não foram observadas. Células epiteliais em forma de taça e células subepiteliais de tamanhos variados (Figura 2.10 b) e forma cilíndrica. Células dos filamentos adjacentes conectadas por fusão celular, conexões secundárias não foram observadas. Tricocitos e haustórios não observados.



**Figura 2.10.** Hábito e estrutura vegetativa de *Lithothamnion* sp. nov. 1 (a) Aspecto geral do holótipo (ES13). (b) Vista superficial das células epiteliais (ce) em forma de taça e subepiteliais (cs) de tamanhos variados. Células de filamentos adjacentes conectadas por fusão celular (fc).

**ESTRUTURA REPRODUTIVA:** Conceptáculos esporangiais multiporados; teto do conceptáculo plano (Figura 2.11 a); poros afundados em relação à superfície, com 8 células ao redor (Figura 2.11 b); teto com 53-71  $\mu\text{m}$  de espessura, composto por 6-7 células; canal do poro delimitado por 6 células, de mesma forma e tamanho quando comparadas às células dos filamentos adjacentes (Figura 2.11 c); câmara do conceptáculo com 656  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 197  $\mu\text{m}$  de altura (Figura 2.11 d); não foram observados tetrasporângios. Conceptáculos masculinos e femininos não foram encontrados.



**Figura 2.11 (a-d).** Aspectos reprodutivos de *Lithothamnion* sp. nov. 1. **(a)** Vista superficial do conceptáculo multiporoso, ponta da seta indicando os poros. **(b)** Detalhe do poro (p), células dispostas ao redor do poro em fora d roseta. **(c)** Filamento que delimita o canal do poro com células de mesmo tamanho e forma dos filamentos adjacentes. Plugue apical (pa) obstruindo a saída do poro. **(d)** Conceptáculos esporangiais, também foram observados conceptáculos enterrados (cen).

*Lithothamnion* sp. nov. 2

LOCALIDADE TIPO: Ilha da Escalvada, Guarapari/ES

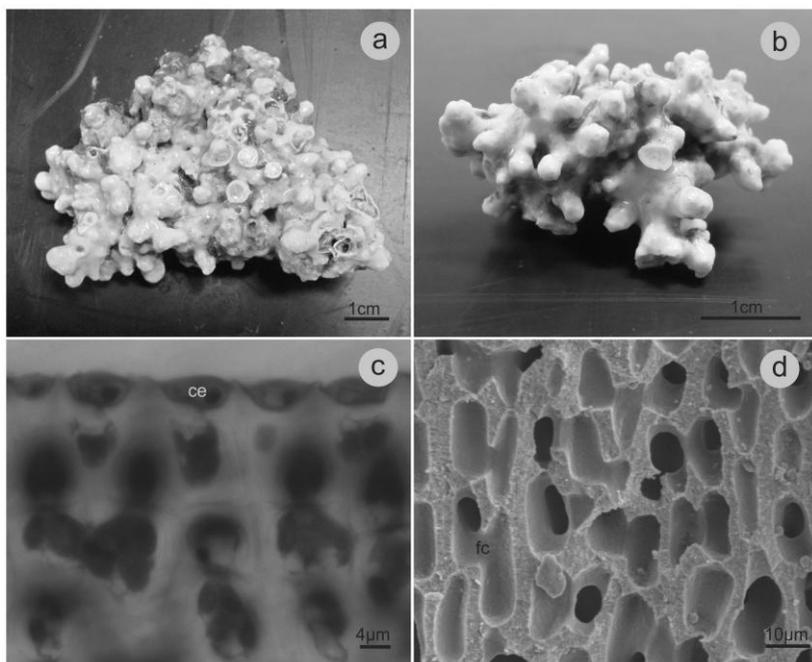
HOLÓTIPO: ES15

ISÓTIPO: ES20

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: **CEARÁ**, Risca do Meio. **ESPÍRITO SANTO**, Ilha Escalvada.

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. CEARÁ**, Risca do Meio, 18.IV.2012, M. Sissini. **ESPÍRITO SANTO**, Ilha Escalvada, 28.III.2012, P. Horta & M. Sissini.

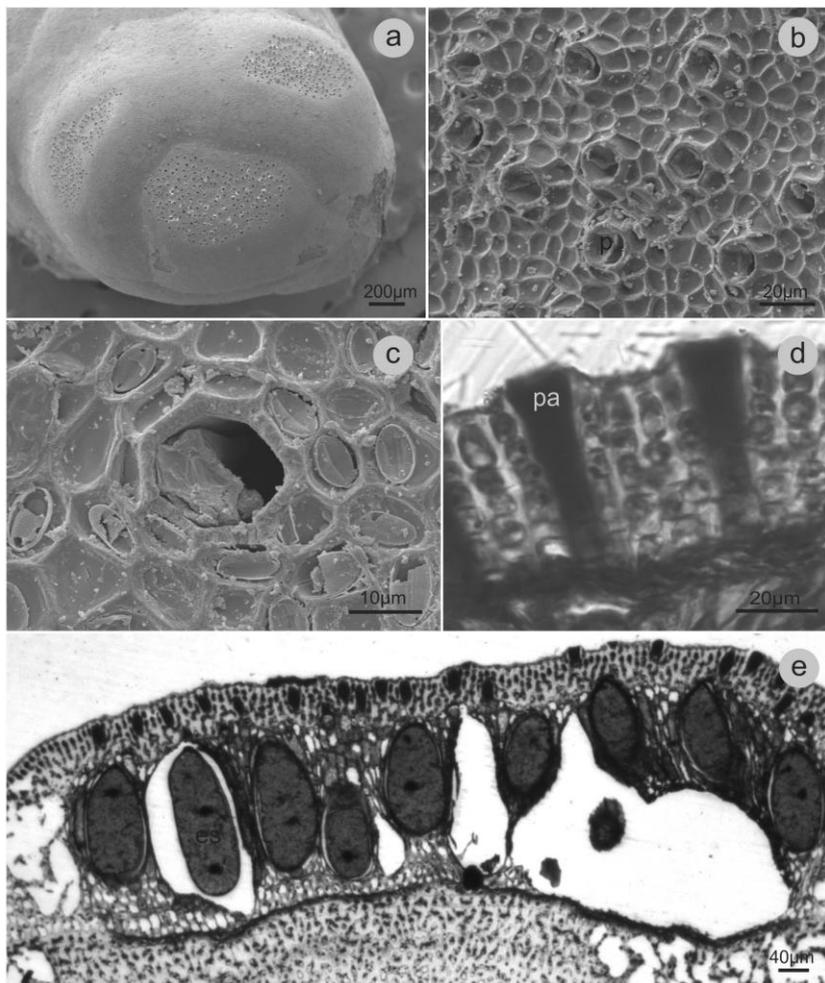
**HÁBITO E ESTRUTURA VEGETATIVA:** Plantas não geniculadas, formadoras de rodolitos com aspecto fruticoso (Figura 2.12 a,b). Protuberâncias ramificadas subdicotomicamente, inicialmente cilíndricas tornando-se mais arredondadas, na sua maior parte com 3,5-6,5 mm de diâmetro e 4-11 mm de altura. Talo pseudoparenquimatoso com organização monômera nas regiões crostosas. Células epiteliais em forma de taça, com 7-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 3-5  $\mu\text{m}$  de altura e células subepiteliais de tamanhos variados e forma cilíndrica com 8-14  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 10-17  $\mu\text{m}$  de altura (Figura 2.12 c). Tricocitos e haustórios não observados. Células de filamentos adjacentes ligados por fusões celulares (Figura 2.12 d) ; conexões secundárias não foram observadas.



**Figura 2.12 (a-d).** Hábito e estrutura vegetativa de *Lithothamnion* sp. nov. 2. (a) Aspecto geral dos espécimes analisados. (b) Vista superficial das células epiteliais. (c) Células epiteliais (ce) em forma de taça (d) Fusões celulares (fc).

**ESTRUTURA REPRODUTIVA:** Conceptáculos tetrasporangiais multiporados; teto do conceptáculo ligeiramente em depressão (Figura 2.13 a); poros notavelmente elevados em relação à superfície (Figura 2.13 b), com 6-8 células ao redor (Figura 2.13 c); teto com 46-68  $\mu\text{m}$  de

espessura, composto por 5-7 células; canal do poro delimitado por 5-7 células, de mesma forma e tamanho quando comparadas às células dos filamentos adjacentes (Figura 2.13 d); câmara do conceptáculo com 405-1038  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 187-273  $\mu\text{m}$  de altura; tetrasporângios dispersos na câmara com 53-84  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 126-201  $\mu\text{m}$  de altura, plugues apicais impedindo a saída desses, até que estejam maduros, foram observados (Figura 2.13 e). Conceptáculos masculinos e femininos não foram encontrados.



**Figura 2.13 (a-e).** Aspectos reprodutivos de *Lithothamnion* sp. nov. 2. **(a)** Vista superficial do talo com conceptáculos multiporados tetrasporangiais. **(b)** Detalhe de um conceptáculo multiporado, com teto levemente afundado. **(c)** Detalhe do poro notavelmente elevado em relação à superfície do teto, com 6-8 células ao redor. **(d)** Vista longitudinal do conceptáculo tetrasporangial. **(e)** Detalhe das células que delimitam o canal do poro, da mesma forma e tamanho dos filamentos adjacentes. Poro bloqueado pelo plugue apical.

### 3.3 CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO DE HAPALIDIACEAE\* NO LITORAL BRASILEIRO

\*espécies descritas no presente estudo

**(1a)** Células epiteliais arredondadas a achatadas mas não em forma de taça..... *Mesophyllum* (2)

**(1b)** Células epiteliais em forma de taça..... *Lithothamnion* (3)

**(2a)** Filamento que delimita o canal do poro formado por 3-4 células de comprimento, sendo a basal marcadamente mais alongada do que as demais células do teto do conceptáculo tetrasporangial..... *M. erubescens*

**(2b)** Filamentos que delimitam o canal do poro com mais de 4 células..... (4)

**(3a)** Filamento que delimita o canal do poro constituído por 6 células com mesmo tamanho e forma das demais células do teto do conceptáculo tetrasporangial..... *M. engelhartii*

**(3b)** Filamento que delimita o canal do poro constituído por células que são mais estreitas do que as demais células do teto do conceptáculo tetrasporangial, sendo a basal mais alongada..... *M. cf. incisum*

**(3c)** Filamento que delimita o canal do poro constituído por células que possuem a mesma forma e tamanho que as demais células do teto do conceptáculo tetrasporangial e na base o canal do poro apresenta um alargamento, tipo sino..... *Mesophyllum* sp. nov.

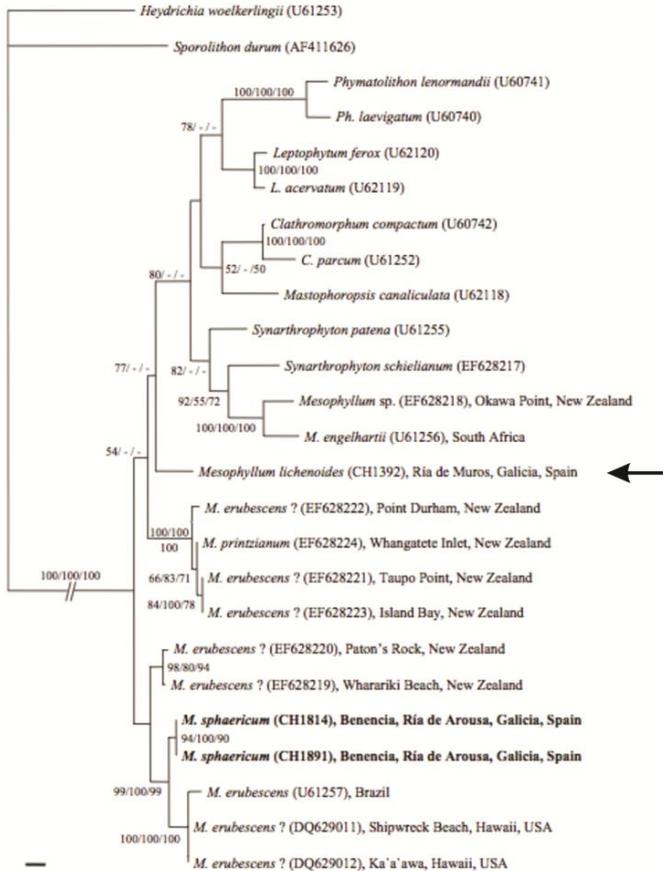
**(4a)** Conceptáculo tetrasporangial com poros em depressão; células do filamento do canal do poro do conceptáculo tetrasporangial não diferem em forma e tamanho das demais células dos filamentos adjacentes do teto do conceptáculo..... *Lithothamnion* sp. nov. 1

**(4b)** Conceptáculo tetrasporangial com poros elevados; células do filamento que delimita o canal do poro não diferem em forma e tamanho das demais células dos filamentos adjacentes do teto do conceptáculo..... *Lithothamnion* sp. nov. 2

**(4c)** Conceptáculo tetrasporangial afundado; filamento que delimita o canal do poro composto por 3 células, sendo a basal alongada..... *L. heteromorphum*

## 4 DISCUSSÃO

Os espécimes analisados no presente estudo apresentam tetrasporângios que se desenvolvem dentro de conceptáculos multiporados com plugues apicais impedindo a saída até que estes estejam maduros e células dos filamentos adjacentes ligados por fusões celulares, conferindo com o conceito de Hapalidiaceae (Harvey *et al.*, 2003b). De acordo com as características morfoanatômicas e seqüências de marcadores moleculares (UPA, *psbA* e *rbcL*) os taxa posicionaram-se nos gêneros *Mesophyllum* e *Lithothamnion*. Apesar de plantas masculinas não terem sido observadas, cujos conceptáculos guardam as principais características que diferenciam os gêneros *Mesophyllum* e *Phymatolithon*, o posicionamento no referido gênero foi corroborado por dados moleculares. Os marcadores *psbA* e *rbcL* não recuperaram a monofilia de *Mesophyllum*, como havia sido observado em análises filogenéticas a partir de regiões mais conservadas, SSU rDNA (Peña *et al.*, 2011) e análises multigênicas (SSU, LSU, *psbA* e COI, Bittner *et al.*, 2011), como mostra a Figura 2.14. Contudo, a não-monofilia do gênero pode ser reflexo de inconsistências taxonômicas, baseado em caracteres sem valor evolutivo. A reconstrução do estado ancestral de caracteres morfológicos, com base em rodolitos do Pacífico Tropical Oriental, indica que a utilização da forma das células epiteliais na diferenciação dos gêneros *Mesophyllum*, *Phymatolithon* e *Lithothamnion*, por exemplo, não são consistentes com dados moleculares (Robinson, 2013).



**Figura 2.14.** Árvore baseada na análise Bayesiana para as sequências do marcador SSU rDNA adaptada de Pena *et al.*, 2011. A seta indica *M. lichenoides*, espécie que tipifica o gênero. Valores referentes à probabilidade *a posteriori* à esquerda nos ramos. Valores de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (2000 réplicas), no meio e Máxima Parcimônia (1000 réplicas), à direita. Escala=0,005 substituições por posição.

Características relacionadas ao conceptáculo tetrasporangial, como teto diferenciado em aro periférico e porção central em depressão, posição dos poros em relação à superfície do teto e número, forma e tamanho das células do filamento que delimitam o canal do poro foram

utilizadas para diferenciar os sete táxons identificados no presente estudo.

*Mesophyllum* cf. *incisum* foi encontrado em ilhas costeiras de SC e representa o primeiro registro da espécie para o Atlântico Sul Ocidental. O lectótipo (TRH, 6354) é descrito para Bay of Islands, Nova Zelândia e caracteriza-se por apresentar células que delimitam o canal do poro mais estreitas do que as células dos filamentos adjacentes do teto, sendo a basal mais alongada (Woelkerling & Harvey, 1993). Em trabalho anterior, Woelkerling & Harvey (1992) utilizam o epíteto para identificar material proveniente de coletas recentes na Austrália. Contudo, as células que delimitam o canal do poro não apresentam semelhança com aquelas de 1993 e, a partir de comparação morfoanatômica entre os tipos de *M. erubescens* e *M. incisum*, o material australiano é sinonimizado em *M. erubescens* (Harvey *et al.*, 2003a). O material proveniente do Brasil assemelha-se ao material da Austrália descrito por Woelkerling & Harvey (1992), e devem representar a mesma espécie ou, considerando o provável evento vicariante imposto pela distância entre essas duas localidades, espécies próximas (para mais discussões sobre esse aspecto, ver Capítulo 3).

*Mesophyllum* cf. *engelhartii* foi encontrado no presente estudo ocorrendo do estado do Rio de Janeiro até Santa Catarina como formas incrustantes. Difere-se de *Mesophyllum* cf. *incisum* por apresentar células do filamento que delimita o canal do poro com forma e tamanho semelhante às demais células do teto do conceptáculo. As análises das sequências de *psbA* do material brasileiro apresentaram 10,8% de divergência em relação à sequência disponível no *GenBank* referente ao material da Nova Zelândia. Considerando que a localidade tipo desta espécie é o sul da Austrália, muito provavelmente, trata-se de mais um exemplo de espécie críptica no grupo.

Uma nova espécie de *Mesophyllum* foi encontrada ao longo do litoral brasileiro tropical, com limite de distribuição norte, no Maranhão e sul na Ilha da Trindade. Esta alga calcária não articulada foi observada formando rodolitos e diferencia-se das demais espécies de *Mesophyllum* por possuir células que delimitam o canal do poro com forma e tamanho semelhante às demais células dos filamentos adjacentes e um alargamento na base do poro que, quando vista em corte longitudinal, apresenta forma de sino. A Tabela 2.5 apresenta as principais características observadas nas espécies de *Mesophyllum* encontradas no presente estudo.



**Tabela 2.5.** Comparação de características morfológicas utilizadas na identificação de espécies de *Mesophyllum* encontradas no presente estudo (+ caráter presente, - caráter ausente, ND dado não disponível).

	<i>Mesophyllum erubescens</i> <sup>1</sup> Brasil	<i>Mesophyllum cf. engelhartii</i> <sup>1</sup> Brasil	<i>Mesophyllum engelhartii</i> <sup>2</sup> Austrália	<i>Mesophyllum cf. incisum</i> <sup>1</sup> Brasil	<i>Mesophyllum incisum</i> <sup>3</sup> Austrália	<i>Mesophyllum sp. nov.</i> <sup>1</sup> Brasil (Tropical)
Aspecto	fruticoso a verrucoso	incrustante a verrucoso	incrustante a verrucoso	incrustante a verrucoso	lamelado a verrucoso	fruticoso a granuloso
Diâmetro das células epiteliais (µm)	5-14	7-11	3-5	4-5	5-12	8-12
Altura das células epiteliais (µm)	2-4	3-5	4-9	7-8	5-10	3-9
Diâmetro das células subepiteliais (µm)	5-10	6-11	ND	6-7	ND	8-13
Altura das células subepiteliais (µm)	9-18	11-16	ND	10-14	ND	7-16
Tricocitos	+ -	ND	-	ND	+ -	ND
Fusão celular / Conexões secundárias	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
Diâmetro da câmara do conceptáculo tetrasporangial (µm)	173-349	202-356	160-500	311-449	340-655	22-456
Altura da câmara do conceptáculo tetrasporangial (µm)	126-238	104-245	65-260	227-306	130-265	140-345
Espessura do teto do conceptáculo tetrasporangial (µm)	30-45	41-55	ND	41-65	50-80	32-85
Tamanho e forma das células que delimitam o canal do poro em relação às demais células do teto	basal mais alongada	mesmo tamanho e forma	mesmo tamanho e forma	mais estreitas, basal alongada	mais estreitas, basal alongada	mesmo tamanho e forma, alargamento do poro na base não afundados
Poros	afundados	ND	ND	não afundados	ND	não afundados
Diâmetro do tetrasporângio(µm)	ND	ND	24-81	55-73	55-130	77
Altura do tetrasporângio(µm)	ND	ND	59-173	157-213	130-220	108

<sup>1</sup> Presente estudo

<sup>2</sup> Woelkerling & Harvey, 1996

<sup>3</sup> Woelkerling & Harvey, 1992



Entre as espécies de *Lithothamnion*, duas novas espécies para a ciência foram registradas e descritas para a Ilha da Escalvada, ES. A circunscrição de *Lithothamnion* sp. nov. 1 e *Lithothamnion* sp. nov. 2 foi feita pelas diferenças em características do conceptáculo tetrasporangial e corroborada pelas sequências de UPA e *psbA* (não foram geradas sequências de *rbcL* para esses espécimes), como mostram as Figuras 2.2 e 2.3. A Tabela 2.6 apresenta, resumidamente, as características morfológicas mensuradas.

*Lithothamnion heteromorphum* Foslie (Foslie) foi originalmente coletado e descrito por Foslie para a região de São Sebastião, SP como *Lithothamnion brasiliense* f. *heteromorpha*. Posteriormente, o mesmo autor elevou o táxon no nível de espécie (Woelkerling *et al.*, 2005; Farias, 2009). Farias *et al.*, 2010 reavaliaram e compararam morfológicamente o material tipo de *L. heteromorphum* (TRH, C16-3262) e com material recente proveniente da Ilha do Arvoredo, SC e, com base na regra de prioridade nomenclatural, sinonimizaram *L. heteromorphum* em *Lithothamnion superpositum* Foslie. Em seguida, Basso *et al.* (2011) analisaram o tipo da coleção original de Hauk e exemplares recentes do Mediterrâneo e não encontram características para distinguir *Lithothamnion crispatum* Hauk de *L. superpositum* e colocam *L. superpositum* como sinonímia heterotípica de *L. crispatum*. No presente estudo, os espécimes analisados mostram morfológicamente semelhança ao material descrito por Farias *et al.* (2010) e Basso *et al.* (2011). Geneticamente, as sequências de *psbA* para o material da Ilha do Arvoredo, SC apresentam 10,4% de divergência em relação ao material da Nova Zelândia morfológicamente posicionado em *L. crispatum*, indicando tratar-se de espécies distintas. Contudo, sequências de material proveniente do Mar Adriático, localidade tipo de *L. crispatum* ou então do próprio material tipo, seriam necessárias para corroborar o posicionamento neste epíteto. Por isso, consideramos resgatar o epíteto *L. heteromorphum* para o material brasileiro, cuja localidade tipo é 800 km distante do material analisado.

Morfologias simples podem ser resultantes tanto de convergência evolutiva, como reflexo de um processo de especiação recente, os quais produzem frequentemente espécies crípticas - morfológicamente idênticas, mas geneticamente distintas (Cianciola *et al.*, 2010). Os dados morfoanatômicos e moleculares do presente estudo mostram que a utilização de apenas características morfológicas não são suficientes para acessar a diversidade existente dentro de Hapalidiaceae. Os valores de divergência genética encontrados entre materiais posicionados apenas morfológicamente no mesmo epíteto de diferentes

localidades, como os casos supracitados de *Mesophyllum* cf. *engelhartii* e *L. heteromorphum*/*L. crispatum* evidenciam a existência de espécies distintas. Estudos filogenéticos com *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) vêm mostrando que devido à morfologia simples e convergente deste gênero de algas vermelhas, muitas espécies (algumas novas para a ciência) podem ser detectadas apenas através da técnica de DNA *Barcode* (Guimarães, 2011; Nauer, 2013). A ausência de estruturas reprodutivas, as quais guardam as características de importância taxonômica, a ampla plasticidade fenotípica e a convergência fenotípica em alguns casos, fazem com que trabalhos mais recentes no grupo identifiquem os taxa com base no conceito filogenético de espécie (Guimarães, 2011; Nauer, 2013).

**Tabela 2. 6.** Comparação de características morfológicas utilizadas na identificação de espécies de *Lithothamnion* encontradas no presente estudo.

	<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 1 <sup>1</sup> Brasil (ES, CE)	<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2 <sup>1</sup> Brasil (ES)	<i>Lithothamnion</i> <i>brasiliense</i> <sup>2</sup> Brasil	<i>Lithothamnion</i> <i>crispatum</i> <sup>3</sup> Brasil	<i>Lithothamnion</i> <i>steneckii</i> <sup>4</sup> Brasil (BA)
Aspecto	granuloso	fruticoso	incrustante a granuloso	fruticoso	incrustante a fruticoso
Diâmetro das células epiteliais (µm)	ND	7-10	5-8	6-12	6-8
Altura das células epiteliais	ND	3-5	3-4	2-5	4-5
Diâmetro da câmara do conceptáculo tetrasporangial (µm)	656-	405-1038	300-500	250-525	195-330
Altura da câmara do conceptáculo tetrasporangial (µm)	197-	187-273	100-180	150-230	195-330
Espessura do teto do conceptáculo tetrasporangial (µm)	53-71	46-68	ND	27-50	ND
Número de células nos filamentos do teto do conceptáculo tetrasporangial	6-7	5-7	4-6	4-5	4-6
Tamanho e forma das células que delimitam o canal do poro	iguais em tamanho e forma	iguais em tamanho e forma elevado com 6-8	ND	diferentes, basal alongada	diferentes em tamanho e forma em depressão com
Poros	afundado, com 8 células dispostas em roseta ao redor	células dispostas em roseta ao redor	6-8 células dispostas em roseta ao redor	em depressão	6-7 a células em forma de roseta ao redor

<sup>1</sup> Presente estudo

<sup>2</sup> Bahia *et al.*, 2010

<sup>3</sup> Farias *et al.*, 2010

<sup>4</sup> Mariath *et al.*, 2012



### *Técnica DNA Barcode em Hapalidiaceae*

O uso de um marcador do tipo DNA *Barcode* universal para todos os grupos de organismos vem se mostrando ilusório. O primeiro marcador a ser testado entre as Rhodophyta foi o *cox1* (Saunders, 2005), na tentativa de se obter *primers* universais para amplificar a região e ampla variação filogenética, como observado entre os animais. Entre as Corallinophycidae, os marcadores moleculares UPA, *cox1*, *psbA* e SSU rDNA vêm sendo utilizados (Vidal *et al.*, 2003; Broom *et al.*, 2008; Sherwood *et al.*, 2010; Bittner *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2011; Viera-Pinto, 2011; Bahia *et al.*, 2013).

O UPA, sugerido como possível candidato a DNA *Barcode* em organismos fotossintetizantes (Presting, 2006), é uma região curta, possui *primers* universais (com algumas poucas exceções) e tem sido facilmente amplificado. Sherwood *et al.* (2010) fazem uma avaliação da biodiversidade da flora marinha bentônica a partir da utilização de três marcadores: UPA, *cox1* e LSU e ressaltam a facilidade de se obter sequências para o UPA, apesar de ser mais conservada que o *cox1* e não apresentar resolução específica em alguns casos. Viera-Pinto (2011) verificou a variação interespecífica de 6,8% para esse marcador entre duas espécies de *Lithophyllum* que ocorrem no sul do Brasil. No presente estudo, o UPA mostrou boa resolução para segregar espécies, com variação interespecífica de 2,5% a 8,3%.

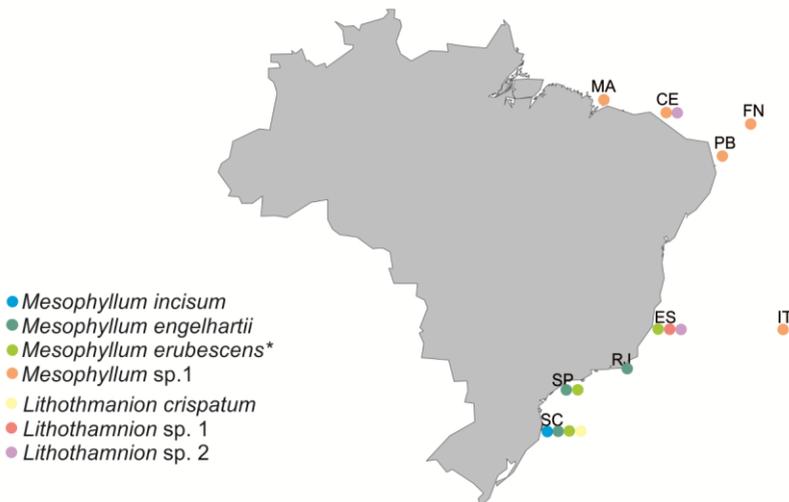
Trabalhos com outros grupos de algas vermelhas mostram a validade do *psbA* como marcador para questões filogenéticas, com resolução genérica e específica (Kim *et al.*, 2006; Broom *et al.*, 2008). Em uma tentativa de reconstruir a história evolutiva das Sporolithales e Corallinales, Bittner *et al.* (2011) utilizaram quatro marcadores (LSU, *psbA*, *cox1* e SSU) e avaliaram o potencial desses como DNA *Barcodes*. Apesar do LSU se mostrar mais informativo (seguido pelo *psbA*), o *psbA* revelou-se mais vantajoso do ponto de vista prático, uma vez que é fácil e barato de sequenciar e fornece tanto resolução em ramos basais, como recentes. Sob a perspectiva taxonômica, Bahia *et al.* (2013) propõem uma nova espécie de *Sporolithon* formadora de rodolito com base em diferenças morfoanatômicas e genéticas (variação interespecífica para o *psbA* entre 5,4% a 7,9%). Assim como trabalhos anteriores (Broom *et al.*, 2008; Bittner *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2011) já haviam demonstrado que esse marcador é eficiente na identificação de espécies crípticas em *M. erubescens* e, no presente estudo, foi observada

divergência interespecífica de até 11,1%. A variação intraespecífica variou entre 0,3% e 0,6%, suficiente para separar populações, despontando como potencial marcador molecular para estudos com enfoque biogeográfico.

O *rbcL* é outro marcador que vem sendo utilizado com sucesso para elucidar posicionamento a nível de espécie e em reconstruções filogenéticas de muitos grupos de Rhodophyta (Freshwater & Rueness, 1994; Kim *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008) e tem sido amplificado e sequenciado com sucesso para materiais de coleções (P. Gabrielson, comunicação pessoal). No presente estudo foi o marcador que apresentou maior variação interespecífica, podendo chegar a 14,7% de divergência.

### *Distribuição de Hapalidiaceae no litoral brasileiro*

A Figura 2.15 mostra o mapa de distribuição das espécies analisadas no presente estudo. O padrão de distribuição confere com as províncias biogeográficas Tropical e Temperada Quente, propostas por Horta *et al.* (2001) e corroborada pelo modelo termogeográfico de Adey & Steneck (2001), os quais propõem um modelo baseado em área da costa e temperatura ao longo do tempo.



**Figura 2.15.** Mapa de distribuição das espécies de Hapalidiaceae encontradas no presente estudo ao longo do litoral brasileiro. \*para completa distribuição de *M. erubescens*, ver Figura 3.7 do Capítulo 3.

## 5 CONCLUSÃO

- A família Hapalidiaceae carece de uma urgente reavaliação, baseada em características morfoanatômicas e moleculares, principalmente no que tange a delimitação dos gêneros.
- O uso de epítetos para espécimes morfológicamente semelhantes provenientes de outras localidades, deve ser utilizado com cautela. Barreiras impostas à dispersão pela distância e limites impostos pelo ambiente à ecofisiologia, ou ainda, morfologias semelhantes como resultante de convergência evolutiva podem ter levado ao surgimento de espécies crípticas entre as Hapalidiaceae. Por isso, sugere-se fortemente o uso de dados morfológicos associados à dados moleculares na identificação de espécimes, bem como a análise do material tipo.
- Os três marcadores moleculares (UPA, *psbA* e *rbcL*) apresentaram resolução na segregação de espécies, sendo que o *psbA* evidenciou também diferenças populacionais.



## REFERÊNCIAS

Adey, W.H. & Steneck, R.S. (2001) Thermogeography over time creates biogeographic regions: a temperature/space/time-integrated model and an abundance-weighted test for benthic marine algae. *Journal of Phycology* 37: 677-698.

Amado-Filho, G.M.; Moura, R.L.; Bastos, A.C.; Salgado, L.T.; Sumida, P.Y.; Guth, A.Z.; Francini-Filho, R.B.; Pereira-Filho, G.H.; Abrantes, D.P.; Brasileiro, P.S.; Bahia, R.G.; Leal, R.N.; Kaufman, L.; Kleypas, J.A.; Farina, M. & Thompson, F.L. (2012a) Rhodolith Beds Are Major CaCO<sub>3</sub> Bio-Factories in the Tropical South West Atlantic. *PlosOne* 7: e35171.

Amado-Filho, G.M.; Pereira-Filho, G.H.; Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Veras, P.C. & Matheus, Z. (2012b) Occurrence and distribution of rhodolith beds on the Fernando de Noronha Archipelago of Brazil. *Aquatic Botany* 101: 41-45.

Amaral, F.M.D.; Hudson, M.M. & Coura, M.F. (1998) Levantamento preliminar dos corais e hidrocorais do Parque Estadual Marinho do Parcel Manuel Luiz (MA). *Anais do XIII Simpósio de Biologia Marinha*, Universidade de São Paulo, São Sebastião, SP.

Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Brasileiro, P.S.; Pereira Filho, G. H. & Amado Filho, G.M. (2010) Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal on Oceanography* 58: 323-337.

Bahia, R.G.; Amado-Filho, G.M.; Maneveldt, G.W.; Adey, W.H.; Johnson, G.; Marins, B.V. & Longo, L.L. (2013) *Sporolithon tenue* sp. nov. (Sporolithales, Corallinophycidae, Rhodophyta): A new rhodolith-forming species from the tropical southwestern Atlantic. *Phycological Research*, In Press.

Bailey, J. C. & Chapman, R. L. (1996) Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 18S rRNA gene sequence analysis. In: Chaudhary, B. R.; Agrawal, S. B.

(Eds.) *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Amsterdam: Academic Publishing, pp.363–76.

Bailey, J.C. & Freshwater, D.W. (1997) Molecular systematic of the Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid *rbcL* and nuclear SSU gene sequences. *European Journal of Phycology* 32: 343-352.

Basso, D.; Rodondi, G. & Bressan, G. (2011) A re-description of *Lithothamnion crispatum* and the status of *Lithothamnion superpositum* (Rhodophyta, Corallinales). *Phycologia* 50: 144-155.

Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K. & Das, I. (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 148-155.

Bittner, L.; Payri C.E.; Maneveldt, G.W.; Couloux, A.; Cruaud, C.; Reviere, B. & Le Gall, L. (2011) Evolutionary history of the Corallinales (Corallinophycidae, Rhodophyta) inferred from nuclear, plastidial and mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 697-713.

Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. (2008) Utility of *psbA* and nSSU for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958-973.

Burgos, D.B. (2011) *Composição e estrutura das comunidades de macroalgas do infralitoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco – Brasil, com ênfase nas calcárias incrustantes*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Butt, N.; Beyer, H.L.; Bennett, J.R.; Briggs, D.; Maggini, R.; Mills, M.; Renwick, A.R.; Seabrook, L.M. & Possingham, H.P. (2013) *Science* 342: 425-426.

Cianciola, E.; Popolizio, T.; Schneider, C.W. & Lane, C. (2010) Using Molecular-Assisted Alpha Taxonomy to Better Understand Red Algal Biodiversity in Bermuda. *Diversity* 2: 946-958.

Cincotta, R.P.; Wisniewski, J. & Engelman, R. (2000) Human population in the biodiversity hotspots. *Nature* 404: 990-992.

Crutzen, P.J. (2006) Albedo enhancement by stratospheric sulfur injection: A contribution to resolve a policy dilemma. *Climatic Change* 77: 211-220.

Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. & Posada, D. (2011) "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9, 772.

Dias, G.T.M. (2001) Granulados bioclásticos – algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics* 18:307-318.

Farias, J. (2009) *Aspectos taxonômicos de Lithothamnion superpositum e Mesophyllum engelhartii (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Farias, J.N.; Riosmena-Rodriguez, R.; Bouzon, Z.; Oliveira, E.C. & Horta, P.A. (2010) *Lithothamnion superpositum* (Corallinales; Rhodophyta): First description for the Western Atlantic or rediscovery of a species? *Phycological Research* 58: 210-216.

Fearnside, P.M. (2005) Deforestation in Brazilian Amazonia: History, Rates, and Consequences. *Conservation Biology* 19: 680-688.

Floeter, S.R.; Rocha, L.A.; Robertson, D.R.; Joyeux, J.C.; Smith-Vaniz, W.F.; Wirtz, P.; Edwards, A.J.; Barreiros, J.P.; Ferreira, C.E.L.; Gasparini, J.L.; Brito, A.; Falcón, J.M.; Bowen, B.W. & Bernardi, G. (2008) Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 35: 22-47.

Foster, M.S. (2001) Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37: 659-667.

Freshwater, D.W. & Rueness. (1994) Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-194.

Gherardi, D.F.M. (2004) Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 52: 207-224.

Guimarães, N. (2011) *Diversidade do gênero Hypnea (Gigartinales, Rhodophyta) do Estado de São Paulo baseada em marcadores moleculares e morfologia*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso em 20 de outubro de 2013.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Halpern, B.S.; Walbridge, S.; Selkoe, K.A.; Kappel, C.V.; Micheli, F.; D'Agrosa, C.; Bruno, J.F.; Casey, K.S.; Ebert, C.; Fox, H.E.; Fujita, R.; Heinemann, D.; Lenihan, H.S.; Madin, E.M.P.; Perry, M.T.; Selig, E.R.; Spalding, M.; Steneck, R. & Watson, R. (2008) A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* 319: 948-952.

Harvey, A.S.; Broadwater, S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski, P.J. (2003a) *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapalidiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988-998.

Harvey, A.S.; Woelkerling, W.J. & Millar, A.J.K. (2003b) An account of the Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 16: 647-698.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard, R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321.

Horta, P.A. (2000) *Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Horta, P.A.; Amancio, C.E.; Coimbra, C. & Oliveira, E.C. (2001) Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.

Horta, P.A. (2002) Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.

Hughey, J.R. & Gabrielson, P.W. (2012) Comment on “Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment”. *Botany* 90: 1191-1194.

IPCC Climate Change 2007: Summary for policymakers. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

Jackson, J.B.C.; Kirby, M.X.; Berger, W.H.; Bjorndal, K.A.; Botsford, L.W.; Bourque, B.J.; Bradbury, R.H.; Cooke, R.; Erlandson, J.; Estes, J.A.; Hughes, T.P.; Kidwell, S.; Lange, C.B.; Lenihan, H.S.; Pandolfi, J.M.; Peterson, C.H.; Steneck R.S.; Tegner, M.J. & Warner, R.R. (2001) Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science* 293.

Keats, D.W. & Chamberlain, Y.M. (1994) Two melobesoid coralline algae (Rhodophyta, Corallinales): *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Lemoine and *Mesophyllum funafutiense* (Foslie) Verheij from Sodwana Bay, South Africa. *South African Journal of Botany* 60: 175-190.

Kim, M.S., Yang, E.C. & Boo, S.M. (2006) Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbcL* and *psbA* sequences. *Phycologia* 45: 520–8.

Luiz, O.J. & Edwards, A.J. (2011) Extinction of a shark population in the Archipelago of Saint Paul’s Rocks (Equatorial Atlantic) inferred from the historical record. *Biological Conservation* 144: 2873-2881.

- Mariath, R.; Riosmena-Rodriguez, R. & Figueiredo, M. (2012) *Lithothamnion steneckii* sp. nov. and *Pneophyllum conicum*: new coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta) for coral reefs of Brazil. *Algae* 27: 249-258.
- Moura, C.W.N.; Kraus, J.E. & Cordeiro-Marinho, M. (1997) Metodologia para obtenção de cortes histológicos com historresina e coloração com azul de toluidina para algas coralíneas (Rhodophyta, Corallinales). *Hoehnea* 24: 17-27.
- Moura, R.L.; Rodrigues-Martins, M.C.; Francini-Filho, R.B. & Sazima, I. (1999) Unexpected richness of reef corals near the southern Amazon river mouth. *Coral Reefs* 18: 170.
- Myers, R.A. & Worm, B. (2003) Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* 423: 280-283.
- Nauer, F. (2013) *Filogenia molecular e diversidade do gênero Hypnea (Gigartinales, Rhodophyta) na costa brasileira*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Pascelli, C.; Riul, P.; Riosmena-Rodriguez, R.; Scherner, F.; Nunes, M. Hall-Spencer, J.M.; Oliveira, E.C. & Horta, P.A. (2013) Seasonal and depth-driven changes in rhodolith bed structure and associated macroalgae off Arvoredo island (southeastern Brazil). *Aquatic Botany*, *In Press*.
- Peña, V.; Adey, W.H.; Riosmena-Rodriguez, R.; Jung, M.Y.; Afonso-Carrillo, J.; Choi, H.G. & Bárbara, I. (2011) *Mesophyllum sphaericum* sp. nov. (Corallinales, Rhodophyta): a new maërl-forming species from the Northeast Atlantic. *Journal of Phycology* 47: 911-927.
- Pereira-Filho, G.H.; Amado-Filho, G.M.; Moura, R.L.; Bastos, A.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Salgado, L.T.; Francini-Filho, R.B.; Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Guth, A.Z. & Brasileiro, P.S. (2012) Extensive Rhodolith Beds Cover the Summits of Southwestern Atlantic Ocean Seamounts. *Journal of Coastal Research* 28: 261-269.
- Pinheiro, H. T.; Camilato, V.; Gasparini, J.L. & Joyeux, J.C. (2009) New records of fishes for Trindade-Martin Vaz oceanic insular complex, Brazil. *Zootaxa* 2298: 45-54.

Presting, G.G. (2006) Identification of conserved regions in the plastid genome – implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84: 1434-1443

Radulovici, A.E.; Archambault, P. & Dufresne, F. (2010) DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity* 2: 450-472.

Riul, P.; Lacouth, P.; Pagliosa, P.R.; Christoffersen, M.L. & Horta, P.A. (2009) Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90: 315-320.

Riul, P.; Targino, C.H.; Farias, J.N.; Visscher, P.T. & Horta, P.A. (2008) Decrease in *Lithothamnion* sp. (Rhodophyta) primary production due to the deposition of a thin sediment layer. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 17-19.

Robinson, N.M.R. (2013) *Sistemática de las especies de algas coralinas (Corallinophycidae, Rhodophyta) formadoras de mantos de rodolitos en El Pacífico Tropical Oriental*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Baja California Sur, Mexico.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. (2003) MrBayes 3.2: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Ruddiman, W.F. (2003) The anthropogenic greenhouse era began thousands of years ago. *Climatic Change* 61: 261-293.

Saunders, G.W. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 360: 1879-1888.

Saunders, G.W. & McDevit, D.C. (2012) Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment *Botany* 90: 191-203.

Sherwood, A.R. & Presting, G.G. (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43: 605-608.

Sherwood, A.; Kurihara, A.; Conklin, K.Y.; Sauvage, T. & Presting, G.G. (2010) The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings. *BMC Plant Biology* 10: 258.

Simon, T.E.; Hora, M.S.C. & Joyeux, J.C. (2007) Exploração de “rochas vivas” (algas calcárias - Corallinales, Rhodophyta) para fins de aquarofilia no litoral do Espírito Santo, Região Sudeste do Brasil. *XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar, Florianópolis*.

Sissini, M. (2011) *Aspectos taxonômicos e moleculares de Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) para ilhas costeiras do sul e sudeste do Brasil*. Monografia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

SNUC - Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Lei nº 9.985 de 18/07/2000.

Soares, M.O.; Paiva, C.C.; Freitas, J.E.P. & Lotufo, T.M.C. (2011) Gestão de unidades de conservação marinhas: o caso do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio, NE-Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada* 11: 257-268.

Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M. et al. (eds). (2007) *Climate change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press.

Steffen, W.; Crutzen, P.J. & McNeill, J.R. (2007) The Anthropocene: Are Humans Now Overwhelming the Great Forces of Nature? *Ambio* 36: 614-621.

Stoeckle, M. (2003) Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* 53: 796-797.

- Sumida, P.Y.G. & Pires-Vanin, A.M.S. (1997) Benthic associations of the shelfbreak and upper slope off Ubatuba - SP, south-eastern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44: 779-784.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vidal, R.; Meneses, I. & Smith, M. (2003) Molecular genetic identification of crustose representatives of the order Corallinales (Rhodophyta) in Chile. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 404-419.
- Viera-Pinto, T. (2011) *Aspectos morfoanatômicos, reprodutivos e moleculares do gênero Lithophyllum (Lithophylloideae, Corallinales, Rhodophyta) do sul do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Yang, E.C. & Boo, S.M. (2004) Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on plastid protein-coding psaA, psbA, and rbcL gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 680-688.
- West, J.A. & Zuccarello, G.C. (2009) Taxonomic deflation: molecular evidence places *Membranella nitens* in taxonomix synonymy with *Smithora naiadum* (Erythropeltidales, Compsopogonophyceae, Rhodophyta). *Phycologia* 48: 543-546.
- Wilks K.M. & Woelkerling, W.J. (1995) An account of Southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 8: 549-583.

Woelkerling, W.J. (1988) The Coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate corallinaceae. *British Museum (Natural History) and Oxford University Press*: London e Oxford.

Woelkerling, W.J. (1993) Growth-forms in Non-geniculate Coralline Red Algae (Corallinales, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 277-293.

Woelkerling, W.J.; Gustavsen, G.; Myklebost, H.E.; Prestø, T. & Sâsted, S.M. (2005) The coralline red algal herbarium of Mikael Foslie: revised catalogue with analyses. *Gunneria* 77: 1-625.

Woelkerling, W. J. & Harvey, A. (1992) *Mesophyllum incisum* (Corallinaceae, Rhodophyta) in Southern Australia: Implications for generic and specific delimitation in the melobesioideae. *British Phycological Journal* 27: 381-399.

Woelkerling, W.J. & Harvey, A. (1993) An Account of Southern Australian Species of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 571-637.

Woelkerling, W.J. & Harvey, A. (1996) Subfamily Melobesioideae. In Womersley H.B.S. (Ed.) *The marine benthic flora of southern Australia-Part IIIB*. Adelaide: Graphic Print Group, pp. 164-210.

Wilson, S.; Blabe, C.; Berges, J.A. & Maggs, C.A. (2004) Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation. *Biological Conservation* 120: 279-289.

Wynne, M.J. (2011) A Checklist of Benthic Marine Algae of the Tropical and Subtropical Western Atlantic: Third Revision. *Nova Hedwigia*, Beiheft.

Yang, E.C.; Kim, M.S.; Geraldino, P.J.L.; Sahoo, D.; Shin, J.A. & Boo, S.M. (2008) Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161-168.

Yoon, H.S; Hackett, J.D. & Bhattacharya, D. (2002) A single origin of the peridinin and fucoxanthin containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *PNAS* 99: 11724-11729.

94 **Apêndice A.** Espécimes de Hapalidiaceae coletados ao longo do litoral brasileiro para os quais foram obtidas seqüências de UPA, *psbA* e *rbcL*.

Código amostra	Marcadores moleculares			Espécie	Estado	Local	GPS	Data Coleta	Coletor (es)
	UPA	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>						
ES06	✓			<i>M. erubescens</i>	ES	I. Rasas	-	29.03.2012	M. Sissini
ES04	-	✓		<i>M. erubescens</i>	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta & M. Sissini
IQG	✓			<i>M. erubescens</i>	SP	I. Queimada Grande	24°28'S e 46°40'O	19.04.2011	M. Sissini, B. Torrano
LUC02	✓			<i>M. erubescens</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
PB01	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	PB	Cabedelo	7°03'S e 34°47'O	09.04.2012	L. Lucena
CE09	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	CE	Risca do Meio	03°34'S e 38°24'O	18.04.2012	M. Sissini
PML01	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	MA	P. Manuel Luís	00°52' S e 44°16' O	08.04.2012	P. Horta
PML02	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	MA	P. Manuel Luís	00°52' S e 44°16' O	08.04.2012	P. Horta
IT85	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	31.07.2012	M. Sissini
IT74	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	02.08.2012	M. Sissini
IT54	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	26.07.2012	M. Sissini
IT39	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	01.08.2012	M. Sissini
IT35	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	02.08.2012	M. Sissini
IT34	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	10.07.2012	M. Sissini
IT29	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	26.06.2012	M. Sissini
IT25	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	10.07.2012	M. Sissini
IT13	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	18.07.2012	M. Sissini
FN03	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	PE	F. de Noronha	03°50'S e 32°25'O	22.11.2011	F. Scherner & D. Burgos
IT10	✓			<i>Mesophyllum</i> sp. nov.	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	26.06.2012	M. Sissini
BT01	✓			não identificado	PN	Bocas del Toro	-	08.05.2012	M. Sissini
IT32	✓			não identificado	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	10.07.2012	M. Sissini
BT10	✓			não identificado	PN	Bocas del Toro	-	09.05.2012	M. Sissini
BT16	✓			não identificado	PN	Bocas del Toro	-	09.05.2012	M. Sissini
IT72	✓			não identificado	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	02.08.2012	M. Sissini
IT84	✓			não identificado	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	31.07.2012	M. Sissini
AJ01	✓			não identificado	BA	Arraial d'Ajuda	-	18.09.2012	C. Azevedo, F. Nauer
CE11	✓			não identificado	CE	Risca do Meio	03°34'S e 38°24'O	18.04.2012	M. Sissini
IA09	✓	✓		<i>L. heteromorphum</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	25.02.2012	M. Sissini, B. Torrano
LUC04	✓			<i>L. heteromorphum</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
LUC08	✓			<i>L. heteromorphum</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
RN06	✓			<i>M. cf. engelhartii</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	25.02.2012	M. Sissini, B. Torrano

## Apêndice A. Continuação

Código amostra	Marcadores moleculares			Espécie	Estado	Local	GPS	Data Coleta	Coletor (es)
	UPA	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>						
CB01	✓			<i>M. cf. engelhartii</i>	RJ	I. dos Papagaios	-	27.01.2013	M. Sissini, C. Martins
CB04	✓			<i>M. cf. engelhartii</i>	RJ	I. dos Papagaios	-	27.01.2013	M. Sissini, C. Martins
IA04	✓	✓		<i>M. cf. engelhartii</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	25.02.2012	M. Sissini, B. Torrano
MS42	✓			<i>M. cf. engelhartii</i>	SC	I. do Xavier	27°36'S e 48°23'O	18.01.2010	M. Sissini, D. Cabral
RN04	✓	✓		<i>M. cf. engelhartii</i>	SC	I. do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	25.02.2012	M. Sissini, B. Torrano
CAB20	✓	✓		<i>M. cf. engelhartii</i>	SP	I. das Cabras	23°48'S e 45°21'O	30.08.2011	B. Torrano, A. Medeiros, C. Iha
PAL29	✓	✓		<i>M. cf. engelhartii</i>	SP	I. das Palmas	23°32'S e 45°01'O	29.08.2011	B. Torrano, A. Medeiros, C. Iha
IBC1068	✓			<i>M. cf. engelhartii</i>	RJ	I. Âncora	-	26.09.2011	B. Torrano, C. Iha, F. Nauer
ES13	✓			<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 1	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta, M. Sissini
ES18	✓			<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 1	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta, M. Sissini
ES02	✓			não identificado	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta, M. Sissini
CE06	✓	✓		<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2	CE	Risca do Meio	03°34'S e 38°24'O	18.04.2012	M. Sissini
CE10	✓			<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2	CE	Risca do Meio	03°34'S e 38°24'O	18.04.2012	M. Sissini
ES15	✓			<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta, M. Sissini
ES20	✓	✓		<i>Lithothamnion</i> sp. nov. 2	ES	I. Escalvada	20°40'S e 44°24'O	28.03.2012	P. Horta, M. Sissini
IT66	✓			não identificado	ES	I. da Trindade	20°30'S e 29°19'O	25.06.2012	M. Sissini



**Apêndice B.** Sequências de UPA disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises de agrupamento.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ420979	Havaí
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ420974	Havaí
<i>Pneophyllum conicum</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421556	Havaí
<i>Phymatolithon</i> sp.	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421548	Havaí
<i>Hydrolithon reinboldii</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421557	Havaí
<i>Lithophyllum insipidum</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421555	Havaí
<i>Sporolithon ptychoides</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421547	Havaí
<i>Gracilaria dotyi</i>	Sherwood & Presting 2007	EF426613	Havaí

**Apêndice C.** Sequências de *psbA* disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Lithothamnion</i> sp.	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917450	Fiji
<i>Lithothamnion</i> sp.	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917461	Nova Caledônia
<i>Lithothamnion crispatum</i>	Farr <i>et al.</i> 2008	FJ361502	Nova Zelândia
<i>Lithothamnion glaciale</i>	Hind & Saunders 2012	JQ422235	?
<i>Mesophyllum</i> cf. <i>erubescens</i>	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917444	Vanuatu
<i>Mesophyllum</i> sp.	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917445	Vanuatu
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167985	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ168004	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167993	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167918	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	Manevelt <i>et al.</i> 2012	JQ917418	?
<i>Mesophyllum engelhartii</i>	Farr <i>et al.</i> 2008	FJ361517	Nova Zelândia
<i>Phymatolithon</i> sp.	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917436	França
<i>Phymatolithon repandum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167953	Nova Zelândia
<i>Phymatolithon repandum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167950	Nova Zelândia
<i>Synarthrophyton patena</i>	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917499	Austrália
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167970	Nova Zelândia
<i>Lithophyllum pustulatum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361749	Nova Zelândia
<i>Sporolithon durum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ168023	Nova Zelândia
<i>Rhodogorgon</i> sp.	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917504	Nova Caledônia

**Apêndice D.** Sequências de *rbcL* disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Autor	Acesso GenBank	Local
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	Gabrielson 2010	HQ322337	?
<i>Lithophyllum impressum</i>	Miklasz <i>et al.</i> 2012	JX393129	?
<i>Rhodogorgon carriebowensis</i>	Freshwater <i>et al.</i> 1993	U04183	Jamaica

## Capítulo 2 – *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine - quantas espécies em um epíteto?

### 1 INTRODUÇÃO

*Mesophyllum* foi descrito por Lemoine (1928) e hoje representa 50 espécies válidas (Guiry & Guiry, 2013). Sua circunscrição foi fundamentada na disposição coaxial (concêntrica e alinhada) das células do hipotalo (medula), ou seja, na presença de um hipotalo coaxial. Essa característica foi aceita por 60 anos, quando Woelkerling (1988) examinou sua validade em relação aos gêneros *Clathromorphum* Foslie e *Synarthrophyton* Townsend. O referido autor destaca que os três gêneros apresentam espécies com ausência de crescimento coaxial e, tanto espécies de *Mesophyllum* como de *Synarthrophyton* combinam áreas coaxiais e não coaxiais, não sendo esta, portanto, uma característica diagnóstica válida. Woelkerling & Harvey (1992) propõem a utilização de características relacionadas à ontogenia e anatomia dos conceptáculos espermatangiais. Ao re-examinar o tipo e materiais de *Mesophyllum* provenientes do Oceano Pacífico Norte Oriental, Athanasiadis *et al.* (2004) distinguem-nos das demais Melobesioideae pela predominância do hipotalo coaxial, filamentos espermatangiais simples e câmara do conceptáculo tetrasporangial em forma de halteres.

Das oito espécies de *Mesophyllum* registradas para a costa oeste do oceano Atlântico (Wynne, 2011), quatro foram descritas de forma detalhada (Athanasiadis, 1999; Nunes *et al.* 2008; Farias, 2009; Riosmena-Rodriguez & Vásquez-Elizondo, 2012), sendo *M. erubescens* (Foslie) Me. Lemoine a mais frequentemente estudada no Atlântico sul tanto do ponto de vista taxonômico (Figueiredo & Steneck, 2000; Nunes *et al.*, 2008; Bahia *et al.*, 2010; Horta *et al.*, 2011) quanto ecológico (Horta *et al.*, 2008; Scherner *et al.*, 2010, Pascelli *et al.*, 2013).

*Mesophyllum erubescens* foi descrita originalmente para o Arquipélago de Fernando de Noronha (Foslie, 1900; Burgos, 2011), localizado a 600 km da costa nordeste do Brasil, estando também presente em áreas subtropicais e tropicais da costa brasileira e caribenha (Horta *et al.*, 2011). Do ponto de vista molecular, material com essa denominação teve seu DNA plastidial e nuclear caracterizado para o Pacífico Ocidental (Broom *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2011; Bittner *et al.*, 2011) e uma única sequência de SSU rDNA para o Brasil (Bailey &

Chapman, 1996). Aguirre *et al.* (2010) determinam a partir de bases moleculares a idade do táxon, que deve ter tido sua origem ao redor de 60 milhões de anos atrás. Entretanto, todas estas observações não levaram em consideração a análise da localidade tipo e circunscrituras, visto que a sequência brasileira existente é proveniente de São Sebastião (SP) intrínseca à província temperada quente da costa oeste do Atlântico Sul (Horta *et al.*, 2001) e distante 2700 km de Fernando de Noronha.

*Mesophyllum erubescens* é descrita formando crostas epilíticas, epizóicas (em corais) ou mesmos rodolitos com protuberâncias (Woelkerling & Harvey, 1993) e vem sendo utilizado para identificar espécimes de áreas tropicais em diferentes oceanos (Ringeltaube & Harvey, 2000; Oliveira *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 1996; Keats & Chamberlain, 1994), ou mesmo em áreas com relativa descontinuidade na costa oeste do Atlântico. Neste caso, por exemplo, apesar da presença do Amazonas, uma importante barreira biogeográfica para peixes recifais (Muss *et al.*, 2001; Joyeux *et al.*, 2001; Floeter *et al.*, 2008), Horta *et al.* (2011) reforçaram a hipotética ampla distribuição, quando reavaliaram espécimes coletados por Taylor (1960) no Caribe e reafirmaram a extensa ocorrência do referido táxon (então identificados como *Lithothamnion erubescens* (Florida) e *Lithothamnion incertum* (Bermuda)).

Assim como o Caribe está, de certa forma, isolado do Atlântico sul há mais de 10 milhões de anos (Hoorn, 1994), por conta do deságue do enorme volume de água doce do Amazonas e Orinoco, correntes oceânicas e as grandes distâncias impõem relativo isolamento da população tipo de *M. erubescens* das demais descritas sob este epíteto para diferentes regiões do Atlântico sul e de outros mares do planeta. Considerando que a diversidade de espécies crípticas é muito maior que a então prevista no final do século passado (Saunders, 2005; Robba *et al.*, 2006; Lindstrom, 2008; Walker *et al.*, 2009), o táxon em questão pode representar um exemplo de ausência de variabilidade morfoanatômica dentre as Corallinales. Além das evidentes implicações taxonômicas a reavaliação do referido táxon, considerando suas características moleculares, pode trazer novos subsídios para o entendimento da origem e distribuição da flora marinha no Atlântico sul.

O Código Internacional de Nomenclatura Botânica (McNeil *et al.*, 2012) estabelece que a utilização de um nome científico deve se basear no espécime tipo. Portanto, a presente reavaliação, fundamentada na caracterização morfoanatômica (Harvey *et al.*, 2005) e molecular de populações atuais e do espécime tipo da espécie em questão (Saunders & McDevit, 2012), parte do pressuposto que isolamento geográfico

pode gerar especiação entre as populações denominadas como representantes de *M. erubescens*. Esta potencial deriva estaria, hipoteticamente, relacionada ao distanciamento geográfico ou à ausência de conexão entre populações, seja pela ausência de correntes oceânicas que proporcionem o transporte de propágulos, seja pela presença de barreiras ecofisiológicas.

Diferentes pressões seletivas atuando sobre populações isoladas podem levar à diferenciação morfoanatômica destas e, eventualmente, ao isolamento reprodutivo. No caso em questão, parte-se do pressuposto de que além da presença de características morfoanatômicas diagnósticas deste processo de diferenciação, serão observadas divergências moleculares nos marcadores DNA *Barcode* da ordem de 0,95% a 34%, tradicionalmente, relacionadas às variações interespecíficas em Rhodophyta [0,94-11,66% para o *psbA*; 2-34% para o *rbcL* (Kim *et al.*, 2006); >4,2% *cox1* (Saunders, 2005); 1,4-4,6% para o UPA (Milstein *et al.*, 2012)]. Deve-se destacar que o sequenciamento do holótipo no caso destes organismos morfologicamente muito simples e/ou com um processo de especiação recente, vai nos permitir inferir de maneira mais precisa a diversidade genética e relações filogenéticas relacionadas ao respectivo processo evolutivo (Cianciola *et al.*, 2010).

Diante do exposto acima, o presente estudo teve como objetivo analisar e comparar morfologicamente espécimes de *M. erubescens* coletados ao longo do litoral brasileiro, incluindo a localidade tipo. Adicionalmente, é fornecida a sequência da terceira região do marcador molecular *rbcL* do material tipo (TRH, Voucher C15-3212) e sequências dos marcadores UPA, *psbA* e *rbcL* de espécimes coletados recentemente a fim de comparar taxas de diferentes oceanos e posicionados morfologicamente em *M. erubescens*, verificando a existência de eventuais variações intraespecíficas e/ou interespecíficas.

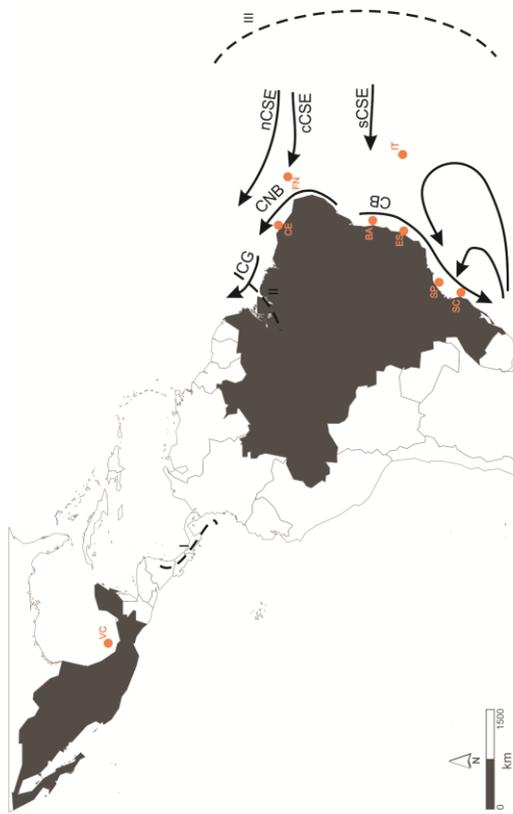
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes foram coletados através de mergulho autônomo em 12 localidades ao longo da costa brasileira e em duas ilhas oceânicas, o Arquipélago Fernando de Noronha e a Ilha da Trindade. Também foram incluídos três espécimes originados de duas localidades em Veracruz (Santiaguillo e Topatillo), Golfo do México (Figura 3.1).

Para que as relações macroecológicas e biogeográficas dos organismos que colonizaram essa região possam ser interpretadas, faz-se necessário o entendimento sobre os processos evolutivos da geologia e paleo-oceanografia do Oceano Atlântico. Existem sólidas evidências de que o Atlântico esteve, até cerca de 100 milhões de anos, dividido em uma porção caribenha ao norte e um mar ao sul que representa o que hoje é o Atlântico sul. Enquanto estes mares estiveram isolados, sua porção sul era influenciada por correntes de superfície vindas da costa leste do sul do continente Africano e a partir do extremo sul das Américas, estas trazendo influências do Pacífico. Após a abertura da passagem as correntes de superfície dominantes derivavam do sul para o norte, proporcionando uma conexão efetiva até o deságue do Amazonas e Orinoco, que passa a ser expressivo a cerca de 10 milhões de anos. Estas correntes costeiras, apesar de pouco conhecidas, passaram por configurações diversas influenciadas pelas grandes massas de água que, por exemplo, dividem a costa do Brasil em dois grandes domínios oceanográficos (Stramma & England, 1999).

Apesar das correntes facilitarem a dispersão no Atlântico, três barreiras biogeográficas impõem certa resistência a esse processo, o fechamento do Istmo do Panamá, há cerca de 3,1-3,5 Ma; o deságue dos rios Amazonas e Orinoco e a distância existente entre a costa do Brasil e da África, tornam essas duas últimas barreiras permeáveis a apenas alguns organismos (Luiz *et al.*, 2012) (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Estados brasileiros amostrados no presente estudo, incluindo os arquipélagos oceânicos de Fernando de Noronha e Trindade-Martin Vaz. Estão representadas as principais correntes que influenciam o litoral brasileiro. (CB) Corrente do Brasil, (CSE) Corrente Sul Equatorial e seus três braços, norte (nCSE), central (cCSE) e sul (sCSE), (CNB) Corrente Norte do Brasil, (CG) Corrente das Guianas. Os números romanos indicam barreiras biogeográficas (I) Istmo do Panamá, 3,1-3,5 Ma; (II) Deságüe Amazonas-Orinoco, 6-10 Ma; (III) Fratura Meso-Atlântica, 0-60 Ma. Adaptado de Floeter *et al.* (2008); Stramma & England (1999) e Lumpkin & Garzoli (2005).

## 2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Imediatamente após a coleta, os espécimes foram limpos para a remoção de epífitas e fauna associada, lavados em água doce e armazenados de forma adequada para os estudos morfológicos e moleculares. Para as análises moleculares, o material (ou parte dele) foi seco à sombra e armazenado em sílica em gel. Na Tabela 3.1, são apresentados os dados dos espécimes analisados, com o código de campo, localidade de amostragem e marcadores amplificados e sequenciados (as informações completas estão no Apêndice E). Para o estudo morfológico, o material foi fixado em formol 4% e depois de 24 horas transferido para a solução de etanol (70%) com glicerol (10%). Os

espécimes serão depositados no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina (<http://herbario.paginas.ufsc.br>).

O material coletado em Veracruz, por Paul Avila, foi processado e gentilmente cedido pelo Sr. Néstor Robinson, da Universidad Autónoma de Baja California Sur, para fins comparativos.

**Tabela 3.1.** Dados de coleta e marcadores amplificados e sequenciados para cada amostra.

Código amostra	Marcadores Moleculares			Espécie	Local
	UPA	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>		
CE19	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Risca do Meio
FN01	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Cagarras, F. Noronha
FN02	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Cagarras, F. Noronha
FN06	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Boca Inferno, F. Noronha
JAU06	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Praia do Jauá, Camaçari
ES01	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhas Rasas, Guarapari
ES04	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhas Rasas, Guarapari
ES06	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhas Rasas, Guarapari
ES14	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Escalvada, Guarapari
ES17	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhas Rasas, Guarapari
IT05	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha da Trindade
IT49	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha da Trindade
IT55	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha da Trindade
IT69	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha da Trindade
IB02	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhabela, S. Sebastião
IQG	✓	-	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Queimada Grande
IQG02	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Queimada Grande
IQG03	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Queimada Grande
IQG04	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Queimada Grande
SP01	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhabela, S. Sebastião
SP02	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhabela, S. Sebastião
SP04	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilhabela, S. Sebastião
IBC1025	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Palmas, S. Sebastião
LUC01	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha do Arvoredo
LUC02	✓	✓	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha do Arvoredo
LUC03	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha do Arvoredo
LUC05	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha do Arvoredo
LUC07	✓	-	-	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha do Arvoredo
ID07	✓	✓	✓	<i>Mesophyllum erubescens</i>	Ilha Deserta
NR0038	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	Santiaguillo, Veracruz
NR0041	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	Santiaguillo, Veracruz
NR0065	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	Topatillo, Veracruz

## 2.3 ESTUDO MOLECULAR

### 2.3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de material recente

Os procedimentos de extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento do material recente foram os mesmos descritos no *item 2.3 do Capítulo 2* desta dissertação.

### 2.3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de material de herbário

Este estudo foi realizado em parceria com o pesquisador Dr. P.W. Gabrielson, do Herbário da *University of North Carolina Chapel Hill*, localizado em Chapel Hill, Estados Unidos.

Os dados foram obtidos do material tipo de *M. erubescens* (Figura 3.2), depositado no TRH (*Department of Botany, Museum of Natural History and Archaeology, University of Trondheim*, Trondheim, Noruega). A extração do DNA foi realizada segundo protocolo específico para espécimes de plantas/algas de coleções (Gabrielson *et al.*, 2011).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA, foram utilizados *primers* correspondentes à terceira região do *rbcL* (F1150: 5'GGTATACATTGTGGACAAATGC3' e *RrbcS*: 5'GTTCTTGTGTTAATCTCAC3'). O mesmo par foi utilizado na reação de sequenciamento.



**Figura 3.2.** Material tipo de *Mesophyllum erubescens* para o qual foi amplificada a terceira região do *rbcL*. Foto: P.W. Gabrielson.

### 2.3.3 Alinhamento

As sequências foram alinhadas e editadas no *BioEdit version 5.0.6* (Hall, 1999), os cromatogramas foram conferidos à olho para a validação de nucleotídeos ambíguos e então gerada uma sequência-consenso. Alinhamentos múltiplos foram gerados para cada marcador (excluindo as regiões dos *primers* externos, pois estes representam sequências artificiais) usando o *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) disponível no *BioEdit*.

Para o UPA, foi construída uma matriz com 37 sequências e 346 nucleotídeos a partir das sequências geradas no presente estudo e oito disponíveis no banco de dados *GenBank* (Apêndice F), incluindo *Gracilaria dotyi* (EF426613) como grupo externo. A matriz de *psbA* contou com 71 sequências, das quais 55 são provenientes do *GenBank*, (Apêndice G) e 445 nucleotídeos, apesar das sequências geradas terem sido maiores, a matriz final foi aparada pois algumas sequências apresentavam a região inicial maior, outras a região terminal maior. *Gracilaria textorii* (DQ095842) foi utilizado como grupo externo.

Ainda, a matriz do *rbcL* foi construída com sequências parciais (293 nucleotídeos) a fim de compararmos com a sequência do material tipo. Foram adicionadas a esta matriz seis sequências do *GenBank* (Apêndice H) e outras seis geradas no *Capítulo 2* desta dissertação pois apenas uma sequência do banco de dados pertence à Hapalidiaceae.

### **2.3.4 Análises de agrupamento e filogenéticas**

Estas análises foram feitas conforme os procedimentos descritos no *item 2.3.5 do Capítulo 2* desta dissertação.

### **2.3.5 Depósito das sequências nos bancos de dados**

As sequências geradas dos marcadores moleculares serão depositadas no BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) a fim de torná-las disponíveis para futuras comparações. Além disso, para a publicação dos dados em revista científica, as sequências serão futuramente depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

### **2.3.6 Análise da variação “intraespecífica” dos marcadores moleculares**

A fim de avaliar as variações moleculares entre os materiais posicionados morfológicamente em *M. erubescens*, para cada marcador molecular foram montadas matrizes contrapondo sequências de cada agrupamento, dois a dois. Para o UPA e *rbcL* foi montada uma única matriz e para o *psbA* 23 matrizes.

## **2.4 ESTUDO MORFOLÓGICO**

As lâminas permanentes e os suportes de alumínio (*stubs*) utilizados para a observação em microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente, foram preparados de acordo com os procedimentos apresentados por Horta (2002) e Moura *et al.* (1997) e estão detalhadamente descritos no *item 2.4 do Capítulo 2* desta dissertação.

Na análise do material, foram consideradas tanto características vegetativas como reprodutivas. Os caracteres vegetativos observados e mensurados foram:

- Hábito, cor e textura dos talos;
- Tipo de fixação ao substrato;

- Forma, comprimento e diâmetro das células epiteliais, subepiteliais, do peritalo e do hipotalo;
  - Presença de conexões secundárias entre as células de filamentos adjacentes;
  - Presença de fusões celulares entre células de filamentos adjacentes;
  - Forma de crescimento do talo.

Apesar de nem sempre presentes, as estruturas reprodutivas também foram examinadas. Uma vez que guardam as principais características no posicionamento em nível de espécie. Foram observados e mensurados os caracteres:

- Forma, diâmetro e altura dos conceptáculos tetrasporangiais;
- Número de células do filamento do teto do conceptáculo tetrasporangial e espessura do teto;
- Número e forma das células que delimitam o canal do poro;
- Diâmetro e altura dos tetrasporângios;
- Forma, diâmetro e altura dos conceptáculos gametangiais.

A terminologia empregada para a forma de crescimento segue a proposta de Woelkerling & Harvey (1993) e para as características anatômicas, conforme Woelkerling (1988), Keats & Chamberlain (1994) e Athanasiadis (2004). Vale ressaltar que as informações morfoanatômicas referentes ao material tipo foram observadas a partir da análise realizada por Keats & Chamberlain (1994).

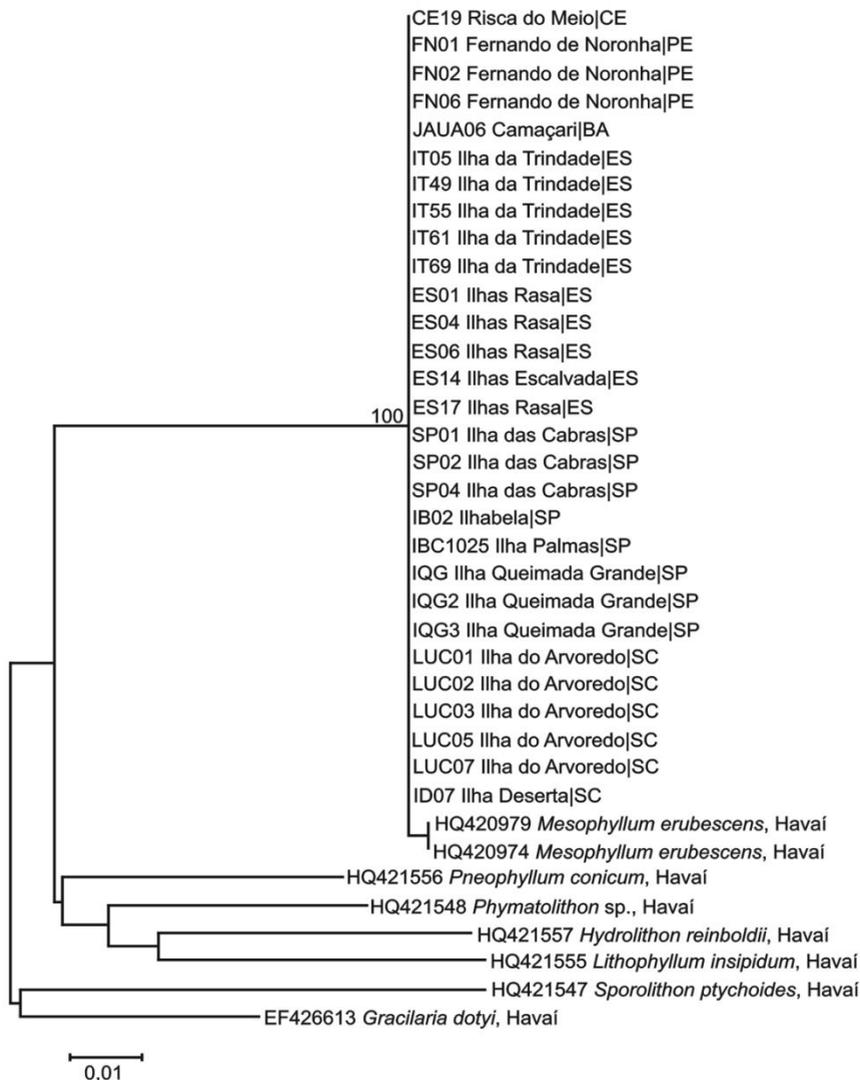
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ESTUDO MOLECULAR

Foram geradas no presente estudo 56 seqüências: 29 seqüências de UPA, 16 seqüências de *psbA* e 11 seqüências parciais de *rbcL*. O marcador UPA foi amplificado e sequenciado para todas as amostras a fim de proporcionar o panorama inicial da segregação do grupo (exceto para os espécimes de Veracruz). Após a análise do agrupamento de UPA, representantes de diferentes localidades foram sequenciados para os marcadores filogenéticos *psbA* e *rbcL*.

### 3.1.1 Análise do marcador UPA

Ao todo, foram analisadas 37 sequências de UPA e 346 posições. A análise, considerando a segregação das espécies segundo o UPA, revela um agrupamento principal fortemente sustentado (100% de *bootstrap*), composto pelos 29 espécimes brasileiros caracterizados no presente estudo (Figura 3.3). A este clado destaca-se um clado irmão com os espécimes descritos como *M. erubescens* para o Havai com baixo suporte (65% de *bootstrap*). A divergência entre as sequências de UPA do Brasil e do Havai é de 0,29%.



**Figura 3.3.** Filograma de distância de *Neighbor-Joining* (NJ) para as sequências do marcador UPA. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 70 foram plotados. As sequências disponíveis no *Genbank* e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso e localidade. Como grupo externo, foi utilizada a sequência de *Gracilaria dotyi*. A escala presente no canto inferior esquerdo representa o número de substituições.

### 3.1.2 Análise do marcador *psbA*

A matriz do marcador *psbA* possui 71 sequências, sendo 16 dessas geradas no presente estudo, e 445 posições analisadas.

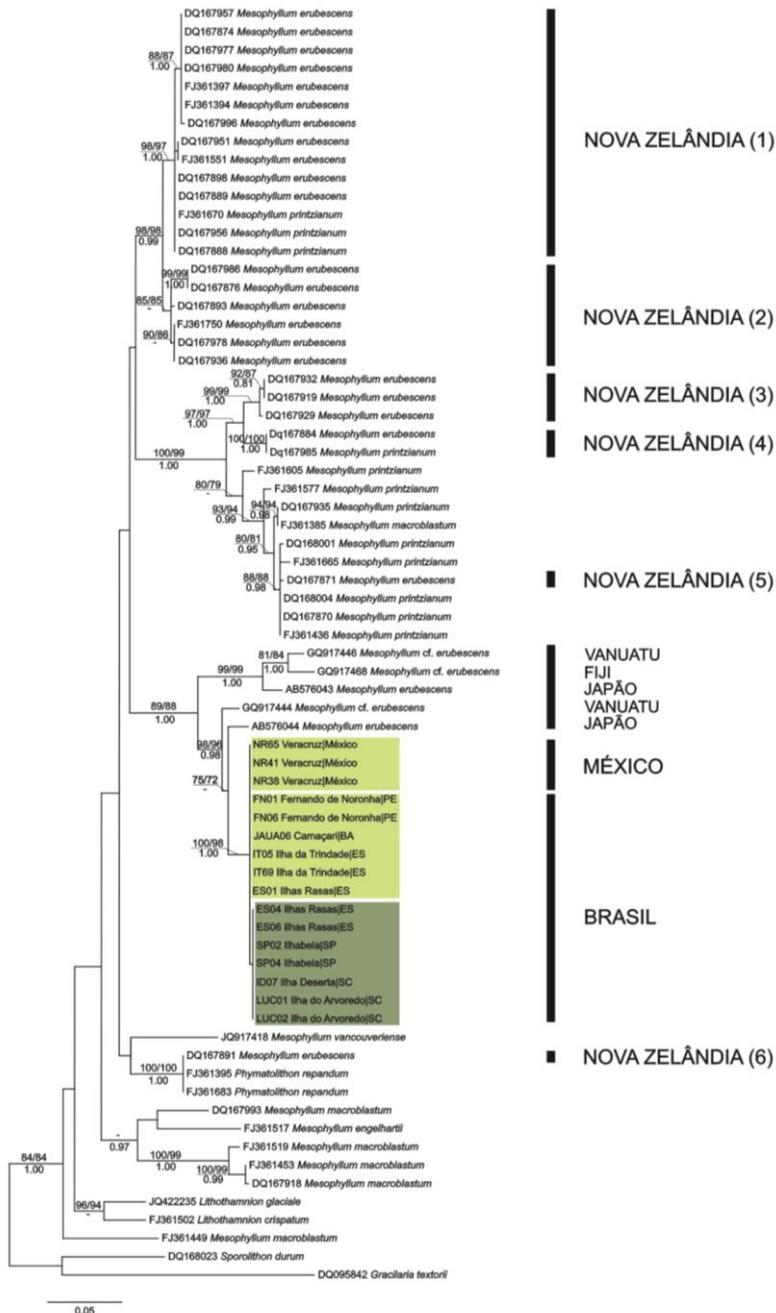
O filograma apresentado na Figura 3.4 mostra que Hapalidiaceae forma um grupo monofilético com suporte moderado (84% de *bootstrap* para NJ e MV) e 1,00 de probabilidade *a posteriori* na MB. Por outro lado, a monofilia do gênero *Mesophyllum* não foi recuperada, uma vez que espécimes morfológicamente posicionados em *Phymatolithon repandum* e *Mesophyllum erubescens* constituem um clado fortemente sustentado (100% de *bootstrap* para NJ e MV e 1,00 de probabilidade *a posteriori* para MB).

Os espécimes posicionados morfológicamente em *M. erubescens* aparecem em vários clados. Contudo, os representantes brasileiros constituem um clado monofilético, com 99% de *bootstrap* para NJ, 98% para MV e 1,00 de probabilidade *a posteriori* para MB. As sequências do México agruparam-se com as sequências brasileiras do Espírito Santo, Ilha da Trindade, Bahia e Fernando de Noronha (aqui considerada como província Tropical e Transição). A divergência entre as sequências da província Tropical e Temperada Quente (Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina) é de apenas um nucleotídeo (0,23%). As sequências do Japão e Vanuatu de *M. erubescens* foram as mais próximas dos exemplares brasileiros e mexicanos, com *bootstrap* de 98% e 96%, respectivamente e probabilidade *a posteriori* de 0,98.

Considerando a divergência entre províncias Tropical e Temperada Quente baixa (0,23%), pode-se inferir que o material brasileiro corresponda a uma única espécie de ampla distribuição. Contudo, as divergências entre as sequências do material brasileiro e as sequências do Japão e Vanuatu (2,5 a 3,2%), sugerem a existência de espécies distintas.

Sequências do material da Nova Zelândia de *M. erubescens* agruparam-se em pelo menos dois grandes clados, juntamente com sequências de *Mesophyllum macroblastum* e *Mesophyllum printzianum*. Ainda, uma sequência de *M. erubescens* (DQ167891) agrupou-se com 100% de identidade com *Phymatolithon repandum*.

*Lithothamnion* spp. formou um clado monofilético com alto suporte (96 de *bootstrap*), agrupando *L. crispatum* proveniente da Nova Zelândia e *L. glaciale* do Canadá.

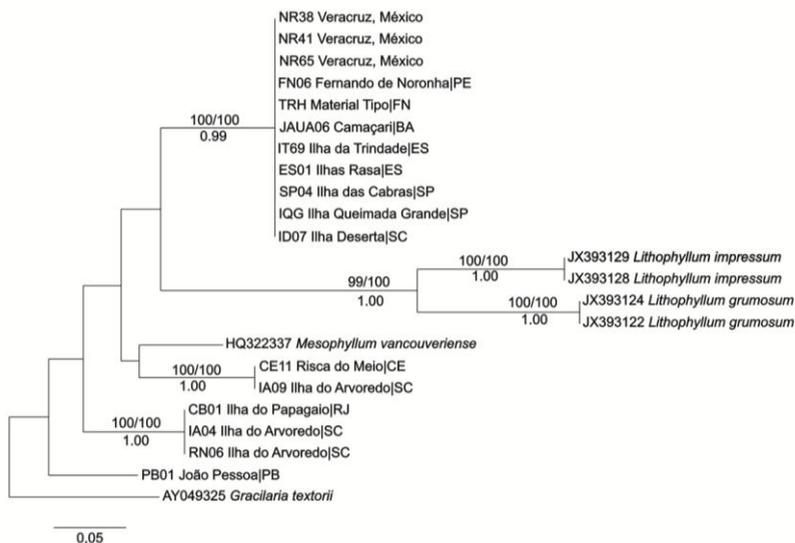


**Figura 3.4.** Filograma de Máxima Verossimilhança (MV) para as sequências do marcador *psbA*. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) estão representados nos ramos, apenas valores acima de 70 foram plotados. Os valores em cima dos ramos e à esquerda são referentes à análise de *Neighbor-Joining* (NJ) e à direita a MV. Os valores de probabilidade *a posteriori* da Análise Bayesiana (MB) estão abaixo do ramo. As sequências disponíveis no *GenBank* e utilizadas na análise estão seguidas do número de acesso e localidade. Como grupo externo, foi utilizada a sequência de *Gracilaria textorii*. A escala representa o número de substituições.

### 3.1.3 Análise do marcador *rbcL*

Para o *rbcL*, foram geradas sete novas sequências de espécimes do litoral brasileiro e três de espécimes mexicanos. Ainda, obteve-se a sequência parcial de *rbcL* para o material tipo de *M. erubescens*. Como o marcador molecular em questão é ainda pouco usado para o grupo de algas em estudo, uma única sequência de Hapalidiaceae foi encontrada disponível no *GenBank*. A terceira parte do *rbcL* é considerada a região mais variável deste marcador e vem mostrando bons resultados na amplificação e sequenciamento de espécimes de herbário (P. Gabrielson, comunicação pessoal), por isso, apesar de ser um marcador com aproximadamente 1460 pb, a matriz consenso foi construída com 313 nucleotídeos. Seis sequências analisadas no Capítulo 2, quatro de Corallinaceae (retiradas do *GenBank*) e uma de *Gracilaria textorii* (AYO49325) foram incluídas, esta última como grupo externo.

Todas as sequências brasileiras e mexicanas agruparam-se com a sequência do material tipo de *M. erubescens* em um clado com alto suporte (100% de *bootstrap* para NJ e MV e 0,99 de probabilidade *a posteriori* na MB (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Filograma de Máxima Verossilhança (MV) para as seqüências de *rbcL*. Os valores de *bootstrap* (2000 réplicas) referentes às análises de *Neighbor-Joining* (NJ) estão acima dos ramos à esquerda e os referentes à MV, estão expressos à direita. Os valores de probabilidade *a posteriori* da Análise Bayesiana (MB) estão abaixo do ramo. A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. A seqüência de *Gracilaria textorii* foi utilizada como grupo externo. A escala presente representa o número de substituições.

### 3.1.4 Variação “intraespecífica” dos marcadores moleculares

As seqüências para os marcadores UPA e *rbcL* mostraram-se idênticas e as seqüências de *psbA* entre o Brasil Tropical + México e Brasil Temperado Quente com divergência em apenas um nucleotídeo, como sumariza a Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Localidades para quais foram obtidas seqüências de *M. erubescens*. Os símbolos representam os marcadores moleculares e as cores o haplótipo. Note que o círculo verde-claro com o verde-escuro no ES indica a ocorrência dos dois haplótipos. CE: Ceará; FN: Fernando de Noronha; BA: Bahia; ES: Espírito Santo; IT: Ilha da Trindade; SP: São Paulo; SC: Santa Catarina.

A Tabela 3.2 apresenta a variação encontrada entre as seqüências de *psbA* dos clados que apresentaram espécimes morfologicamente posicionados em *M. erubescens*. As seqüências do Brasil divergiram das do Japão, Vanuatu e Fiji de 11 a 14 nucleotídeos (2,5 a 3,2%), ao passo que esse número foi muito maior quando comparado à Nova Zelândia 3 (12,9 a 13,1%) e Nova Zelândia 4 e 5 (11,7 a 12,0%). Dentro da própria Nova Zelândia, foi observada uma variação genética alta (1,6 a 12,0%), com 7 a 53 nucleotídeos de divergência.

**Tabela 3.2.** Variação encontrada para os marcador molecular *psbA*, representada pela porcentagem (%) e quantidade de pares de base (pb) para espécimes identificados morfologicamente como *M. erubescens*. Seqs é o numero de seqüências utilizadas na matriz.

	seqs	%	pb
Brasil P. Tropical vs. Brasil P. Temperada Quente	13	0,3%	1
Brasil P. Tropical vs. México	9	0,0%	0
Brasil P. Temperada Quente vs. México	10	0,3%	1
Brasil vs. Japão, Vanuatu e Fiji	15	2,5 – 3,2 %	11 - 14
Brasil vs. Nova Zelândia 1	24	8,6 – 8,8%	38-39
Brasil vs. Nova Zelândia 2	19	7,5-8,8%	33-39
Brasil vs. Nova Zelândia 3	16	12,9-13,1%	57-58
Brasil vs. Nova Zelândia 4	14	11,7-12,0%	52-53
Brasil vs. Nova Zelândia 5	14	11,7-12,0%	52-53
Nova Zelândia 1 vs. Nova Zelândia 2	17	1,6-3,2%	7-14
Nova Zelândia 1 vs. Nova Zelândia 3	14	8,1-8,6%	36-38
Nova Zelândia 1 vs. Nova Zelândia 4	12	8,4-9,0%	37-40
Nova Zelândia 1 vs. Nova Zelândia 5	14	11,7-12,0%	52-53
Nova Zelândia 2 vs. Nova Zelândia 3	9	8,4-9,5%	37-42
Nova Zelândia 2 vs. Nova Zelândia 4	7	8,6-9,5%	38-42
Nova Zelândia 2 vs. Nova Zelândia 5	7	8,4-9,0%	37-40
Nova Zelândia 3 vs. Nova Zelândia 4	4	2,7-3,0%	12-13
Nova Zelândia 3 vs. Nova Zelândia 5	4	6,3%	28
Nova Zelândia 4 vs. Nova Zelândia 5	2	5,9%	26
Japão vs. Vanuatu	2	3%	13
Vanuatu vs. Fiji	2	2,7%	12
Japão vs. Fiji	2	5%	22
Vanuatu vs. Vanuatu	2	7,5%	33

### 3.2 ESTUDO MORFOLÓGICO

O conjunto de caracteres observados posicionam os espécimes de ambas as províncias brasileiras em *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine. Uma descrição completa é dada a seguir, incluindo imagens de aspectos vegetativos, reprodutivos tetrasporangiais e gametangiais.

*Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine 1928:252

BASINÔMIO: *Lithothamnion erubescens* Foslie 1900:9-10, Taylor (1960)

HOLÓTIPO: TRH, sem número

LOCALIDADE TIPO: Chaloup Bay, Arquipélago Fernando de Noronha, Brasil

SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

*Lithothamnion erubescens* Foslie 1900

SINÔNIMOS HETEROTÍPICOS

*Lithothamnion erubescens* f. *madagascarensis* Foslie 1901

*Lithothamnion erubescens* f. *haingsisianum* Weber-van Bosse & Foslie 1901

*Lithothamnion erubescens* f. *subflabellatum* Foslie 1904

*Lithothamnion madagascarensis* (Foslie) Foslie 1906

*Mesophyllum madagascariense* (Foslie) Adey 1970

*Lithothamnion patena* f. *incisa* Foslie 1906

*Lithothamnion incisum* (Foslie) Foslie 1907

*Mesophyllum incisum* (Foslie) Adey 1970

*Polyporilthon patena* var. *incisa* (Foslie) Chapman & Parkinsn (1974)

ETIMOLOGIA: *Mesophyllum* vem do grego *mesos*, que significa meio e do grego latinizado *phyllon* (folha); provavelmente se referindo à hipótese de Lemoine (1928) de que as espécies de *Mesophyllum* apresentariam uma morfologia intermediária à de *Lithophyllum* e *Lithothamnion* (Woekerling 1988).

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO (Figura 7): Santa Catarina (Horta *et al.*, 2011; Pascelli *et al.*, 2013); São Paulo (presente estudo); Espírito Santo (presente estudo); Ilha da Trindade (presente

estudo); Bahia (Figueiredo & Steneck, 2000; Figueiredo *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2008; Bahia *et al.*, 2010); Fernando de Noronha (Foslie, 1900; Burgos, 2011) e Ceará (presente estudo).

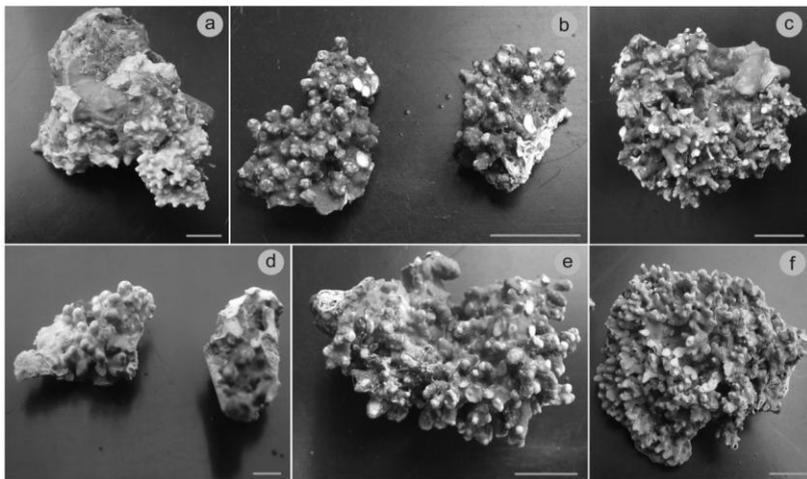


**Figura 3.7.** Mapa de distribuição de *M. erubescens* no litoral brasileiro. CE: Ceará; FN: Fernando de Noronha; BA: Bahia; ES: Espírito Santo; IT: Ilha da Trindade; SP: São Paulo; SC: Santa Catarina.

**MATERIAL EXAMINADO: BRASIL. SANTA CATARINA.** Ilha do Arvoredo, 28.XI.2012, M. Sissini & L. Ferreira. **SÃO PAULO.** Ilha Queimada Grande, 19.IV.2011, M. Sissini, B. Torrano; Ilha das Cabras, Ubatuba, II.2012, P. Horta. **ESPÍRITO SANTO.** Ilhas Rasas, Guarapari, 29.III.2012, M. Sissini. Ilha da Trindade, 16.VI.2012, 25.VI.2012, 24.VII.2012, 6.VIII.2012, M. Sissini. **BAHIA.** Praia do Jauá, Camaçari, 23.V.2013, B. Torrano, C. Azevedo, T. Vieira-Pinto. **PERNAMBUCO.** Boca do Inferno, Fernando de Noronha, 21.XI.2011, F. Scherner, D. Burgos. Cagarras, Fernando de Noronha, 8.VIII.2013, P. Horta. **CEARÁ.** Risca do Meio, 18.IV.2012, M. Sissini.

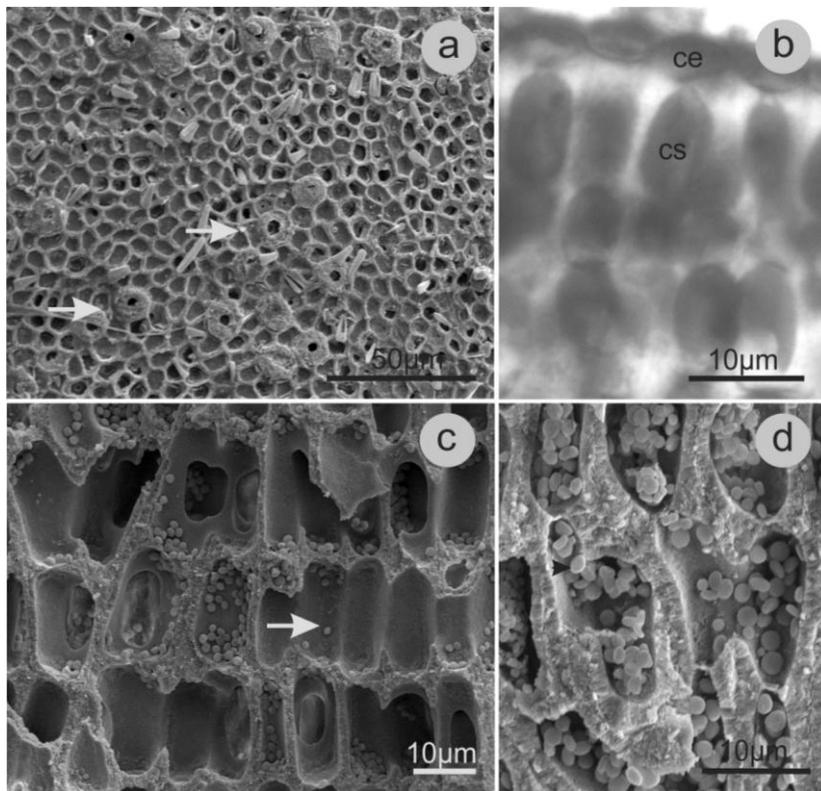
**HÁBITO:** Formas incrustantes epilíticas e epizóicas (em corais), além de formadoras de rodolitos foram observadas (Figura 3.8 a-f). Em Santa Catarina e na Ilha da Trindade, formam bancos em associação com outras espécies de *Lithophyllum* e *Lithothamnion*. Formas incrustantes foram encontradas desde o entre-marés (0 metros de profundidade), na Praia do Jauá, Bahia e formas livres em até 25 metros de profundidade

na Risca do Meio (CE) e Cagarras (FN). Talo violeta amarronzado, com protuberâncias frequentemente ramificadas, basalmente cilíndricas chegando nas porções distais a levemente achatadas; 1-2 mm de diâmetro e 1,5-4 mm de altura, com fusões frequentes, de aspecto fruticoso a verrucoso.



**Figura 3.8 (a-f).** Aspecto geral dos espécimes em estudo de *M. erubescens*. (a) Ilhas Rasas|ES (b) Jauá|BA (c) Ilha Queimada Grande|SP (d) Cagarras|FN (e) Ilha do Arvoredo|SC (f) Ilha da Trindade|ES. Escala 1cm.

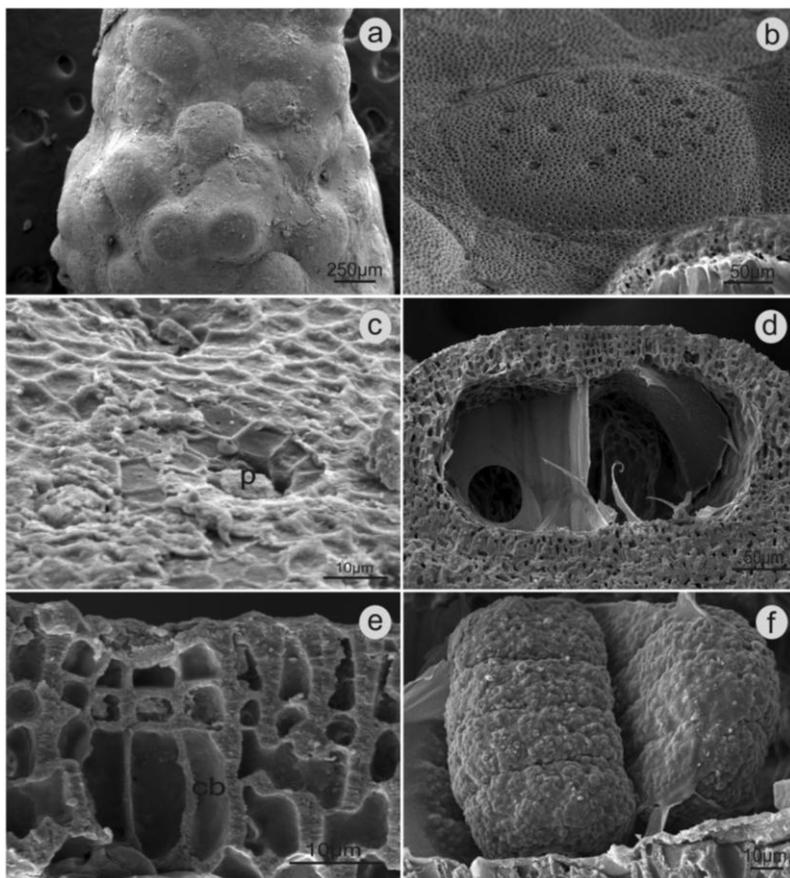
**ESTRUTURA VEGETATIVA:** Construção monômera. Células epiteliais (Figuras 3.9 a,b) com 5-14  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2-4  $\mu\text{m}$  de altura, arredondadas a achatadas, mas nunca em forma de taça. Células subepiteliais mais alongadas do que as subsequentes, com 5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 9-18  $\mu\text{m}$  de altura (Figura 3.9 b). Filamentos unidos por conexões celulares primárias e, lateralmente, por fusões celulares (Figura 3.9 c). Tricocitos de ausentes a abundantes. Quando observados ocupando a superfície isoladamente (Figura 3.9 a) e conexões celulares secundárias são desconhecidas para a espécie. Grãos de amido frequentes (Figura 3.9 d).



**Figura 3.9 (a-d).** Aspectos vegetativos de *M. erubescens*. **(a)** Vista superficial das células epiteliais com tricocitos dispersos (seta). **(b)** Células epiteliais (ce) achatadas a arredondadas, mas nunca em forma de taça e células subepiteliais (cs) mais alongadas do que as subsequentes. **(c)** Seta indicando fusão celular. **(d)** Grãos de amido na ponta da seta.

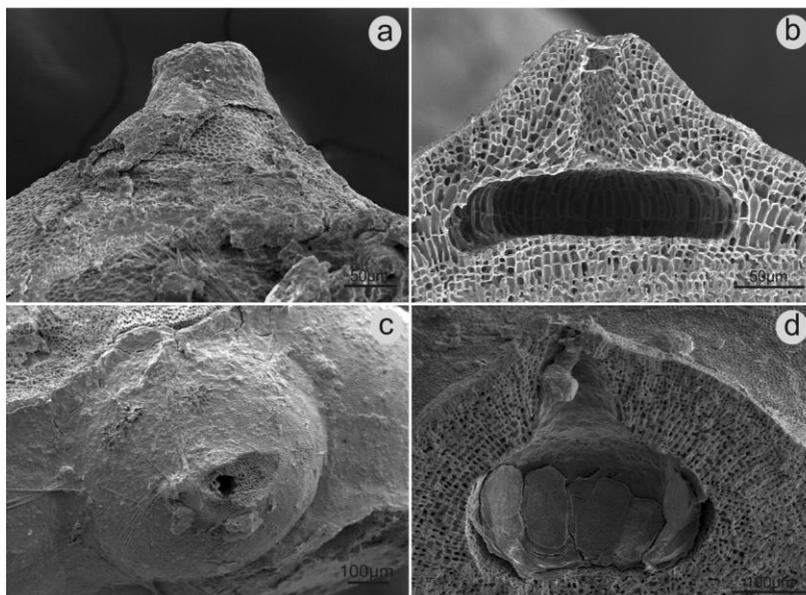
**ESTRUTURA REPRODUTIVA:** Conceptáculos tetrasporofíticos multiporados (Figura 3.10 a), elevados em relação à superfície do talo, com o teto plano (não em forma de vulcão, Figura 3.10 b); quando maduros, podem ser observados enterrados em meio ao peritalo. Poros levemente afundados (Figura 3.10 c). Câmaras dos conceptáculos em forma elíptica, com 231-349 μm de diâmetro e 126-238 μm de altura (Figura 3.10 d). Quando maduro, o teto do conceptáculo tetrasporangial apresenta de 5 a 7 células e 30-45 μm de espessura. O canal do poro delimitado por filamento de 3 a 4 células, sendo a basal marcadamente mais alongada do que as demais células do teto (Figura 3.10 e), com 10-17 μm de altura. Os tetrasporângios são dispersos na câmara do

conceptáculo, quando maduros, apresentam de 63-84  $\mu\text{m}$  de altura e são formados por quatro tetrásporos zonados (Figura 3.10 f). Tampões apicais bloqueiam a abertura do poro impedindo que os tetrasporângios saiam até que estejam maduros.



**Figura 3.10 (a-f).** Aspectos reprodutivos de *M. erubescens* vistos em MEV. **(a)** Vista superficial do talo com conceptáculos multiporados tetrásporangiais. **(b)** Detalhe de um conceptáculo multiporado, com teto plano e não em forma de vulcão. **(c)** Detalhe de um poro **(p)** levemente afundado. **(d)** Vista longitudinal do conceptáculo tetrásporangial. **(e)** Detalhe das células que delimitam o canal do poro, sendo as basais **(cb)** mais alongadas do que as demais. **(f)** Detalhe de tetrásporangios zonados.

Conceptáculos espermatangiais uniporados (Figuras 3.11 a,b). Filamentos espermatangiais não ramificados na base da câmara do conceptáculo. Câmara com 133-138  $\mu\text{m}$  de altura e 205-210  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Conceptáculo carpogonial uniporado (Figuras 3.11 c,d), em forma de haltere e proeminente, com 349-446  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 366-516  $\mu\text{m}$  de altura (Figuras 3.11 c,d).



**Figura 3.11 (a-d).** Aspectos anatômicos de conceptáculos gametangiais uniporados de *M. erubescens* vistos em MEV. **(a)** Conceptáculo gametangial masculino em vista superficial. **(b)** Corte longitudinal de conceptáculo masculino. **(c)** Conceptáculo carpogonial (feminino) em vista superficial. **(d)** Corte longitudinal do conceptáculo feminino com carpósporos.

#### 4 DISCUSSÃO

Os espécimes avaliados provenientes da costa oeste do Atlântico correspondem à atual circunscrição morfoanatômica do gênero *Mesophyllum*: talo monômero; haustório ausente; células epiteliais esféricas ou ligeiramente arredondadas, mas nunca em forma de taça; células subepiteliais mais alongadas do que as subsequentes; ausência de conexões celulares secundárias (Woelkerling & Irvine, 1986, 2007; Woelkerling, 1988; Wilks & Woelkerling, 1995; Athanasiadis *et al.*, 2004). No entanto, quando considerada as relações moleculares dentre as Hapalidiaceae, verifica-se que *M. erubescens* se encontra em clado

distinto e distante de *M. lichnoides*, espécie que tipifica o gênero, como mostram as análises filogenéticas para os marcadores moleculares SSU, LSU, *psbA* e COI (Bittner *et al.*, 2011; Pena *et al.*, 2011). Vale ressaltar que as possíveis incongruências em destaque podem ser decorrentes da delimitação de algumas espécies sem a devida caracterização de suas estruturas morfoanatômicas e reprodutivas, especialmente aquelas relacionadas às plantas gametofíticas masculinas. Portanto, deve-se buscar uma detalhada reavaliação dos representantes do grupo considerando estes aspectos morfoanatômicos e moleculares para que, especialmente, o complexo *Synarthrophytum*, *Phymatholithon* e *Mesophyllum*, seja elucidado (ver mais detalhes dessa discussão no Capítulo 2).

*Taxonomia e delimitação da espécie: abordagem morfológica e molecular*

O presente estudo amplia a distribuição de *M. erubescens* no Brasil para o Ceará, Ilha da Trindade e Espírito Santo. Diferenças morfológicas, resultantes de plasticidade fenotípica, entre os dois clados brasileiros (Tropical e Temperado Quente) constituídos pelas sequências de *psbA* foram investigadas e apresentados na Tabela 3.3.



**Tabela 3.3.** Comparação das características morfológicas de materiais posicionados em *M. erubescens* de diferentes localidades (+ caráter presente, - caráter ausente, ND dado não disponível).

	<i>M. erubescens</i> tipo Fernando de Noronha <sup>1</sup>	<i>M. erubescens</i> Brasil TQ <sup>4</sup>	<i>M. erubescens</i> Brasil TP <sup>4</sup>	<i>M. erubescens</i> Indonésia <sup>2</sup>	<i>M. erubescens</i> África do Sul <sup>1</sup>	<i>M. erubescens</i> Sudeste Austrália <sup>3</sup>
Protuberâncias ramificadas						
Diâmetro (mm)	ND	1-2	1-2	ND	1-3	ND
Altura (mm)	ND	4	1,5-6	ND	2-7	ND
Células epiteliais						
Diâmetro (µm)	4-7	5-11	6-14	5-11	6-7	3,5-7
Altura (µm)	2,5-4	2-4	2-4	5-10	2-3	3,5-4,5
Células subepiteliais						
Diâmetro (µm)	4,5-6	5-10	6-10	ND	5-7	ND
Altura (µm)	5-9	10-17	9-18	ND	7-10	ND
Tricocitos	ND	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Fusões celulares	+	+	+	ND	+	+
Conexões celulares secundárias	ND	Não observado	Não observado	ND	ND	Não observado
Conceptáculo tetrasporangial						
Diâmetro (µm)	219-246	173-232	231-349	350-475	210-300	200-530
Altura (µm)	113-130	126-164	126-238	ND	85-125	90-280
Teto do conceptáculo						
Número de células	ND	5 – 7	5-7	4-6	4-7	4-6
Canal do poro						
Número de células	3-5	3-4	3-4	3-4	3-4	3-5
Céls. Basais alongadas	+	+	+	+	+	+
Altura (µm)	ND	10-12	15-16	ND	ND	ND

**Tabela 3.3.** Continuação.

	<i>M. erubescens</i> tipo	<i>M. erubescens</i>	<i>M. erubescens</i>	<i>M. erubescens</i>	<i>M. erubescens</i>	<i>M. erubescens</i>
	Fernando de Noronha <sup>1</sup>	Brasil TQ <sup>4</sup>	Brasil TP <sup>4</sup>	Indonésia <sup>2</sup>	África do Sul <sup>1</sup>	Sudeste Austrália <sup>3</sup>
Poros	afundados	afundados	afundados	ND	afundados	ND
Tetrasporângio	ND					
Diâmetro (µm)	ND	ND	ND	ND	55-94	30-140
Altura (µm)	ND	ND	ND	ND	130-170	55-230
Conceptáculo carpogonial						
Diâmetro (µm)	ND	349-446	ND	ND	340-425	330-400
Altura (µm)	ND	366-516	ND	ND	140-200	160-190
Conceptáculo espermatangial						
Diâmetro (µm)	ND	ND	ND	ND	320	160-330
Altura (µm)	ND	ND	ND	ND	80	50-115

<sup>1</sup> Keats & Chamberlain, 1994<sup>2</sup> Verheij, 1993<sup>3</sup> Harvey *et al.*, 2003b<sup>4</sup> Presente estudo

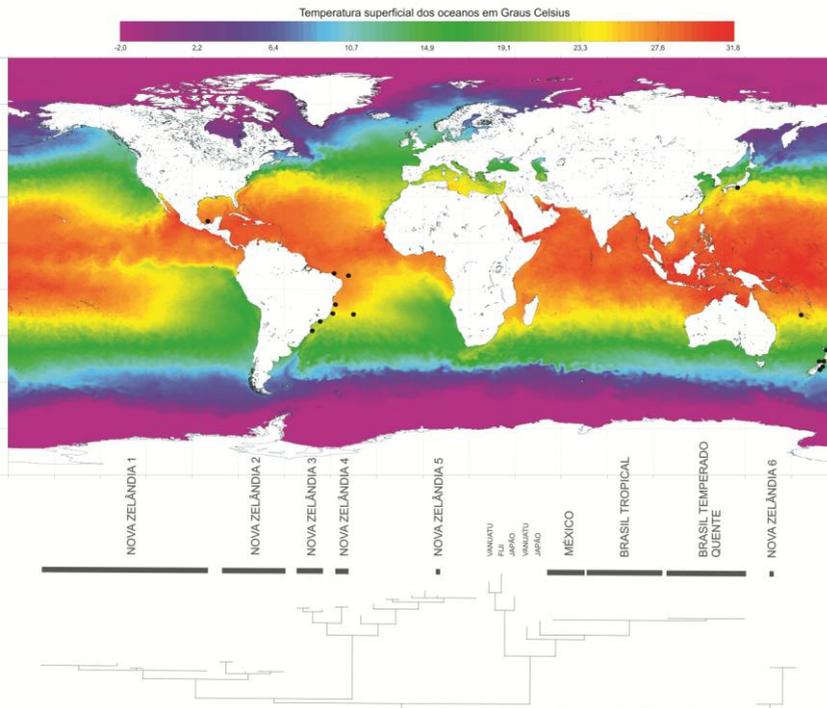
Dentre os espécimes brasileiros analisados, as células que delimitam o canal do poro, em especial as células basais, tem se mostrado sistematicamente mais alongadas em relação às demais do teto do conceptáculo no diagnóstico de *M. erubescens* (Nunes *et al.*, 2008; Horta *et al.*, 2011; presente estudo). Contudo, *M. printzianum* Woelkerling & A.S.Harvey também apresenta canal do poro delimitado por células mais alongadas, especialmente próximas à base, do que as demais do teto do conceptáculo e diferencia-se de *M. erubescens* por apresentar conceptáculo tetrasporangial em forma de vulcão, ou seja, com um aro bordeando o teto do conceptáculo. Harvey *et al.* (2005) ressaltam que em alguns espécimes provenientes da Nova Zelândia o posicionamento em uma das duas espécies é dificultado por estados intermediários, constituindo, então o complexo *Mesophyllum erubescens-M. printzianum*.

As características morfoanatômicas observadas, juntamente com as análises moleculares dos três marcadores (UPA, *psbA* e *rbcL*), incluindo a sequência do material tipo, validam o posicionamento do material brasileiro em *M. erubescens*. Ao mesmo tempo, a variação genética (para o *psbA*) entre as linhagens Atlântico Tropical e Indo-Pacífico Oriental observada é de 2,5% a 13,1%. Esta é uma variação consideravelmente elevada para se tratar de uma mesma espécie.

Observações e descrições do material da Nova Zelândia (Harvey *et al.*, 2005) posicionados em *M. erubescens* mostram as mesmas características das células que delimitam o canal do poro do material brasileiro. Porém, os altos valores de divergência molecular para o marcador *psbA* (7,5 a 13,1%), sugerem a existência de espécies crípticas. Broom *et al.* (2008) já discutem a grande variabilidade genética para este marcadores entre as Corallinales, que variaram entre 0-7%. Análises filogenéticas com um marcador mais conservado, o SSU rDNA, também alertam para a diversidade existente dentro do referido taxa, mostrando que *M. erubescens* da Nova Zelândia estão mais fortemente relacionados à *Mesophyllum lichenoides*, da França às sequências da localidade tipo (Brasil) ou do material proveniente do Oceano Pacífico Sul (Vanuatu e Fiji) (Bittner *et al.*, 2011).

Apesar de não observarmos variações morfoanatômicas que pudessem auxiliar na diagnose do presente material no Atlântico, as análises moleculares reforçam a existência de clados diversos, assim como havia sendo demonstrado em outras reconstruções filogenéticas (Broom *et al.*, 2008; Bittner *et al.*, 2011). Considerando apenas a

caracterização morfológica, as 12 linhagens identificadas como *M. erubescens* teriam ampla distribuição, ocorrendo em ecorregiões (Spalding *et al.* 2007) como o Atlântico Tropical, Australásia Temperada e Indo-Pacífico Oriental, como mostra a Figura 3.12.



**Figura 3.12.** Linhagens de *M. erubescens* a partir do marcador *psbA* à esquerda e distribuição dos espécimes. As cores representam a temperatura superficial dos oceanos para outubro de 2013 (Fonte: [www.ospo.noaa.gov](http://www.ospo.noaa.gov)).

Esta hipotética ampla distribuição, não encontra apoio nos padrões globais de ocorrência das espécies. As ecorregiões ou mesmo as tradicionais províncias biogeográficas propostas por Briggs (1974, 1995) são definidas com base no seu grau de endemismo. Esse conceito foi, de maneira geral, adaptado para macroalgas marinhas (Lünning, 1990), sendo corroborado por diferentes autores (Horta *et al.*, 2001; Adey & Steneck, 2001). Partindo do que se conhece de macroecologia e biogeografia desses produtores primários mundiais, a hipótese de que estivéssemos tratando de variações intraespecíficas em *M. erubescens* não se sustenta.

A separação genética (para o marcador *psbA*) das populações do Atlântico Tropical foi ao encontro das províncias biogeográficas brasileiras, propostas por Horta *et al.* (2001): Tropical e Temperada Quente, com o Espírito Santo representando uma zona de transição. A presença de elementos tropicais e subtropicais, bem como a ampla diversidade de ambientes, podem explicar a alta diversidade específica encontrada no estado do Espírito Santo em organismos marinhos, como, por exemplo, macroalgas (Oliveira Filho, 1969; 1977; Horta *et al.*, 2001); peixes recifais (Floeter *et al.*, 2001) e corais (Leão *et al.*, 2003).

A similaridade entre a população Tropical e a do Golfo do México Sul é evidente, mostrando que, apesar dos mais de oito mil quilômetros que as separam e o grande aporte de água doce e sedimento dos rios Amazonas e Orinoco que deságuam no Atlântico nos últimos 10 milhões de anos (Hoorn, 1994), o fluxo gênico entre essas populações pode estar ocorrendo ou ocorreu recentemente. O grau de permeabilidade imposto pela pluma da foz destes grandes Rios representa um fator seletivo ecofisiológico, com papel variável entre diversos grupos de organismos marinhos, dependendo das suas características reprodutivas, fisiológicas e estratégias de dispersão. *Ophioblennius*, gênero de peixe recifal comum tanto no Pacífico Oriental como no Atlântico, teve suas populações geneticamente estudadas em ambos os oceanos por Muss *et al.* (2001) a fim de elucidar quais fatores físicos estariam influenciando sua história evolutiva e eles puderam concluir que as populações do Atlântico mostraram-se geneticamente bem estruturadas, correlacionando a divergência genética entre populações à presença de barreiras geográficas. Esse padrão também foi observado para corais de fogo (Souza, 2013) e ouriços do mar *Echinometra* sp. (McCartney *et al.*, 2000).

Segundo van den Hoek (1987) “A dispersão de longa distância em algas existe, só que é uma exceção” e está intrinsecamente relacionada com o tempo de duração dos esporos. Transpor grandes distâncias e até mesmo barreiras pode estar relacionado à deriva, seja através de substratos naturais ou artificiais. Entre as algas calcárias, algumas espécies apresentam forma de dispersão como epífitas de outras macroalgas flutuantes, contudo, esta forma ainda não foi registrada para *M. erubescens*.

A afinidade entre as floras marinhas do Brasil e Caribe é reconhecida desde Taylor (1960), contudo, estudos filogeográficos abordando a conectividade entre essas populações são inexistentes.

Portanto, dizer que *M. erubescens* representa um padrão típico ou atípico é, ainda, insipiente.

As linhagens do Oceano Pacífico também podem ser agrupadas segundo às ecorregiões propostas por Spalding *et al.* (2007): Pacífico Norte Temperado (Japão), Australásia Temperada (Nova Zelândia) e Indo-Pacífico Central (Fiji, Vanuatu). Estas diferenças podem representar os processos de especiação, já descrito para diferentes grupos de organismos marinhos. A alopatria, classicamente aceita para a diferenciação de espécies, é questionada em organismos marinhos e muitos exemplos a cerca de combinações de processos parecem ser mais elucidativos (ver revisão de Bowen *et al.*, 2013).

#### *Provável caminho de colonização no Oceano Atlântico*

Segundo a árvore filogenética do marcador *psbA*, o clado constituído pelo complexo “*M. erubescens*-*M. printzianum*” da Nova Zelândia é o mais basal, representando a provável origem da grupo no Oceano Pacífico. Sua chegada ao Oceano Atlântico pode ter sido via Istmo do Panamá, uma vez que seu completo fechamento ocorreu há aproximadamente 3,1-3,5 milhões de anos (Coates & Obando, 1996) e, dispersado meridionalmente. A colonização para o Brasil Temperado Quente poderia ter sido facilitado pela circulação das correntes, visto que esse clado mostra-se ligeiramente mais recente do que o Brasil Tropical. Contudo, o padrão observado é sentido sul-norte, com o braço central da Corrente Sul Equatorial subindo em direção ao NE do Brasil e depois se transformando em Corrente das Guianas (Lumpkin & Garzoli, 2005).

Outra hipótese acerca da colonização de *M. erubescens* no Oceano Atlântico pode ser via Oceano Índico. Horta *et al.* (2001) acreditam que a flora marinha brasileira teria sua origem Indo-Pacífica, em uma época em que as correntes que banhavam a costa brasileira não provinham do Atlântico Norte, mas diretamente do Índico, impulsionados pela corrente das Agulhas. Os mesmos autores questionam a origem caribenha da flora brasileira, postulando que estas poderiam ter uma origem comum Indo-Pacífica, mas por rotas e momentos diferentes.

A rota de chegada de *M. erubescens* ao Oceano Atlântico ainda é incerta. Sequências provenientes do Atlântico Oriental poderão fornecer subsídios para um melhor entendimento a cerca da origem e evolução desse grupo e da flora marinha bentônica como um todo no Atlântico Sul.

## 5 CONCLUSÃO

### *Posicionamento genérico de M. erubescens*

Apesar das características morfoanatômicas de *M. erubescens* conferirem com o conceito do gênero *Mesophyllum*, as relações moleculares dentre as Hapalidiaceae parece não corroborar tal posicionamento. Com isso, espécimes do Atlântico, até então atribuídos a *M. erubescens*, devem ter seu posicionamento genérico reavaliado, considerando a diversidade e distribuição dos representantes da família no Atlântico sul.

### *Delimitação da espécie*

Os espécimes brasileiros foram identificados como *M. erubescens* com base no conjunto de características descritas para a espécie. Contudo, os dados de DNA plastidial indicam que as características morfológicas utilizadas na delimitação de *M. erubescens* não refletem a diversidade do grupo. Propõem-se a utilização da técnica DNA *Barcode* como uma ferramenta aliada na identificação do grupo. Ainda, a comparação tanto morfológica como molecular com o espécime tipo deve ser realizada a fim de evitar futuras confusões taxonômicas e emprego inapropriado de determinado epíteto.

Os marcadores UPA e *psbA* mostraram-se uma valiosa ferramenta na identificação e delimitação da espécie. Contudo, mais sequências de UPA são necessárias para uma comparação mais robusta.

O agrupamento das sequências de *psbA* do material brasileiro e mexicano juntamente com a sequência da terceira região do *rbcL* do material tipo de *M. erubescens* corroborou a identificação dos espécimes.

### *Distribuição de M. erubescens*

A distância geográfica entre os Oceanos Atlântico e Pacífico, os padrões atuais de circulação do Atlântico e as características ecofisiológicas da espécie parecem estar determinando os padrões genéticos de distribuição de *M. erubescens* como sintetiza a Figura 3.14. Quanto sua provável rota de chegada ao Oceano Atlântico, sequências

provenientes do Atlântico Oriental poderão fornecer subsídios para um melhor entendimento a cerca da origem e evolução no Atlântico Sul.

*Quantas espécies em um epíteto?*

Os espécimes provenientes do Brasil e México podem ser posicionados no epíteto *M. erubescens*. No entanto, espécimes do Japão, Vanuatu, Fiji e Nova Zelândia apresentam divergência genética elevada para serem posicionados sob este mesmo epíteto, correspondendo a outras 11 linhagens.

## REFERÊNCIAS

- Adey, W.H. & Steneck, R.S. (2001) Thermogeography over time creates biogeographic regions: a temperature/space/time-integrated model and an abundance-weighted test for benthic marine algae. *Journal of Phycology* 37: 677-698.
- Aguirre, J.; Perfectti, F. & Braga, J.C. (2010) Integrating phylogeny, molecular clocks, and the fossil record in the evolution of coralline algae (Corallinales and Sporolithales, Rhodophyta). *Paleobiology* 36: 519-533.
- Athanasiadis, A.; Lebednik, P.A. & Adey, W.H. (2004) The genus *Mesophyllum* (Melobesioideae, Corallinales, Rhodophyta) on the northern Pacific coast of North America. *Phycologia* 43: 126-165.
- Athanasiadis, A. (1999) *Mesophyllum macedonis* nov.sp. (Rhodophyta, Corallinales), a putative Tethyan relic in the North Aegean Sea. *European Journal of Phycology* 34: 239-252.
- Bahia, R.G.; Abrantes, D.P.; Brasileiro, P.S.; Pereira Filho, G. H. & Amado Filho, G.M. (2010) Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal on Oceanography* 58: 323-337.
- Bailey, J.C. & Chapman, R.L. (1996) Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 18S rRNA gene sequence analysis. In: Chaudhary, B. R.; Agrawal, S. B. (Eds.) *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Amsterdam: Academic Publishing, pp.363–376.
- Bittner, L.; Payri C.E.; Maneveldt, G.W.; Couloux, A.; Cruaud, C.; Reviere, B. & Le Gall, L. (2011) Evolutionary history of the Corallinales (Corallinophycidae, Rhodophyta) inferred from nuclear, plastidial and mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 697-713.

- Bowen, B.W.; Rocha, L.A.; Toonen, R.J.; Karl, S.A. & ToBo Laboratory. (2013) The origins of tropical marine biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*. 28: 359-366.
- Briggs, J.C. (1974) Marine zoogeography. McGraw-Hill, New York.
- Briggs, J.C. (1995) *Global biogeography. Developments in paleontology and stratigraphy 14*, Amsterdam: Elsevier.
- Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. (2008) Utility of *psbA* and *nSSU* for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958- 973.
- Burgos, D.B. (2011) *Composição e estrutura das comunidades de macroalgas do infralitoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco – Brasil, com ênfase nas calcárias incrustantes*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.
- Cianciola, E.; Popolizio, T.; Schneider, C. W. & Lane, C. (2010) Using Molecular-Assisted Alpha Taxonomy to Better Understand Red Algal Biodiversity in Bermuda. *Diversity* 2: 946-958.
- Coates, A.G. & Obando, J.A. (1996) *The geological evolution of the Central American isthmus. Evolution and environment in tropical America*. Chicago: University of Chicago Press.
- Farias, J. (2009) *Aspectos taxonômicos de Lithothamnion superpositum e Mesophyllum engelhartii (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil
- Figueiredo, M.A.; Menezes, K.S.; Paiva, E.M.C.; Paiva, P.C.; Ventura, C.R.R. (2007) Evaluación experimental de rodolitos como sustratos vivos para la infauna em el Banco de Abrolhos, Brasil. *Ciencias Marinas* 33: 427-440.
- Figueiredo, M.A.O. & Steneck, R.S. (2000) Floristic and ecological studies of crustose coralline algae on Brazil's Abrolhos reefs. *In*

*Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*, Bali, p.493-498.

Floeter, S.R.; Guimarães, R.Z.P.; Rocha, L.A.; Ferreira, C.E.L.; Rangel, C.A. & Gasparini, J.L. (2001) Geographic variation in reef-fish assemblages along the Brazilian coast. *Global Ecology and Biogeography* 10: 423-433.

Floeter, S.R.; Rocha, L.A.; Robertson, D.R.; Joyeux, J.C.; Smith-Vaniz, W.F.; Wirtz, P.; Edwards, A.J.; Barreiros, J.P.; Ferreira, C.E.L.; Gasparini, J.L.; Brito, A.; Falcón, J.M.; Bowen, B.W. & Bernardi, G. (2008) Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 35: 22-47.

Foslie, M. (1900) Revised systematical survey of the Melobesieae. *Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* 5:1-22.

Gabrielson, P.W.; Miller, K.A. & Martone, P.T. (2011) Morphometric and molecular analyses confirm two distinct species of *Calliarthron* (Corallinales, Rhodophyta), a genus endemic to the northeast Pacific. *Phycologia* 50: 298-316.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso em 20 de outubro de 2013.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Harvey, A.S.; Woelkerling, W.J. & Millar, A.J.K. (2003) An account of the Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 16: 647-698.

Harvey, A.; Woelkerling, W.; Farr, T.; Neill, K. & Nelson, W. (2005) Coralline algae of central New Zealand: an identification guide to common “crustose” species. *NIWA Information Series* No. 57.

Hoorn, C. (1994) An environmental reconstruction of the paleo-Amazon River system (Middle-Late Miocene, NW Amazonia). *Paleogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology* 112: 187-238.

Horta, P.A. (2002) Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.

Horta, P.A.; Amancio, C.E.; Coimbra, C. & Oliveira, E.C. (2001) Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.

Horta, P.A.; Salles, J.P.; Bouzon, J.L.; Scherner, F.; Cabral, D.Q. & Bouzon, Z.L. (2008) Composição e estrutura do fitobentos do infralitoral da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil - Implicações para conservação. *Oecologia Brasiliensis* 12: 243-257.

Horta, P. A. ; Scherner, F.; Bouzoun, Z. L.; Riosmena-Rodriguez, R. & Oliveira, E. C. (2011) Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lenoime (Corallinales, Rhodophyta) of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 125-134.

Joyeux, J.C.; Floeter, S.R.; Ferreira, C.E.L. & Gasparini, J.L. (2001) Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *Journal of Biogeography* 28: 831-841.

Kato, A.; Baba, M. & Suda, S. (2011) Revision of the Mastophoroideae (Corallinales, Rhodophyta) and polyphyly in nongeniculate species widely distributed on Pacific coral reefs. *Journal of Phycology* 47: 662-672.

Keats, D.W. & Chamberlain, Y.M. (1994) Two melobesioid coralline algae (Rhodophyta, Corallinales): *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Lemoine and *Mesophyllum funafutiense* (Foslie) Verheij from Sodwana Bay, South Africa. *South African Journal of Botany* 60: 175-190.

Kim, M.S., Yang, E.C. & Boo, S.M. (2006) Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbcL* and *psbA* sequences. *Phycologia* 45: 520–8.

- Leão, Z.M.A.N.; Kikuchi, R.K.P. & Testa, V. (2003) *Corals and coral reefs of Brazil*. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 9-52.
- Lemoine, Me.P. (1928) Un nouveau genre de Mélobésiées: *Mesophyllum*. *Bulletin Société Botanique de France* 75: 251-254.
- Lindstrom, S.C. (2008) Cryptic diversity and phylogenetic relationships within the *Mastocarpus papillatus* species complex (Rhodophyta, Phylloporaceae). *Journal of Phycology* 44: 1300-1308.
- Luiz, O. J.; Madin, J.S.; Robertson, D.R.; Rocha, L.A.; Wirtz, P. & Floeter, S.R. (2012) Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. *Proceedings of The Royal Society B* 279: 1033-1040.
- Lumpkin, R. & Garzoli, S.L. (2005) Near-surface circulation in the Tropical Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I* 52: 495-518.
- Lünning, K. (1990) *Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology*. New York: John Willey & Sons, 527p.
- McCartney, M.A.; Keller, G. & Lessions, H.A. (2000) Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* 9: 1391-1400.
- McNeil, J.; Barrier, F.R.; Buck, W.R.; Demoulin, V.; Greuter, W.; Hawksworth, D.L.; Herendeen, P.S.; Knapp, S.; Marhold, K.; Prado, J.; Prud'Homme van Reine, W.F.; Smith, G.F.; Wiersema, J.H & Turland, N.J. (2012) *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 240p.
- Milstein, D.; Medeiros, A.S.; Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C. (2012) Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? A case study with Brazilian taxa. *Journal of Applied Phycology* 24: 837-845.
- Muss, A.; Robertson, D.R.; Stepien, C.A.; Wirtz, P. & Bowen, B.W. (2001) Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55: 561-572.

- Moura, C.W.N.; Kraus, J.E. & Cordeiro-Marinho, M. (1997) Metodologia para obtenção de cortes histológicos com historresina e coloração com azul de toluidina para algas coralíneas (Rhodophyta, Corallinales). *Hoehnea* 24: 17-27.
- Nunes, J.M.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Donangelo, A., Farias, J. & Horta, P.A. (2008) Aspectos taxonômicos de três espécies de coralíneas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59: 75-86.
- Oliveira Filho, E.C. (1969) Algas marinhas do sul do estado do Espírito Santo (Brasil). I-Ceramiales. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 26: 1-277.
- Oliveira Filho, E.C. (1977) *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Oliveira, E.; Österlund, K. & Mtolera, M.S.P. (2005) *Marine Plants of Tanzania. A field guide to the seaweeds and seagrasses*. Stockholm: Stockholm University, pp.267.
- Pascelli, C.; Riul, P.; Riosmena-Rodriguez, R.; Scherner, F.; Nunes, M. Hall-Spencer, J.M.; Oliveria, E.C. & Horta, P.A. (2013) Seasonal and depth-driven changes in rhodolith bed structure and associated macroalgae off Arvoredo island (southeastern Brazil). *Aquatic Botany*, *In Press*.
- Peña, V.; Adey, W.H.; Riosmena-Rodriguez, R.; Jung, M.Y.; Afonso-Carrillo, J.; Choi, H.G. & Bárbara, I. 2011. *Mesophyllum sphaericum* sp. nov. (Corallinales, Rhodophyta): a new maërl-forming species from the Northeast Atlantic. *Journal of Phycology* 47: 911-927.
- Riosmena-Rodriguez, R. & Vásquez-Elizondo, R.M. (2012) Range extension of *Mesophyllum engelhartii* (Foslie) W.H. Adey (Corallinales; Rhodophyta) to the Gulf of California: Morphology, anatomy and reproduction. *Botanica Marina* 55: 143-148.
- Ringeltaube, P. & Harvey, A. (2000) Non-geniculate coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) on the Heron Reef, Great Barrier Reef (Australia). *Botanica Marina* 43: 431-454.

Robba, L.; Russell, S.J.; Barker, G.L. & Brodie J. (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93: 1101-1108.

Saunders, G.W. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 360: 1879-1888.

Saunders, G.W. & McDevit, D.C. (2012) Acquiring DNA sequence data from dried archival red algae (Florideophyceae) for the purpose of applying available names to contemporary genetic species: a critical assessment. *Botany* 90: 191-203.

Scherner, F.; Riul, P.; Bastos, E.; Bouzon, Z.L.; Pagliosa, P.R.; Blankensteyn, A.; Oliveira, E.C. & Horta, P.A. (2010) Herbivory in a Rhodolith Bed: a Structuring Factor? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5: 358-366.

Silva, P.C.; Basson, P.W. & Moe, R.L. (1996) Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *University of California Publications in Botany* 79: 1-1259.

Souza, J.N. 2013. *Endemismo e conectividade de corais-de-fogo (Millepora spp.) no Oceano Atlântico*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Spalding, M.D.; Fox, H.E.; Allen, G.R.; Davidson, N.; Ferdeña, Z.A.; Finlayson, M.; Halpern, B.S.; Jorge, M.A.; Lombana, A.; Lourie, S.A.; Martin, K.D.; McManus, E.; Molnar, J.; Recchia, C.A. & Robertson, J. (2007) Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57: 573-583.

Stramma, L. & England, M. (1999) On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research* 104: 20,863-20,883.

Taylor, W.R. (1960) *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. Michigan: University of Michigan Press.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

van den Hoek, C. (1987) The possible significance of long-range dispersal for the biogeography of seaweeds. *Helgoländer Meeresunters* 41: 261-272.

Verheij, E. (1993) *Marine plants on the reefs of the Spermonde Archipelago, SW Sulawesi, Indonesia: aspects of taxonomy, floristics, and ecology*. Leiden: Rijksherbarium/Hortus Botanicus.

Walker, R.H.; Brodie, J.; Russell, S.; Irvine, L.M. & Orfanidis, S. (2009) Biodiversity of coralline algae in the northeastern Atlantic including *Corallina caespitosa* sp. nov. (Corallinoideae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 45: 287-297.

Wilks K.M. & Woelkerling, W.J. (1995) An account of Southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 8: 549-583.

Wynne, M.J. (2011) A Checklist of Benthic Marine Algae of the Tropical and Subtropical Western Atlantic: Third Revision. *Nova Hedwigia*, Beiheft.

Woelkerling, W.J. (1988) The Coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate corallinaceae. *British Museum (Natural History) and Oxford University Press*: London e Oxford.

Woelkerling, W.J. & Harvey, A. (1992) *Mesophyllum incisum* (Corallinaceae, Rhodophyta) in Southern Australia: Implications for generic and specific delimitation in the melobesioideae. *British Phycological Journal* 27: 381-399.

Woelkerling, W.J. & Harvey, A. (1993) An Account os Southern Australia Species of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 571-637.

Woelkerling, W.J. & Irvine, L.M. (1986) The neotypification and status of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 25: 379-396.

Woelkerling, W.J. & Irvine, L.M. (2007) The genus *Mesophyllum* (Hapalidiaceae, Corallinales, Rhodophyta): typification update. *Phycologia* 46: 230-231.



### Apêndice E. Dados de coleta e marcadores amplificados e sequenciados para cada amostra.

Código amostra	Marcadores Moleculares			Espécie	Estado	Local	GPS	Data coleta	Coletor (es)
	UPA	psbA	rbcl						
CE19	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	CE	Risca do Meio	03°34'S e 38°24'O	18.04.2012	M. Sissini
FN01	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	PE	Cagarras, F. Noronha	03°50'S e 32°25'O	08.08.2013	P. Horta
FN02	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	PE	Cagarras, F. Noronha	03°50'S e 32°25'O	08.08.2013	P. Horta
FN06	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	PE	Boca Inferno, F. Noronha	03°50'S e 32°25'O	21.11.2011	F. Scherner, D. Burgos
JUAU06	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	BA	Praia do Jauá, Camaçari	-	23.05.2013	B. Torrano, C. Azevedo, T. Pinto
ES01	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilhas Rasas, Guarapari	-	29.03.2012	M. Sissini
ES04	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilhas Rasas, Guarapari	-	29.03.2012	M. Sissini
ES06	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilhas Rasas, Guarapari	-	29.03.2012	M. Sissini
ES14	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilha Escalvada, Guarapari	20°40'S e 44°24'O	30.03.2012	E. Mazzei, H. Pinheiro
ES17	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilhas Rasas, Guarapari	-	29.03.2012	M. Sissini
IT05	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilha da Trindade	20°30'S e 29°19'O	16.06.2012	M. Sissini
IT49	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilha da Trindade	20°30'S e 29°19'O	25.06.2012	M. Sissini
IT55	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilha da Trindade	20°30'S e 29°19'O	06.08.2012	M. Sissini
IT69	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	ES	Ilha da Trindade	20°30'S e 29°19'O	24.07.2012	M. Sissini
IB02	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilhabela, S. Sebastião	-	31.01.2013	A. Aued
IQG	✓	-	✓	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilha Queimada Grande	24°28'S e 46°40'O	19.04.2011	M. Sissini, B. Torrano
IQG02	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilha Queimada Grande	24°28'S e 46°40'O	19.04.2011	M. Sissini, B. Torrano
IQG03	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilha Queimada Grande	24°28'S e 46°40'O	19.04.2011	M. Sissini, B. Torrano
IQG04	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilha Queimada Grande	24°28'S e 46°40'O	19.04.2011	M. Sissini, B. Torrano
SP01	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilhabela, S. Sebastião	-	02.2012	P. Horta
SP02	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilhabela, S. Sebastião	-	02.2012	P. Horta
SP04	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilhabela, S. Sebastião	-	02.2012	P. Horta
IBC1025	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SP	Ilha Palmas, S. Sebastião	23°32'S e 45°01'O	29.08.2011	B. Torrano, A. Medeiros, C. Iha
LUC01	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	SC	Ilha do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
LUC02	✓	✓	-	<i>M. erubescens</i>	SC	Ilha do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
LUC03	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SC	Ilha do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
LUC05	✓	-	-	<i>Me. erubescens</i>	SC	Ilha do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira

**Apêndice E.** Continuação.

LUC07	✓	-	-	<i>M. erubescens</i>	SC	Ilha do Arvoredo	27°16'S e 48°22'O	28.11.2012	M. Sissini, L. Ferreira
ID07	✓	✓	✓	<i>M. erubescens</i>	SC	Ilha Deserta	-	04.08.2011	E. Bastos
NR0038	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	MX	Santiaguillo, Veracruz	19°08'N e 95°47'	16.10.2012	P. Avila
NR0041	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	MX	Santiaguillo, Veracruz	19°08'N e 95°47'	16.10.2012	P. Avila
NR0065	-	✓	✓	<i>Mesophyllum</i> sp.	MX	Topatillo, Veracruz	19°08'N e 95°50'	20.10.2012	P. Avila

**Apêndice F.** Sequências de UPA disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises de agrupamento.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ420979	Havaí
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ420974	Havaí
<i>Pneophyllum conicum</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421556	Havaí
<i>Phymatolithon</i> sp.	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421548	Havaí
<i>Hydrolithon reinboldii</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421557	Havaí
<i>Lithophyllum insipidum</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421555	Havaí
<i>Sporolithon ptychoides</i>	Sherwood <i>et al.</i> 2010	HQ421547	Havaí
<i>Gracilaria dotyi</i>	Sherwood & Presting 2007	EF426613	Havaí

**Apêndice G.** Sequências de *psbA* disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises de agrupamento e filogenéticas.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Kato & Suda 2011	AB576044	Japão
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Kato & Suda 2011	AB576043	Japão
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361397	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361394	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361750	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361551	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167996	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167986	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167980	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167978	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167977	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167957	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167951	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167936	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167932	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167929	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167919	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167898	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167893	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167891	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167889	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167884	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167876	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167874	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167871	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum</i> cf. <i>erubescens</i>	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917444	Vanuatu
<i>Mesophyllum</i> cf. <i>erubescens</i>	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917446	Vanuatu
<i>Mesophyllum</i> cf. <i>erubescens</i>	Bittner <i>et al.</i> 2009	GQ917468	Fiji
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	Meneveldt <i>et al.</i> 2012	JQ917418	?

### Apêndice G. Continuação.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361670	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361605	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361665	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167985	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361577	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361436	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ168004	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ168001	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167956	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167935	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167888	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167870	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361453	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361449	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361385	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361519	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167993	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ167918	Nova Zelândia
<i>Mesophyllum engelhartii</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361517	Nova Zelândia
<i>Phymatolithon repandum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361395	Nova Zelândia
<i>Phymatolithon repandum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361683	Nova Zelândia
<i>Lithothamnion glaciale</i>	Hind & Saunders 2012	JQ422235	?
<i>Lithothamnion crispatum</i>	Broom <i>et al.</i> 2008	FJ361502	Nova Zelândia
<i>Sporolithon durum</i>	Hart <i>et al.</i> 2005	DQ168023	Austrália
<i>Gracilaria textorii</i>	Kim <i>et al.</i> 2005	DQ095842	Japão

### Apêndice H. Sequências de *rbcL* disponíveis no *GenBank* e utilizadas nas análises de agrupamento e filogenéticas.

Espécie	Autor	Acesso <i>GenBank</i>	Local
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	Gabrielson 2010	HQ322337	?
<i>Lithophyllum impressum</i>	Miklasz <i>et al.</i> 2012	JX393129	?
<i>Lithophyllum impressum</i>	Miklasz <i>et al.</i> 2012	JX393128	?
<i>Lithophyllum grumosum</i>	Miklasz <i>et al.</i> 2012	JX393124	?
<i>Lithophyllum grumosum</i>	Miklasz <i>et al.</i> 2012	JX393122	?
<i>Gracilaria textorii</i>	Gurgel & Fredericq 2001	AY049325	Japão

