Beatriz Nogueira Torrano da Silva

Taxonomia e filogenia de Lithophylloideae
(Rhodophyta) no Brasil

Taxonomy and phylogeny of Lithophylloideae
(Rhodophyta) from Brazil

2015

Beatriz Nogueira Torrano da Silva

Taxonomia e filogenia de Lithophylloideae (Rhodophyta) no Brasil

**Taxonomy and phylogeny of Lithophylloideae (Rhodophyta) from
Brazil**

Versão final.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutora em Ciências, na área de
Botânica.

Orientadora: **Dra. Mariana Cabral de Oliveira**

Co-orientador: **Dr. Rafael Riosmena Rodríguez**

São Paulo

2015

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Torrano-Silva, Beatriz Nogueira

Taxonomia e Filogenia de Lithophylloideae no Brasil
/ Beatriz Nogueira Torrano da Silva – São Paulo:
B.N.T.S., 2015, 250 p.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo,
Instituto de Biociências, Departamento de Botânica,
2015.

1. *Amphiroa* 2. Algas calcárias 3 *DNA Barcodes* 5.
Lithophyllum 6 Filogenia molecular 7. *Paulsilvella* 8.
Rhodophyta 9. rodolitos 10 *Titanoderma* I.
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências,
Departamento de Botânica II Título

Agradecimentos

À FAPESP, pelas duas bolsas concedidas para que eu pudesse me dedicar a este trabalho e fazê-lo acontecer, sob os processos números 2010/19234-3 e 2012/07109-5. À Capes/PROEX, através do Departamento de Botânica (e através da Dra. Mariana), pelos inúmeros auxílios prestados e ao Dr. Renato de Mello-Silva, por ter aguentado a difícil tarefa de administrar este último recurso por tanto tempo.

À Dra. Mariana Cabral de Oliveira, por tamanha confiança, apoio, incentivo, parceria, paciência... Sei que é difícil ser tão presente, para tantos alunos entre muitas outras atividades e ainda por cima manter o bom humor: sua calma é algo que ainda precisa ser estudado.

Ao Dr. Rafael Riosmena-Rodríguez, porque, além do apoio, determinação, parceria e paciência oferecidos, foi um grande incentivador deste trabalho, inclusive nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pela sua amizade.

Ao Dr. Eurico, eternamente Mestre – mas que não gosta de agradecimentos, desculpe - que me co-orientou de forma informal em mais esta empreitada, me animando sempre que o desafio parecia muito maior que o previsto.

Ao Dr. Paulo A. Horta Jr., pelo aconselhamento desde o início deste trabalho, por ter aberto as portas no Laboratório de Ficologia (UFSC) e no mundo das calcárias.

À Dra. Sílvia M.P.B. Guimarães, pelo incentivo ao trabalho com calcárias articuladas, dispondo-se muitas vezes para discussões acalantadoras.

Ao Dr. Frederico C. Gurgel pela atenção, tanto com a introdução quanto com as discussões quanto aos métodos de agrupamento molecular.

Aos professores da segunda casa, conhecida como LAM, Laboratório de Algas Marinhas do IB-USP: Dra. Estela M. Plastino, Dr. Flávio Berchez, Dra. Mariana C. de Oliveira, Dra. Fungyi Chow e Dra. Valéria Cassano. Pelos anos de convivência, atenção e aprendizado, muito obrigada!

À equipe de técnicos do LAM: Rosário (um pai), Henrique Lauand, Cíntia Oliveira, Carolina Franco, Iago, Andre Nascimento, Willian Oliveira, César Redivo, Mariana Mungoli, André Nakasato. Rosario, você sabe que tem garantido o seu lugar no céu, ou onde quer que seja ali no “tempo do depois”.

Ao pessoal que passou pelo LAM nos últimos 4 anos, contribuindo de maneiras diversas para a construção coletiva: Alexandre Santos, Amanda Medeiros, Ana Carolia Garcia, Andreza Faria, Bruno Vieira, Bruno Sandy, Carol Azevedo, Carol Feijão Ximenes, Cíntia Iha, Dani Ramalho, Donají, Fabiana Marchi, Fabio Nauer, Fernando Sena, Gabriela Lourenço, Karoline Magalhães, Lígia Maria Ayres-Ostrock, Mariana Mungoli, Mariana Silva, Milena Veiga, Natália Guimarães, Nuno Tavares, Rafaela Perez, Talita V. Pinto, Vanessa Urrea.

Ao pessoal do Laboratório de Botánica Marina da Universidad Autónoma de Baja California Sur: Dr. Rafael Riosmena-Rodríguez, Dr. Juan Manuel Lopez Vivas, Dra. Monica Lara Uc, Dr. Jorge M. Lopez Calderón, Josué Sócrates, Laurie Mc Connico, Néstor Robinson, Kenia P. C. Castañeda, Carmen Méndez, Betzabeth MorDáv, Francisco G. Hernandez.

Ao Francisco F. Rivera-Melo (Paco), Sara Melo e Luna pela inesquecível estadia em Camino Real.

Às técnicas do Laboratório de Anatomia do CRIP (La Paz): Carmen e Liliana, pela disposição e prestatividade.

Aos histologistas Dr. Diego Demarco (Lab. de Anatomia Vegetal, IB-USP) e Carlos Augusto Aguilar Cruz (Lab. de Histología, UABCS), pelo apoio prestado, obrigada por compartilharem caridosamente um expertise tão valioso! Também à Aline Nunes e ao Julio Majcher pela mãozinha espontânea durante as primeiras sessões de cortes.

Ao corpo docente do Laboratório de Anatomia Vegetal do IB-USP, pela acolhida: Nanuza Luiza Menezes, Veronica Angyalossy, Gladys Flávia A.M. de Pinna, Gregório Ceccantini e Diego Demarco. E ao corpo técnico pela paciência e prestatividade: Tássia C. dos Santos, Gisele Rodrigues e Irwandro R. Pires.

Ao pessoal do Herbário SPF do IB-USP, por inúmeros auxílios: Abel R. Cangussu, Viviane Jono e Roberta Figueiredo, bem como a curadora da coleção de algas marinhas, Dra. Valéria Cassano. À Dra. Valéria, também agradeço pelas consultas nomenclaturais.

À galera competente da Windive de Iriri, pelos mergulhos mais seguros que eu poderia imaginar: Luiz, Pâmela, Tarcísio, Tainara, Seo César, Erivelto e Cloroaldo. Ao pessoal de Iriri, pelo fornecimento de condições especiais para o trabalho: Dna. Cirlene, Marlon, Jean Paul.

Aos funcionários da secretaria do Depto. de Botânica do IB-USP, os quais prontamente forneceram auxílio às questões funcionais, burocráticas e misteriosas: Norberto, Carlos, Cesário e Danilo.

E da mesma forma ao pessoal da Secretaria de Pós Graduação do IB-USP, Érica, Helder, Cíntia, Shirlene, Lilian e Gilmar.

Aos membros da CCP e da CPG, por cuidarem de todos os pepinos que os alunos por vezes nem tinham conhecimento. Aos representantes discentes de todo este período, em especial ao Bruno Silvestre Lira.

Aos “galerinha” das calcárias, que entre um Workshop e um Congresso, cursos, trabalhos e coletas, alimentaram esse interesse pelas pedrinhas com ou sem genículo: Carlos Eduardo Lagosta, Néstor Robinson, Laurie McConnico, Josué Martínez, Marina Sissini, Maria Carolina Henriques, Luana Coutinho, Samir Khader, Rodrigo Mariath, Alexandre Villas-Bôas, Ricardo Bahia, Jonas de Azevedo, Anja Rösler, Cristina Rebelo, Jazmin Hernandez-Kantún, Viviana Peña, Sophie Martin, além dos maestros Eurico C. Oliveira, Rafael Riosmena, Julio Aguirre, Markes Johnson, Gudveig Baarli, Wendy Nelson, Paulo Horta, Cindy Fernández, Edgar Alquicira, Marcia Figueiredo.

Ao Dr. Pedro Carneiro, pela acolhida para a coleta no Ceará e à Marina Sissini, Paulo Horta e José Barufi, pela de Santa Catarina.

À Carol Ximenes e Dra. Sonia M.B. Pereira pelo material de PE e à Élica A.C. Guedes pelo material de AL.

Ao Bruno Rodrigues Ferreira, o melhor “aluno” e amigo que eu poderia ter ganhado de presente.

Aos amigos que contribuíram continuamente com a formação do contexto discutivo e criativo: Dra. Leila Hayashi, Dra. Luciana Bastos Ferreira, Dra. Daniela Milstein, Dr. José B. Barufi, e especialmente ao Lagosta (Carlos Eduardo Amancio), com o companheirismo de sempre.

Aos amigos que sabem, além de especiais também foram fundamentais para a Tese, pois nunca me deixaram desanimar: Lígia Maria Ayres-Ostrock, Janaína Pires, Fabio Nauer, Julio Majcher, André Faria, Daniel Brito, Tatiana Kawamoto, Cíntia Iha, Felipe Torrano e Priscilla Ferreira.

Às almas caridosas que me auxiliaram quando pensei ter chegado ao fim, vcs tiveram participação especial no fechamento desta Tese: Mariana C. de Oliveira, Lígia Ayres-Ostrock, Fabio Nauer, Janaína Pires e Julio Majcher.

À Fátima, pela alegria que por incontáveis vezes encheu o meio copo vazio.

À família, que mais uma vez me incentivou incondicionalmente, mesmo sem compreender direito por onde estou indo e onde quero parar. Difícil enumerar todos vocês. Mas tomo a liberdade de destacar os meus pais, não preciso listar porquês.

E à vida, que me dá TANTO!

*“Mas pra fazer um samba com beleza é preciso um bocado de tristeza
É preciso um bocado de tristeza, senão não se faz um samba não”*

Baden Powell e Vinicius de Moraes

ÍNDICE GERAL

Resumo	4
Abstract	5
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	6
CAPÍTULO 2 – FERRAMENTAS E METODOLOGIA GERAL	19
COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	19
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES	23
Morfologia	23
Teste da aplicabilidade da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
INFERÊNCIAS MOLECULARES	29
Extração de DNA	29
Amplificação (PCR)	30
Sequenciamento e sequências consenso	31
Matrizes	31
Marcadores moleculares	32
Análises das sequências	36
Análises de agrupamento	36
Taxa de Divergência entre grupos intimamente relacionados	36
<i>Automatic Barcode Gap Discovery</i> (ABGD)	37
<i>Multidimensional Scaling</i> (MDS)	37
<i>Poisson Tree Process</i> (PTP)	37
<i>Statistical Parsimony Network</i> (SPN)	37
Inferências filogenéticas	37
Máxima Verossimilhança (MV)	38
Inferência Bayesiana (IB)	38
Análises dos marcadores moleculares combinados	38
Apresentação das árvores	39
ANÁLISE CONJUNTA DE DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES	39
CAPÍTULO 3 – ESPÉCIES INCRUSTANTES	40
Introdução	40
Objetivos deste capítulo	41
Metodologia específica	42
Morfologia e caracterização das espécies	42
Análises Moleculares	42
Análises de agrupamento para as espécies brasileiras	42
Comparação com dados do Genbank	42
Resultados	45
1. Ferramentas moleculares	45
1.1. Espécies no Brasil	45
Aplicação dos métodos de agrupamento, avaliação dos diferentes marcadores como	
<i>DNA Barcodes</i> e quantificação das espécies presentes	45
Sustentação das espécies através dos diferentes marcadores	45
Comparação do desempenho dos marcadores como <i>DNA Barcodes</i>	53
Comparação com dados do Genbank	56
1.2. Aspectos filogenéticos	64
2. Caracterização morfológica e anatômica das espécies	65
2.1. Chave dicotômica	65
2.2. As principais características para a distinção das espécies	66

i. Características observadas e não informativas	66
ii. Características observadas, porém inconclusivas	66
iii. Características não observadas	67
iv. Características informativas	68
2.3. Descrição morfológica das espécies	70
<i>Lithophyllum atlanticum</i>	70
<i>Lithophyllum corallinae</i>	72
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	74
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	76
<i>Lithophyllum</i> sp. 1	78
<i>Lithophyllum</i> sp. 2	80
<i>Lithophyllum</i> sp. 3	81
<i>Lithophyllum</i> sp. 4	82
3. Distribuição no país	97
3.1. Distribuição na coluna d'água	97
3.2. Distribuição Geográfica	99
Discussão	103
As espécies presentes na costa brasileira - diversidade e nomenclatura	103
Aplicação dos métodos de agrupamento na discriminação das espécies da costa brasileira e avaliação dos diferentes marcadores como <i>DNA Barcodes</i>	104
Aspectos filogenéticos	105
Conclusões	109
CAPÍTULO 4 – AMPHIROA	111
Introdução	111
Objetivos deste capítulo	112
Metodologia específica	113
Morfologia e caracterização das espécies	113
Análises Moleculares	113
Análises de agrupamento para as espécies brasileiras	113
Comparação com dados do Genbank	113
Resultados	116
1. Ferramentas moleculares	116
1.1. Espécies no Brasil	116
Aplicação dos métodos de agrupamento, avaliação dos diferentes marcadores como <i>DNA Barcodes</i> e quantificação das espécies presentes	116
Sustentação das espécies através dos diferentes marcadores	116
Comparação do desempenho dos marcadores como <i>DNA Barcodes</i>	125
Comparação com dados do Genbank	127
1.2. Aspectos filogenéticos	135
2. Caracterização morfológica e anatômica das espécies	136
2.1. Chave dicotômica	136
2.2. As principais características para a distinção das espécies	137
i. Características demasiado subjetivas, sujeitas a uma grande margem de diferença de interpretação dependendo do observador	137
ii. Características observadas e não informativas	137
iii. Características observadas, porém inconclusivas	138
iv. Características não observadas	139
v. Características informativas	140
2.3. Descrição morfológica das espécies	143
Complexo <i>A. beauvoisii</i>	143
Complexo <i>A. fragilissima</i>	145
<i>A. rigida</i>	147
<i>A. vanbosseae</i>	148
<i>Amphiroa</i> sp. 1	149

<i>Amphiroa</i> sp. 2	150
<i>Amphiroa</i> sp. 3	151
<i>Amphiroa</i> sp. 4	152
3. Distribuição no país	163
3.1. Distribuição na coluna d'água	163
3.2. Distribuição Geográfica	166
Discussão	172
As espécies presentes na costa brasileira - diversidade e nomenclatura	172
Aplicação dos métodos de agrupamento na discriminação das espécies da costa brasileira e avaliação dos diferentes marcadores como <i>DNA Barcodes</i>	173
Aspectos filogenéticos	175
Conclusões	176
CAPÍTULO 5 - PAULSILVELLA	177
Apresentação	177
Resumo em Português	178
Artigo	
CONCLUSÕES GERAIS	197
REFERÊNCIAS	199
ANEXO 1 - Amostras e Sequências	209
ANEXO2 - Gráficos e outros resultados obtidos pelos métodos de agrupamento (espécies incrustantes) ..	224
ANEXO 3 - Gráficos e outros resultados obtidos pelos métodos de agrupamento (<i>Amphiroa</i>)	237

Resumo

Lithophylloideae é uma subfamília de algas calcárias que inclui tanto gêneros articulados quanto os não articulados, que por sua vez compreende gêneros incrustantes e um moniliforme. Pela primeira vez a diversidade específica de *Amphiroa*, *Lithophyllum*, *Paulsilvella* e *Titanoderma* para o Brasil é investigada de maneira somatória e comparativa, quanto a uma variedade de aspectos que incluíram os morfológicos/anatômicos, ecológicos e moleculares (incluindo a própria avaliação das ferramentas moleculares e das características taxonomicamente importantes). Encontramos 26 espécies, sendo quinze *Amphiroa*, oito *Lithophyllum*, uma *Paulsilvella* e duas *Titanoderma*: *Amphiroa rigida*, *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3, *Amphiroa* sp. 4, seis espécies para o Complexo *A. fragilissima*, três espécies para o Complexo *A. beauvoisii*, *Lithophyllum atlanticum*, *L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *Lithophyllum* cf. *margaritae*, *Paulsilvella huveorum*, *Titanoderma pustulatum* e *T. prototypum*.

Para a caracterização molecular utilizamos quatro marcadores principais: UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P, atendendo a dois objetivos: a delimitação de espécies e a avaliação destes diferentes marcadores como *DNA Barcodes* para as espécies de Lithophylloideae dentro do contexto da variabilidade encontrada na costa brasileira. Para isto utilizamos cinco métodos de agrupamento: Taxas de Divergência, ABGD, MDS, PTP e SPN. A decisão final quanto à quantidade de espécies presentes é um consenso dos resultados encontrados para todos os marcadores e para todos os métodos de análise. Os casos conflitantes também foram observados quanto aos valores de divergência e de *barcoding gap*. Os quatro marcadores testados são confiáveis para a delimitação de espécies em Lithophylloideae, proporcionando ótimos valores de suporte para as espécies e valores significativos de *barcoding gap*. Apesar disto, dada a possibilidade de usar o *rbcL*-3P também para fins filogenéticos, ressaltamos a aplicabilidade deste marcador, sendo o indicado caso exista a necessidade de se indicar um único marcador como *DNA Barcode* para este grupo de algas. A inferência das relações filogenéticas dentro de Lithophylloideae inclui os primeiros dados moleculares para *Paulsilvella*, através do *psbA*, do *rbcL*-3P e também do SSU rDNA. As análises indicam que *Amphiroa* é monofilético, enquanto que *Lithophyllum* e *Titanoderma* provavelmente são polifiléticos. Adicionalmente, é possível que *Paulsilvella* represente a primeira forma morfológica da subfamília.

A distribuição de *Amphiroa*, *Lithophyllum* e *Titanoderma* ao longo da costa brasileira embasou a discussão quanto à distribuição das macroalgas marinhas bentônicas na costa, adicionando ao cenário o papel das correntes costeiras e do Giro do Atlântico Sul. Os dados moleculares possibilitaram ainda a observação do panorama de ocorrência das 26 espécies de Lithophylloideae quanto a sua ocorrência na coluna d'água (profundidade). Para *Amphiroa* a maior diversidade está no mesolitoral, enquanto que para *Lithophyllum* e *Titanoderma* a maior diversidade se encontra no infralitoral. Oito espécies são restritas ao mesolitoral, enquanto que dez (incluindo *P. huveorum*) são restritas ao infralitoral. Estes fatos chamam a atenção da necessidade de se incluir diferentes técnicas de coleta nos trabalhos de diversidade em Florideophycideae, do contrário podemos negligenciar uma diversidade inexplorada.

Abstract

Lithophylloideae is a subfamily within Corallinaceae including both articulated and non-articulated genera. This work is the first effort to access the specific diversity for *Amphiroa*, *Lithophyllum*, *Paulsilvella* and *Titanoderma* for Brazil based on a sum of morphological anatomical, ecological and molecular data, including also the tools applicability evaluation. From the 26 species found, are *Amphiroa*, eight are *Lithophyllum*, two are *Titanoderma* and one is the first register for *Paulsilvella* for Atlantic waters: *Amphiroa rigida*, *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3, *Amphiroa* sp. 4, six cryptic species for the *A. fragilissima* Complex, three cryptic species for the *A. beauvoisii* Complex, *Lithophyllum atlanticum*, *L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *Lithophyllum* cf. *margaritae*, *Titanoderma pustulatum*, *T. prototypum* and *Paulsilvella huveorum*.

For the molecular characterization four markers were used: UPA, COI-5P, *psbA* and *rbcl*-3P, which have attended to two the delimitation of species and also to the evaluation of these markers as *DNA Barcodes* for the species of Lithophylloideae within the context of variability found on the Brazilian coast. For these two purposes we have applied five clustering methods, based on the Divergence Rates, ABGD, MDS, PTP and SPN. Conflicting cases were also observed for values of barcoding gap. The four molecular markers are reliable for species delimitation within the Lithophylloideae, providing good support values for the species and significant amounts of barcoding gap. Nevertheless, given the possibility of using the *rbcl* marker also for phylogenetic purposes, we emphasize the applicability of *rbcl*-3P as the most appropriate marker, in case there is a need to indicate a single marker as DNA Barcode for this group alga. A phylogenetic inference for the Lithophylloideae included the first sequences for *Paulsilvella* and used *psbA*, *rbcl*-3P and SSU rDNA. We found that *Amphiroa* is monophyletic while *Lithophyllum* and *Titanoderma* are probably polyphyletic. Additionally, *Paulsilvella* may represent the first morphological form of the subfamily.

Amphiroa, *Lithophyllum* and *Titanoderma* distribution along the Brazilian coast have allowed a new discussion concerning the benthic macroalgae distribution to the country, adding two new factors to this scenario: the coastal currents movement and the South Atlantic Gyre. The molecular data have also allowed accessing the preferences according to the depth on the water column for the 26 species. The major diversity for *Amphiroa* grows at the intertidal, while *Lithophyllum* and *Titanoderma* diversity is higher at the subtidal and *Paulsilvella* is restricted to the subtidal. There are eight species restricted to the intertidal and ten restricted to the subtidal (including *P. huveorum*), what addresses to a need to include these both environments on diversity studies for the Florideophycideae otherwise it will imply the existence of an unexplored diversity.

Capítulo 1

Introdução e Objetivos gerais

Em uma comunidade marinha bentônica, seja ela formada por recifes, costões rochosos ou bancos de rodolitos, é possível identificar as algas calcárias como manchas em tons vermelho-rosados crescendo aderidas ao substrato consolidado, às conchas, corais, outras algas e até mesmo aderidas às angiospermas marinhas. As algas calcárias pertencem ao grande grupo das algas vermelhas (Rhodophyta), subclasse Corallinophycideae, um grupo monofilético cujos indivíduos precipitam calcita na parede celular¹, na maioria das vezes por quase todo o talo (Corallinales, Hapalidiales e Sporolithales), ou então de forma mais restrita, apenas em células vegetativas específicas (Rhodogorgonales). A precipitação de carbonato de cálcio também ocorre em outros grupos de macroalgas, mas sempre na forma de aragonita e nunca na parede celular (Littler 1976). No Brasil são encontrados outros grupos de algas marinhas que apresentam algum nível de calcificação: nas algas vermelhas em Liagoraceae (*Liagora* J.V.Lamouroux e *Titanophycus* Huisman, G.W.Saunders & A.R.Sherwood), Peyssonneliaceae (*Peyssonnelia* Decaisne) e Galaxauraceae (Dichotomaria Lamarck; *Galaxaura* J.V.Lamouroux e *Tricleocarpa* Huisman & Borowitzka); nas algas verdes em algumas Bryopsidales (*Halimeda* J.V.Lamouroux, *Udotea* J.V.Lamouroux, *Rhipilia* Kützinger e *Penicillus* Lamarck) e Dasycladaceae (*Neomeris* J.V.Lamouroux); e nas algas pardas em Dictyotaceae (*Padina* Adanson). Entretanto, em nenhum destes talos a calcificação é tão intensa a ponto de torná-los extremamente rígidos e, apesar de serem todas eventualmente referidas como “algas calcárias”, aqui iremos restringir este termo aos talos de Corallinales, Hapalidiales e Sporolithales. Sua classificação será contextualizada mais adiante.

Existe uma ampla variedade de formas do talo entre as algas calcárias, incluindo as geniculadas (ou articuladas/arborescentes), que intercalam porções calcificadas e descalcificadas (chamadas respectivamente de intergeniculos e genículos); além das formas totalmente calcificadas, que crescem como crostas aderidas ao substrato consolidado e neste caso dá-se o nome de hábito incrustante ou crostoso. Em apenas um caso encontramos pequenas formas eretas e não geniculadas, o gênero *Paulsilvella* Woelkerling, Sartoni & Boddi, que apresenta contorno tipicamente moniliforme (Woelkerling *et al.* 2002; Torrano *et al.* 2014). As formas crostosas são importantes na construção e consolidação dos recifes marinhos (Littler & Littler 1984), incluindo os brasileiros (Kikuchi & Leão 1997; Leão 1999), onde são encontradas em tal quantidade que se pode dizer que na costa brasileira existem verdadeiros “recifes de algas” (Figueiredo 2000), e não “recifes de corais”. Estas algas distribuem-se desde a faixa do médio-litoral (ou entremarés), onde são mais frequentes (Johansen 1981), até os recifes mais profundos, sendo o grupo de algas com maior amplitude batimétrica conhecida, já que foram encontradas as formas incrustantes até os 268 m de profundidade (Littler *et al.* 1985).

Outra peculiaridade deste grupo de algas é a capacidade de formar os bancos de rodolitos. Os rodolitos são formas livres que se originam de fragmentos de coralináceas incrustantes pré-existentes, ou mesmo com o

¹ Além da calcita na parede celular, recentemente se observou a presença de magnesita e/ou dolomita nos espaços celulares, além do preenchimento de conceptáculos vazios com aragonita e dolomita (Nash *et al.* 2011). A atividade de microalgas endolíticas nas camadas abaixo da superfície das algas calcárias (*core*) também é fundamental para o aumento proporcional da quantidade de dolomita nas crostas calcárias, uma descoberta que pode indicar a resistência dos recifes aos reflexos do efeito estufa e da acidificação dos oceanos (Diaz-Pulido *et al.* 2014).

desenvolvimento de esporos sobre fragmentos soltos do substrato (Bosence 1983). Os bancos de rodolitos têm grande importância ecológica por acrescentarem complexidade estrutural à comunidade bentônica, abrigando uma reconhecida diversidade de organismos, incluindo outras algas, invertebrados e peixes (p. ex. Barbera *et al.* 2003; Figueiredo *et al.* 2007; Foster *et al.*, 1997; Lavrado 2006; Littler & Littler 2008; Steller & Foster, 1995; Steller *et al.* 2003). Esta grande diversidade de organismos associados aos bancos inclui espécies de interesse econômico, que usam os bancos de rodolitos como refúgio em rotas de circulação ou para reprodução e reforçam que o argumento econômico também deveria ser considerado para a preservação destes ambientes. Os bancos de rodolitos estão amplamente distribuídos por todo o planeta (**Figura I.1**), das áreas tropicais às polares (Foster 2001), e apesar de sua importância ecológica e econômica, são pouco conhecidos fora do meio científico.

A maior extensão destes bancos está justamente na costa brasileira. Sua distribuição é descontínua desde a baía de São Marcos (MA) até a ilha do Arvoredo (SC), havendo uma concentração bastante relevante na região do alargamento da plataforma continental, que vai do sul da Bahia ao norte do Espírito Santo (Milliman & Amaral 1974; Berchez *et al.* 2009; **Figura I.1**). O potencial econômico destes bancos inclui principalmente a exploração da estrutura calcária para moagem e aplicação do processado como corretor de solos ácidos, como fertilizante ou ainda como aditivo à ração animal (Chapman 1970; Kempf 1980; Oliveira 1997). Apesar disto, sabe-se que os bancos de rodolitos abrigam uma grande diversidade de organismos que produzem compostos de interesse farmacêutico (antioxidantes, imunológicos, antifúngicos, antitumorais, antibióticos, antiinflamatórios), de forma que este tipo de ambiente é um campo vivo para novas pesquisas de inovação na área da bioprospecção (revisto em Amado-Filho & Pereira-Filho 2012). Desta forma, a atividade de exploração desses bancos deveria ser realizada com parcimônia e somente após estudos criteriosos que minimizassem os danos à comunidade natural (Oliveira, 1981). Políticas públicas de conservação para bancos de rodolitos são emergenciais (Amado-Filho & Pereira-Filho 2012). A comunidade científica, apesar de inicialmente ter chamado a atenção da sociedade para o potencial dos bancos como fonte para a extração de calcário, atualmente não vê a sustentabilidade das atividades de extração destes bancos, já que somente as primeiras camadas de rodolito são vivas. Outro fator importante é que estes organismos crescem lentamente (IMPACT 1998), de forma que é impraticável a recuperação da comunidade destes bancos, quando retirada para atender à demanda do uso humano. Outras atividades comerciais também são prejudiciais aos bancos de rodolitos (revistos em Riosmena *et al.* 2010), como a pesca através de dragagem e a constante ancoragem de embarcações. Felizmente, já existem alguns esforços implementados para a preservação deste tipo de ambiente marinho, como a proposta de proteção integral deste tipo de ambiente como “áreas especiais para conservação” na Europa e no Reino Unido. Outra importante iniciativa se vê na região da Baixa Califórnia (México), onde os fundos de rodolitos são reconhecidos como ambientes relevantes para propostas de criação de áreas protegidas (Riosmena *et al.* 2010). No Brasil existe a regulamentação para a exploração econômica de algas calcárias (IN número 89, de 2 de Fevereiro de 2006). Apesar disto, o limite previsto para exploração (18 ton/empresa/ano) já foi questionado (Simon *et al.* 2007). Infelizmente não temos outras legislações que garantam a preservação dos bancos frente às outras atividades e condições que prejudicam a existência deste tipo de comunidade marinha (l.c.).

Figura I.1. Levantamento da distribuição de bancos de rodolitos no mundo (pontos e linhas negras). Adaptado de Foster (2001), corrigindo a faixa de ocorrência na costa brasileira segundo Berchez *et al.* 2009. O conhecimento atual revela que estes bancos distribuem-se por áreas ainda mais amplas que estas estimadas em 2001 (R. Riosmena-Rodríguez, com pes.).

A taxonomia das algas calcárias é trabalhosa e tem sofrido inúmeras modificações desde a “descoberta” deste grupo de organismos. A trajetória completa da evolução do estudo destes organismos foi extensamente revista por Moura (2000) e por Horta (2002), de forma que não vamos retomá-la aqui. Apesar disto, vale ressaltar que, devido às formas rígidas destas algas, principalmente das formas crostosas, antes do século XVIII a humanidade ainda não compreendia a natureza deste tipo de organismo. As algas calcárias passaram primeiramente como estalactites inorgânicas, em seguida por corais, sendo ainda chamadas de “litófitas” (*lito*=pedra e *fitos*=planta) numa tentativa de compreensão de sua natureza. Por fim, Schweigger (1819) e Philippi (1837) reconhecem que não se tratam de animais, mas sim de plantas. Há poucas décadas estas algas foram reconhecidas como um grupo à parte, recebendo sua própria Ordem, Corallinales (Silva & Johansen 1986), de onde foram desmembradas, posteriormente, as demais Ordens conforme as reconhecemos atualmente.

Cabe ainda ressaltar a instabilidade das características que foram utilizadas na delimitação de famílias e subfamílias das algas calcárias nas últimas décadas, já que se trata de um grupo de indivíduos em que a convergência morfológica entre subgrupos não relacionados é tão comum a ponto de ser regra. Ao mesmo tempo a incorporação de novas técnicas de observação, como a microscopia eletrônica de varredura (ou MEV), tem proporcionado avanços na busca e na interpretação das características anatômicas dos talos (Garbary & Velkamp 1980; Worlkerling 1988; Riosmena-Rodríguez *et al.* 1999). A MEV possibilita a tomada de imagens em alta resolução com aparência tridimensional (maior profundidade de foco), sendo útil para a análise da superfície ou de detalhes anatômicos das algas calcárias, o que é bastante útil, pois muitas das características anatômicas são de ordem celular.

Atualmente reconhecemos quatro Ordens para as algas calcárias: Corallinales, Hapalidiales, Sporolithales e Rhodogorgonales (Nelson *et al.* 2015; **Figura I.2**). Essas quatro ordens formam um agrupamento monofilético definido como a sub-classe Corallinophycideae que se distinguem das demais Florideophyceae tanto por evidências moleculares, quanto pela especificidade dos *pit-plugs* que ligam as comunicações celulares. Em Corallinophycideae se veem duas camadas de cobertura (*cap layers*) nos *pit-plugs*, sendo que a última camada é engrossada na forma de um domo, característica que não é exclusiva dos membros do grupo, mas comum a todos eles (Pueschel & Cole 1982; Le Gall & Saunders 2007; **Figura I.3**). Nestes grupos também se observa a alternância de duas gerações isomórficas (gametofítica e tetrasporofítica) com uma terceira que é parasita da gametofítica (a geração carposporofítica), o que é comum em Florideophyceae (**Figura I.4**). É justamente na fase tetrasporofítica onde podemos distinguir as três Ordens com base no aspecto geral das estruturas reprodutivas. Corallinales, Hapalidiales e Sporolithales, onde encontramos os talos totalmente calcificados, distinguem-se umas das outras através das mesmas características que tipificam cada uma de suas famílias: Corallinaceae, com tetrasporângios zonados produzidos em conceptáculos uniporados e sem tampão apical; Hapalidaceae, com tetrassporângios zonados produzidos em conceptáculos multiporados com tampão apical; e Sporolithaceae, com tetrasporângios cruciados dentro de compartimentos calcificados (com tampão apical) agrupados em soros (Nelson *et al.* 2015; **Figuras I.4 e I.5**). Os conceptáculos da geração tetrasporofítica são estruturas chave já que neles observamos a maior parte das características taxonomicamente importantes para a distinção das espécies.

Corallinaceae engloba sete subfamílias (Kato *et al.* 2011). Lithophylloideae, o objeto deste estudo, é uma delas. Este nome foi aplicado através de duas propostas distintas ao longo da história. O conceito anterior seguia Johansen (1969) e considerava que tanto a ausência ou presença do genículo, quanto o tipo de conexão entre os filamentos (conexões secundárias e fusões, **Figura I.6**), deveriam ser tomadas como características filogenéticas relevantes (e com o mesmo peso); nesta proposta as formas articuladas (*Amphiroa* J.V.Lamouroux e *Lithothrix* J.E.Gray) estavam em uma subfamília à parte, Amphiroideae Johansen. Já Cabioch (1972) agrupou em Lithophylloideae tanto os gêneros articulados quanto os não articulados, dando mais ênfase ao fato de que nestes dois grupos as abundantes ligações celulares secundárias (mas nunca as fusões) os diferenciavam das demais algas coralinas – com exceção de duas espécies de *Lithophyllum* Philippi, descritas por Suneson (1943) que apresentariam raras fusões celulares, o que nunca mais foi observado. A proposta de Cabioch (1972) foi confirmada por Bailey (1999) através dos marcadores moleculares e definiu-se o conceito aceito desde então. Neste trabalho também seguimos a proposta de Cabioch (1972), acrescido das modificações por Bailey (1999) e Woelkerling *et al.* (2002).

Figura I.2. Mais recente filogenia das para as quatro Ordens (caixas cinza) dentro de Corallinophycidae a partir da utilização de quatro marcadores combinados: *psaA*, *psbA*, *rbcl* e SSU rDNA. Retirado de Nelson *et al.* (2015; pág. 5, Fig. 1).

Lithophylloideae é a única subfamília onde encontramos organismos de todas as três formas morfológicas conhecidas para as algas calcárias: as articuladas, as incrustantes e a segmentada. O reconhecimento de gêneros no grupo passou e ainda passa por modificações. Hoje são válidos seis gêneros sendo dois articulados, *Amphiroa* e *Lithothrix*, três incrustantes, *Ezo Adey*, Masaki & Akiokae, *Lithophyllum*, *Titanoderma* Nägeli e um ereto, segmentado e de contorno moniliforme, *Paulsilvella* (Woelkerling *et al.* 2002; Guiry & Guiry 2015). Três são bastante comuns na costa brasileira: *Amphiroa*, *Lithophyllum* e *Titanoderma* – entretanto, esse último gênero não é aceito por alguns autores, quando suas espécies passam a ser referidas como *Lithophyllum* (e.g. em Henriques *et al.* 2008 e Villas-Bôas *et al.* 2009). O quarto gênero, *Paulsilvella*, foi encontrado no país pela primeira vez apenas no último ano (**Capítulo 5**; Torrano-Silva *et al.* 2014), o que foi uma surpresa, pois estas algas extremamente inconspícuas eram conhecidas apenas para a região do chifre da África, além de fósseis do mar Mediterrâneo (Braga *et al.* 2009) e das ilhas Maurício (Woelkerling *et al.* 2002).

Figura I.3. Exemplo da variação dos tipos de *pit-plugs* em Rhodophyta, sendo caracteres taxonomicamente significativos. *Clathromorphum* ilustra a existência de duas capas (*cap-layers*) em forma de domo, comum a todos os membros de Corallinophycideae. Ca: capa do plug (*plug cap*). Co: porção central do plug (*plug core*). P: plasmalema. W: parede celular (*cell wall*). 1: capa interna. 2: capa externa. Retirado de Pueschel & Cole 1982.

Figura I.4. Esquema para o ciclo de vida nas três Ordens com alto grau de calcificação em Corallinophycideae. Adaptado de Farr *et al.* 2009, de acordo com a classificação atual de Nelson *et al.* 2015.

Figura 1.5. Caracterização esquemática do conceptáculo tetrasporofítico (Corallinales e Hapalidaceae) e dos compartimentos calcificados (Sporolithaceae), adaptado de Farr *et al.* 2009. OBS: outro tipo de clivagem também pode ocorrer nos tetrasporângios de Corallinales e Sporolithales, o que não ilustramos por não interferirem na identificação das três Ordens aqui apresentadas e também por serem casos à parte.

Figura 1.6. Tipos de ligação celular encontradas na família, sendo: unicamente através de ligações primárias, ou *pit plugs* (à esquerda); com ligações adicionais do tipo secundárias (centro); ou com ligações adicionais do tipo fusão (à direita). Em alguns grupos as conexões secundárias e as fusões ocorrem simultaneamente.

As formas incrustantes de Lithophylloideae que crescem no Brasil, *Lithophyllum* e *Titanoderma*, assemelham-se muito às outras calcárias incrustantes quando considerada apenas a morfologia geral. A diferenciação é possível através dos aspectos anatômicos, sendo que o conjunto das seguintes características define o grupo: conceptáculos tetrasporangiais uniporados que produzem tetrasporângios zonados; conexões celulares secundárias abundantes, sendo a única forma de conexão entre células de filamentos adjacentes (ou seja, ausência de fusões celulares); células epiteliais mostram contorno achatado ou arredondado em cortes transversais do talo (nunca trapezoidal - ou *flared*, em inglês); comprimento da primeira célula subepitelial (localizada logo abaixo da célula epitelial) igual ou maior que o a segunda célula subepitelial; filamentos espermatangiais unisseriados, restritos à porção do piso do conceptáculo masculino; filamentos do gonimoblasto (na geração carposporofítica) multicelulares, partindo de uma célula central de fusão (Harvey & Woelkerling 2007). Conhecemos hoje 132 e 9 espécies válidas para *Lithophyllum* e *Titanoderma* respectivamente, distribuídas em oceanos tropicais e subtropicais (Guiry & Guiry 2015).

Os gêneros geniculados só ocorrem dentro de Corallinales, sendo que *Amphiroa* pode ser distinguida dos demais gêneros de calcárias articuladas (de Corallinoideae e Metagoniolithoideae) pelo seguinte conjunto de características: presença de duas ou mais fileiras de células na região do genículo (uma fileira em raros casos); a alternância de fileiras de células curtas com fileiras de células longas nos intergenículos; a abundância de conexões celulares secundárias entre células de filamentos adjacentes, no seu terço superior; o desenvolvimento cortical dos conceptáculos, imersos no próprio córtex ou então projetados acima deste (Woelkerling *et al.* 2002). São reconhecidas 53 espécies neste gênero (Guiry & Guiry 2015), também distribuídas em oceanos tropicais e subtropicais.

Dentro de Lithophylloideae, 14 espécies (além de uma variedade) já haviam sido registradas para o Brasil: *Amphiroa anastomosans* Weber-van Bosse, *Amphiroa* cf. *anceps* (Lamarck) Decaisne, *A. beauvoisii* J.V.Lamouroux, *A. fragilissima* J.V.Lamouroux, *A. rigida* J.V.Lamouroux, *A. vanbosseae* Me.Lemoine², *Lithophyllum atlanticum* T.Vieira-Pinto, M.C.Oliveira & P.A.Horta, *L. corallinae* (P.Crouan & H.Crouan) Heydrich, *L. depressum* Villas-Boas, Figueiredo & Riosmena-Rodriguez, *L. johansenii* Woelkerling & Campbell, *L. margaritae* (Hartot) Heydrich, *L. stictaeforme* (Areschoug) Hauck, *Titanoderma prototypum* (Foslie) Woelkerling, Y.M.Chamberlain & P.C.Silva, e *T. pustulatum* (J.V.Lamouroux) Nägeli. Para referências consultar o **Quadro 1**, onde também está o histórico do estudo do grupo no país, bem como o conhecimento anterior da distribuição dos táxons específicos (**Figura 1.7**).

Para *Amphiroa*, até recentemente, era comum que a distinção de espécies fosse baseada nos aspectos vegetativos dos talos, fossem morfológicos (dimensão e formato dos intergenículos, presença de genículos entumecidos ou ainda de anastomoses entre ramos vizinhos) ou anatômicos (arranjo das células do genículo e do intergenículo). Entretanto, foram observadas uma série de variações morfológicas frente a diferentes condições ambientais para algumas das espécies, o que dificulta a identificação (Moura, 2000). Adicionalmente, é notável que as características associadas à anatomia do conceptáculo tetrasporangial não foram incluídas na taxonomia de *Amphiroa*, o que não faz sentido, uma vez que se provou que este gênero está inserido em um grupo onde predominam as formas incrustantes (Corallinales), para as quais a caracterização desta estrutura é muito importante (Bailey 1999). Isto certamente subestimou o conhecimento da diversidade em *Amphiroa*, de forma que a anatomia dos conceptáculos tetrasporangiais deve obrigatoriamente ser incluída nos trabalhos atuais com exemplares deste gênero (Harvey *et al.* 2009).

A caracterização dos gêneros e das espécies de Lithophylloideae deve portanto incluir a observação conjunta de um grupo de características anatômicas. O conjunto de características escolhidas para a diferenciação das espécies não é constante entre as distintas referências, porém as mais comuns, somadas aos esforços mais recentes, incluem: a produção ou não de ramos geniculados; a organização do hipotalo da porção incrustante do talo (dímera ou monômera, principalmente nas regiões marginais; a posição do conceptáculo tetrasporangial em relação à superfície do talo (se saliente, raso ou afundado); as dimensões do conceptáculo (absolutas e em número de células); a existência ou não de células alongadas ou papiliformes ao longo do canal e do poro do conceptáculo; a existência de células arredondadas projetando-se ou obstruindo o poro do conceptáculo; entre outros aspectos (e.g. Riosmena-Rodríguez *et al.* 1999; Woelkerling & Campbell 1992).

Mesmo existindo estas características anatômicas, estas podem se manifestar de maneira bastante sutil, ou então ser susceptíveis a vieses de interpretação. Além disto, ainda não se tem certeza da validade taxonômica de muitas delas. Existe uma grande quantidade de publicações que discutem a validade ou não de gêneros que

² *A. vanbosseae* foi referida como *A. tribulus* (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux para a região de Abrolhos (Figueiredo 2005).

foram criados com base em características anatômicas que se mostraram variáveis em algum momento. Desta forma, é indiscutível a necessidade de revisão dessas características taxonômicas deste grupo de algas, incluindo a investigação molecular de maneira combinada à morfológica, para a compreensão real do cenário da diversidade destes organismos, além de orientar a observação anatômica (Bittner *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2015; entre outros).

Vimos que as estruturas reprodutivas têm participação importante no processo de identificação deste grupo de algas. De fato, a maior parte das características que definem as espécies está na observação da anatomia do conceptáculo da geração tetrasporófitica (Farr *et al.*, 2009). Apesar disto, estes conceptáculos não estão disponíveis em uma variedade de situações, seja em talos juvenis, em indivíduos desenvolvidos sob condições que não favoreçam a reprodução sexuada, no caso da disponibilidade de espécimes demasiadamente fragmentados, ou ainda quando é necessária a identificação rápida de uma grande quantidade de material em pouco tempo. Nestes casos em que as características anatômicas dos espécimes não podem ser observadas, a análise de marcadores moleculares pode ser a única saída, o que justifica o incremento contínuo do uso desta ferramenta em Corallinophycidae. Aí também se contextualiza a proposta de **DNA Barcode**, nome que remete ao sistema de código de barras usado em produtos manufaturados (Stoeckle 2003). Este método compara sequências específicas, curtas e de obtenção relativamente simples, depositadas em bancos de dados de livre acesso, como o BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) e o Genbank (Benson *et al.* 2003), o mais completo e portanto o mais utilizado. Esse sistema é amplamente utilizado com animais e foi proposto para as algas vermelhas por Saunders (2005).

As técnicas moleculares têm propiciado um crescente avanço no conhecimento da diversidade das algas calcárias nas últimas duas décadas, muitas vezes confirmando os antigos paradigmas baseados em dados anatômicos, mas também trazendo novidades em todos os níveis de classificação. No contexto da diversidade de espécies, presenciamos o reconhecimento de espécies crípticas no que antes se reconhecia como sendo uma só (como é o caso de *Mesophyllum erubescens*, Sissini *et al.* 2014). No campo da filogenia, temos vivenciado grandes alterações na organização e classificação das algas coralináceas, com a consequente redução dos grupos incluídos em Corallinales, que era a única ordem proposta para as algas com intenso grau de calcificação em Rhodophyta. Vimos, nos últimos doze anos, o reconhecimento de uma nova família, Hapalidiaceae (Harvey *et al.* 2003), além de sua segregação para uma nova Ordem, Hapalidiales (Nelson *et al.* 2015); também vimos a elevação de Sporolithaceae a uma Ordem própria (Le Gall *et al.* 2010).

Em uma escala menor, na subfamília Lithophylloideae o impasse se constitui na dificuldade em se delimitar diferentes linhagens ou gêneros. As relações entre os gêneros desta subfamília começaram a ser discutidas com argumentos moleculares, com a inclusão de uma quantidade razoável de espécimes na análise de Bailey e Chapman (1998), que concluíram que os táxons geniculados (*Amphiroa* e *Lithothrix*) formavam um grupo monofilético, ao passo em que *Lithophyllum* seria seu grupo irmão, posicionado na base deste grupo. O quadro mudou quando Bailey (1999) incluiu a sequência de *Titanoderma* na análise, que então se agrupou com *Amphiroa*, e não com *Lithophyllum* - ao passo em que *Lithophyllum* agrupou-se com *Lithothrix*. Isto colocou abaixo a hipótese de que o genículo teria surgido uma única vez dentro dos indivíduos com hábito incrustante de Lithophylloideae: na realidade ele teria surgido ao menos duas vezes ao longo da evolução, o que foi suportado por evidências ontogenéticas com a comparação das células do genículo de *Amphiroa* e de *Lithothrix*. Outras formas de agrupamento dentro de Lithophylloideae surgiram com a adição de mais amostras à matriz de análise, como em 2003, quando dois trabalhos (Harvey *et al.* e Vidal *et al.*) apontam um grupo formado por *Amphiroa*, *Titanoderma* e agora também *Lithothrix*, enquanto que *Lithophyllum* se posiciona como clado irmão dos demais.

Além da relação entre os gêneros em Lithophylloideae, a própria validade de alguns deles vem sido discutida após a inclusão da biologia molecular como ferramenta na taxonomia do grupo. Como exemplo, Huguey *et al.* (2008) encontram pelo menos duas linhagens distintas para o gênero *Lithophyllum*. Dados adicionais também indicam a existência de grupos distintos de *Amphiroa*, com o posicionamento de diferentes espécimes junto a clados diferentes de *Lithophyllum* ou mesmo junto a espécies de *Titanoderma* - sugerindo a possibilidade de *Amphiroa* também não se tratar de um grupo monofilético (R. Riosmena-Rodríguez e E.F. Rosas-Alquicira, com. pess.).

Apesar de todas estas considerações, desde os primeiros estudos moleculares em Corallinales confirma-se que Lithophylloideae é de fato um grupo monofilético (figura 1.2; Bailey & Chapman 1996; Saunders & Bailey 1997; Bailey & Chapman 1998; Vidal *et al.* 2003; Harvey *et al.* 2003; Bailey *et al.* 2004; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011; Kato *et al.* 2011).

Quadro 1. Histórico e a atualidade do conhecimento do grupo no país

O estudo das coralináceas incrustantes no país se iniciou com a citação ou breve descrição de algumas espécies como parte de inventários da flora por pesquisadores estrangeiros como Harvey (1847), Martens (1870), Dickie (1874b), Howe (1928) e Taylor (1931; 1960). O primeiro estudo taxonômico específico para as formas incrustantes foi feito por Yamaguishi-Tomita (1976), trabalhando com *Sporolithon*, merecendo ser mencionado pelo pioneirismo. Oliveira (1977) incluiu as algas coralináceas na primeira grande revisão da flora de macroalgas marinhas do país, encontrando 18 espécies até então - uma única em Lithophylloideae. Mais tarde, o avanço dos estudos de algas incrustantes pelo mundo e a assimilação destas práticas no país trouxeram a um grande avanço na área: Moura *et al.* (1997) reviram a metodologia empregada até então em trabalhos brasileiros e descreveram uma metodologia para obtenção de cortes histológicos de qualidade a partir de coloração com toluidina O; Horta (2000) apresentou seis Lithophylloideae para as regiões sul e sudeste do país, revendo em trabalho posterior a metodologia empregada para a identificação de espécies calcárias não geniculadas (Horta 2002); Nunes *et al.* (2008) registraram três espécies incrustantes para a Bahia, sendo uma de *Lithophyllum*; Henriques *et al.* (2008) descreveram 4 espécies a partir de material coletado em profundidade no Espírito Santo durante o projeto REVIZEE, sendo uma de *Titanoderma*; Figueiredo & Steneck (2002), Figueiredo *et al.* (2008) e Tâmega & Figueiredo (2007) apresentaram em conjunto 12 espécies para a região de Abrolhos, sendo um *Lithophyllum*; Guerardi & Bosence (2001) e Villaça *et al.* (2010) incluíram, conjuntamente, 5 espécies para o Atol das Rocas, incluindo uma não identificada para *Lithophyllum*; Villas-Bôas (2008) e Villas-Bôas *et al.* (2009) investigaram quatro espécies de *Lithophyllum* formadoras de rodolito no Espírito Santo, três delas sendo primeiro registro para a costa brasileira e a quarta representando uma nova espécie para a ciência, *L. depressum* Villas-Boas, Figueiredo & Riosmena-Rodríguez; no mesmo trabalho, os autores concluíram que os bancos de rodolito brasileiros são mais diversos em espécies de *Lithophyllum* que qualquer outra área do mundo. Muitas outras publicações incluem a citação de grupos incrustantes, centrando-se entretanto em aspectos ecológicos e não taxonômicos, como Figueiredo (1997; 2000), Figueiredo *et al.* (2007), Tâmega & Figueiredo (2005), Villas-Bôas (2004), Villas-Bôas *et al.* (2005), Amado-Filho *et al.* (2007; 2010a; 2010b), Horta *et al.* (2008), Berchez *et al.* (2009), Riul *et al.* (2009) e Bahia *et al.* (2010). O progresso no conhecimento da diversidade das algas calcárias no país tem sido crescente e os últimos trabalhos que incluíram incrustantes de Lithophylloideae são: Carro *et al.* (2014) com nove espécies para o Norte da Bahia (uma de *Lithophyllum*), Henriques *et al.* (2014) em porções da plataforma continental da BA, ES e SP (com dois *Lithophyllum* e uma *Titanoderma*) e Vieira-Pinto *et al.* (2014) para o Sul do Brasil com dois *Lithophyllum*, incluindo *L. atlanticum* sp. nov.

As formas articuladas, conforme já comentado, foram tradicionalmente estudadas e classificadas de maneira distinta das incrustantes. Joly (1957) incluiu a descrição de calcárias articuladas em seu levantamento de flora para a região da baía de Santos (SP), bem como Taylor (1960) durante a descrição dos componentes da flora da costa Leste tropical e subtropical das Américas. Inúmeros outros trabalhos com o inventário da flora marinha que surgiram posteriormente acabaram por citar algumas espécies de calcárias geniculadas. Partiu-se de 16 espécies no trabalho de Oliveira (1977), quando o autor revisou a composição da flora da costa brasileira, incluindo todos os grupos de macroalgas marinhas. Trabalhos posteriores tratando da taxonomia deste grupo incluem Piqué (1984) para o Estado de São Paulo, Moura (1992) para o Rio Grande do Norte e Moura & Guimarães (2002) que fizeram uma adição a *Amphiroa*. Moura & Guimarães (2005) reviram as espécies de *Amphiroa* da costa brasileira, sendo o trabalho mais atualizado para o gênero até o momento. As formas geniculadas em geral receberam atenção especial na monografia de Moura (2000), que incluiu todos os gêneros encontrados no país. Duas espécies já foram descritas a partir de material brasileiro: *Amphiroa brasiliiana* (Decaisne, 1842) e *A. variabilis* (Harvey, 1849, apud Moura, 2000), mas nenhuma é aceita atualmente.

A **Figura 1.7** sumariza e localiza as espécies de Lithophylloideae como eram conhecidas para a costa brasileira anteriormente à apresentação desta Tese (não incluímos “variedades” e “formas”). O fato de não existirem registros para além do Norte do Ceará se deve à escassez de substrato consolidado nesta porção da costa aliado à influência da descarga de sedimentos da foz do rio Amazonas, resultando na baixa salinidade e na elevada turbidez da água, conforme descrito por Oliveira (1977), o que acabam dificultando sobremaneira o crescimento de muitas algas, incluindo as coralináceas. Seguindo a tendência do que é visto para o inventário conjunto de todas as macroalgas marinhas do país (Oliveira 1977), o Estado com maior registro de espécies é o Espírito Santo (11 espécies), onde

(continuação) Quadro 1. Histórico e a atualidade do conhecimento do grupo no país

onde encontramos todas as seis espécies de *Amphiroa* para a costa, além de espécies com hábito incrustante incomuns para os outros Estados e porções insulares oceânicas.

Amphiroa

- A** *A. anastomosans*
- cA** *A. cf. anceps*
- B** *A. beauvoisii*
- F** *A. fragilissima*
- R** *A. rigida*
- V** *A. vanbosseae/tribulus*

Lithophyllum

- A** *L. atlanticum*
- Cr** *L. corallinae*
- D** *L. depressum*
- J** *L. johansenii*
- M** *L. margaritae*
- S** *L. stictaeforme*
- sp** *L. sp.*

Titanoderma

- Pr** *T. prototypum*
- Pu** *T. pustulatum*

Figura 1.7. Conhecimento prévio sobre a distribuição das espécies de Lithophylloideae na costa brasileira. Fontes: Amado-Filho *et al.* (2007; 2010a; 2010b; 2012b), Bahia *et al.* (2010), Berchez *et al.* (2009), Costa *et al.* (2014); Horta (2000; 2002; 2008), Figueiredo (2006), Figueiredo & Steneck (2002), Figueiredo *et al.* (2004; 2008a; 2008b), Gherardi & Bosence (2001), Henriques *et al.* (2008; 2014), Mariath *et al.* (2008), Moura (2000), Nunes & Guimarães (2002), Nunes *et al.* (2008), Oliveira (1977), Pascelli *et al.* (2013), Riul *et al.* (2009), Silva (2010), Tâmega & Figueiredo (2005; 2007), Vieira-Pinto *et al.* 2014; Villaça *et al.* (2006; 2010), Villas-Bôas *et al.* (2009; 2014).

Com esta Tese pretendemos incrementar o conhecimento do grupo das Corallinales brasileiras através de estudo comparativo, taxonômico e filogenético, dos taxa compreendidos em Lithophylloideae (*Amphiroa*, *Lithophyllum*, *Titanoderma* e mais recentemente *Paulsilvella*) através de investigações morfológicas, anatômicas e moleculares, utilizando cinco marcadores: um nuclear (SSU rDNA), três plastidiais (*psbA*, *rbcl* e UPA) e um mitocondrial (COI-5P). As técnicas moleculares utilizadas também passaram por intensa revisão e aperfeiçoamento, desde a etapa de extração do DNA até o uso de *DNA Barcodes* e a inferência filogenética.

OBJETIVOS

- Investigar a diversidade de espécies de Lithophylloideae da costa brasileira, incluindo aspectos modernos da taxonomia no grupo através da combinação dos métodos morfológicos/anatômicos e moleculares.
- Avaliar a aplicação de distintos marcadores como *DNA Barcodes* junto às Lithophylloideae brasileiras.
- Com a associação dos dados aqui produzidos aos disponíveis nos bancos públicos de dados moleculares, inferir as relações filogenéticas dentro de Lithophylloideae.

Capítulo 2

Ferramentas e Metodologia geral

COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Realizamos um intenso esforço de amostragem, baseado em 17 saídas de campo que incluíram 66 localidades da costa brasileira, buscando representar toda a diversidade de ecossistemas (epífitos, epizoóicos, epilíticos e de vida livre), incluindo as porções de meso e de infralitoral através de mergulho livre ou SCUBA (**Tabela II.1**). Adicionalmente, uma equipe de colaboradores disponibilizou amostras adicionais (**Anexo 1, Tabela 2**). No total estão incluídas 69 localidades distribuídas do Maranhão a Santa Catarina, de forma que este estudo inclui uma parcela representativa da costa do país.

O fluxograma abaixo (**Figura II.1**) mostra os principais passos desta Tese . O detalhamento das etapas de coleta, obtenção de dados e análise vêm a seguir.

Figura II.1. As vertentes metodológicas deste trabalho.

Selecionamos as estações de coleta levando em conta os seguintes aspectos: i. diversidade de ambientes *i.e.* costão rochoso, bancos de rodolitos, recifes arenosos e biogênicos ⁽¹⁾; ii. distribuição latitudinal ao longo da costa brasileira; iii. as distintas comunidades encontradas nas zonas entremarés e de infralitoral (através de *snorkeling* ou *SCUBA*). Em campo identificamos os indivíduos de hábito articulado, de vida livre (rodolitos) ou incrustante (epilíticos e epizoóicos), incluindo toda a variedade morfológica encontrada (cor, superfície, textura e forma de crescimento), crescendo em microambientes distintos de um mesmo local, incluindo possíveis fases distintas de ciclo de vida (Steller *et al.* 2007). Uma atenção especial é necessária para a retirada dos indivíduos incrustantes (que não formam rodolitos) e geniculados (que por sua vez também crescem a partir de uma base incrustante). Com martelo e cinzel retiramos cuidadosamente os espécimes junto de sua porção basal, sempre que possível incluindo um fragmento do substrato, garantindo a preservação da face abaxial das crostas (ou seja, o hipotalo), que contém parte das características utilizadas na descrição das espécies. Os dados de campo incluíram a localização georreferenciada, o tipo de substrato e a profundidade na coluna d'água.

Todas as amostras passaram por observações iniciais quanto sua morfologia geral, sendo observadas sob lupa unilocular ou estereomicroscópio antes da fragmentação, a fim de se identificar corretamente a extensão de cada indivíduo e registrar a presença de epífitos. De cada indivíduo selecionamos um fragmento para a extração de DNA, preservado em sílica-gel (destinado às análises moleculares). O restante de cada indivíduo foi preservado em formalina diluída em água do mar à concentração de 4% (reservado para os estudos anatômicos). No caso da impossibilidade de fazer esta triagem em campo recorremos à preservação temporária dos indivíduos inteiros em etanol 70-80%, passando pelo processo de seleção dos fragmentos posteriormente no laboratório.

¹ indivíduos epífitos foram coletados mas não chegaram a ser incluídos neste trabalho. Devido a questões de contaminação com o DNA da alga sobre as quais estão crescendo, amostras deste tipo requerem abordagens particulares para triagem e obtenção dos dados moleculares.

No laboratório, todas as amostras de hábito incrustante passaram por um segundo processo de triagem. Pequenos fragmentos foram descalcificados em HNO_3 (0,6M), seccionados manualmente, corados com azul de anilina (acidificada com HCl 1N), montados em lâmina histológica e observados ao microscópio, buscando-se as amostras com abundância de conexões secundárias e ausência de fusões celulares (Harvey *et al.* 2005; Farr *et al.* 2009). A triagem para *Paulsilvella*, que cresce como talos diminutos que se confundem com os ramos do hospedeiro, consistiu em uma busca bastante minuciosa sob estereomicroscópio em tufos de *Amphiroa* e de outros organismos preservados em etanol 70-80%.

O material originalmente preservado em formalina foi depositado Herbário SPF do Instituto de Biociências da USP, como *vouchers* das sequências de DNA produzidas. Para fins de conservação a longo prazo, as amostras foram transferidas a uma solução com 70% de etanol e 10% de glicerina (Woelkerling 1988). Adicionalmente, o material reservado para a extração de DNA, quando excedente, também pode ser acessado no acervo do Herbário SPF. Outra maneira de disponibilização dos dados referentes às amostras deste trabalho é a consulta no banco de dados do Sinbiota do Programa Biota-FAPESP (<http://sinbiota.biota.org.br>).

A **Tabela 1** do **Anexo 1** resume os dados de coleta, números de referência para os *vouchers* e as sequências produzidas. Réplicas destas amostras, além de materiais não incluídos nesta Tese, também estão inseridos na coleção do Herbário SPF e disponíveis para consulta.

Tabela II.1. Coletas realizadas.

Período	Local	Mesolitoral	Infralitoral	Substrato
19 de Abril de 2011	(SP) São Sebastião – ilha de Queimada Grande	x	x	costão rochoso
29 e 30 de Agosto de 2011	(SP) Ubatuba – ilha de Palmas e ilha das Cabras	x	x	costão rochoso
11 e 12 de Setembro de 2011	(SP) Guarujá – praia Branca e praia do Éden	x		costão rochoso
25 a 29 de Setembro de 2011	(RJ) Armação de Búzios e Arraial do Cabo (incluindo ilhas dos arredores)	x	x	costão rochoso e bancos de rodolito
26 a 27 de Outubro de 2011	(SP) São Sebastião – arquipélago de Alcatrazes	x	x	costão rochoso
09 e 10 de Dezembro de 2011	(RJ) Parati – Saco do Mamanguá e Pouso da Cajaíba	x	x	costão rochoso
24 a 28 de Fevereiro de 2012	(SC) Ilha do Xavier, Ilha do Arvoredo, Florianópolis, Governador Celso Ramos, Balneário Camburiú, Bombinhas.	x	x	costão rochoso e bancos de rodolito
05 a 11 de Abril de 2012	(ES) Anchieta, (incluindo o “Banco do Índio”)	x	x	recifes e bancos de rodolito
05 a 09 de Maio de 2012	(ES) Anchieta, Itapemirim, Piúma, Marataízes, Guarapari, Meaípe	x	x	recifes e costão rochoso
20 de Julho de 2012	(SP) Itanhaém	x		costão rochoso
03 a 05 de Agosto de 2012	(SP) Ilhabela	x		costão rochoso
19 de Novembro de 2012	(México) La Paz	x	x	costão rochoso
10 a 14 de Março de 2013	(AL) Maceió, Marechal Deodoro, Jequiá da Praia, São Miguel dos Milagres	x	x	recifes
24 a 28 de Abril de 2013	(CE) Paracurú, Trairi, Caucaia, Cumbuco, Icapuí, Caponga	x	x	recifes
22 a 27 de Maio de 2013	(BA) Salvador, Vera Cruz, Camaçari, Entre Rios	x	x	recifes, costão rochoso e bancos de rodolito
07 a 08 de Setembro de 2013	(RJ) Ilha Grande	x	x	costão rochoso
10 a 20 de Maio de 2014	(BA) Trancoso, Prado, Cravelas, ilhéus	x		recifes

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

Utilizamos os conceitos de *DNA-based species concept* (Tautz *et al.* 2003; Lelliaert *et al.* 2014) e de *Molecular Assisted Alpha Taxonomy* (Saunders 2008; Clarkston & Saunders 2010) para a classificação dos organismos em espécies. Além dos dados moleculares, a caracterização das espécies também incluiu os aspectos morfológicos e anatômicos, conforme detalhado nos itens seguintes. Neste sentido, um ponto chave deste trabalho consistiu justamente na comparação crítica dos resultados alcançados com estas duas vias de investigação, incorporando a ferramenta molecular para a taxonomia em Lithophylloideae.

Morfologia

A metodologia de preparo e observação de amostras de algas coralináceas é bem conhecida, seguindo as metodologias estabelecidas por Woelkerling (1988), com adaptações de Moura *et al.* (1997) e Horta (2002) no que concerne ao emblocamento em historesina. Utilizamos o mesmo procedimento de Harvey *et al.* (2005) quanto à segunda etapa de triagem para identificação dos talos de Lithophylloideae (l.c.). Os termos anatômicos seguem Harvey *et al.* (2005) e as formas de crescimento seguem Woelkerling *et al.* (1993).

O emblocamento de fragmentos das amostras utilizou Metacrilatoglicol (Leica®) incluindo zonas férteis, marginais do talo e do genículo (no caso de *Amphiroa*). Os blocos foram seccionados feitos em espessura de 5-7 µm através de micrótomo rotativo ou de deslizamento. Os cortes assim obtidos foram montados em lâmina histológica e corados com azul de toluidina-O acidificada em ácido bórico (Moura *et al.* 1997; Horta 2002; Harvey *et al.* 2005). As lâminas foram conservadas sem cobertura por lamínula, possibilitando que a coloração dos cortes seja refeita no futuro, dado que a toluidina-O se despigmenta com o tempo e com a exposição à luz; apesar disto, não aconselhamos a estocagem das lâminas descobertas, pois verificamos o acúmulo de impurezas sobre os cortes, dificultando sua observação ou mesmo o registro posterior de imagens de qualidade. Aconselhamos sua cobertura com resina sintética Permout ou verniz vitral 500, além da lamínula.

Conforme comentado (**Capítulo 1**, introdução), não existe uma padronização contemporânea do conjunto de características morfológicas anatômicas para a taxonomia das algas calcárias. Em parte isto se deve à existência de linhas distintas de pesquisa e em parte à constante busca por características que possam ser utilizadas para a distinção de gêneros e espécies. Para *Amphiroa* o estabelecimento do conjunto de características taxonomicamente relevantes é ainda mais problemático, já que apenas recentemente as características anatômicas dos conceptáculos passaram a ser observadas (Harvey *et al.* 2009b). Isto resulta num leque reduzido de informações pretéritas, dificultando a comparação com os espécimes brasileiros. Ao mesmo tempo, as características anatômicas dos conceptáculos de *Amphiroa* devem ser pareadas com os aspectos que foram até hoje utilizados na segregação de espécies neste gênero – relacionados à anatomia vegetativa do genículo e do intergenículo. Apenas assim poderemos validar ou não este novo conjunto de características. A **Figura II.2** ilustra a forma como interpretamos as características taxonômicas utilizadas que têm maior subjetividade na bibliografia.

Recorremos a uma cuidadosa pesquisa bibliográfica em teses e publicações específicas, que indicassem características que pudessem ser testadas como caracteres taxonomicamente importantes para cada gênero reconhecido (e.g. Do-Sung 1989; Woelkerling & Campbell 1992; Irvine & Chamberlain 1994; Riosmena-Rodríguez & Siqueiros-Beltrones 1996; Rosas-Alciquira 1996; Riosmena-Rodríguez *et al.* 1999; Horta 2002; Harvey *et al.* 2005; Moura & Guimarães 2005; Nunes *et al.* 2008; Farr *et al.* 2009; Harvey *et al.* 2009a; Harvey *et al.* 2009b; Villas-Bôas *et al.* 2009; Rosas-Alciquira *et al.* 2010; Woelkerling & Harvey 2012). Tendo estas características em mãos, e concomitantemente às características que pudemos observar no material recém-coletado, procedemos à classificação inicial das amostras em *tipos morfológicos*, ou seja, grupos de organismos que compartilham características morfológicas (e anatômicas) comuns. Estes tipos morfológicos não são padronizados ou descritos previamente, mas são uma forma de organizar a variedade morfológica e anatômica do conjunto de amostras. São um estado temporário de circunscrição das amostras, suportados por características morfológicas que aqui foram postos à prova com base no material genético dos organismos (ver sessão seguinte). Estes tipos morfológicos não são apresentados aqui (mesmo porque muitos não se mantiveram como grupos ou espécies “reais” através dos dados moleculares); apesar disto esta foi uma etapa importante durante o processo de investigação das amostras.

A Hábito

Articulado / Geniculado
(*Amphiroa* - Capítulo 4)

Tufo

Isolado

Incrustante / Crostoso / Não articulado
(*Lithophyllum/Titanoderma* - Capítulo 3)

Aderido ao substrato

De vida livre (rodolito)

Segmentado
(*Paulsilvella* - Capítulo 5)

Figura II.2. Características utilizadas para a descrição das espécies deste trabalho, com ênfase às de maior subjetividade (continua).

B Entumescimento do Genículo

Presente

Ausente

C Anastomose entre ramos vizinhos

D Aspecto das células do Genículo (exemplos)

cinco fileiras de células;
zona de contato reta (setas)

duas fileiras de células;
zona de contato irregular (seta)

duas fileiras de células;
zona de contato imbricada (seta)

E Aspecto das células do Intergenículo (exemplos)

nove fileiras de células longas por uma de células curtas
(9L:1C)

duas (raro uma) fileiras de células longas por uma de célula curta
(9L:1C)

Figura II.2 (continuação). Características utilizadas para a descrição das espécies deste trabalho, com ênfase às de maior subjetividade (continua). B a E são aplicáveis apenas a *Amphiroa*.

F Classificação do aspecto geral das formas incrustantes que aparecem nesta Tese

Encrusting

Lumpy

Warty

Fruticose / Fruticoso

Foliose / Folioso

G Formas de desenvolvimento do hipotalo

Dímero

Monômero

Biestratificado

H Tipos de tricocito

Simples

Composto, com 2-3 células

Composto, mais longo

Figura II.2 (continuação). Características utilizadas para a descrição das espécies deste trabalho, com ênfase às de maior subjetividade (continua). F é aplicável apenas às amostras de hábito incrustante; aplicamos G e H apenas a estes mesmos tipos de amostras neste primeiro momento.

I Posição do conceptáculo em relação à superfície do talo

Afundado/Deprimido

Raso

Saliente

Bastante Saliente

J Características do conceptáculo tetrasporangial

Figura II.2 (continuação). Características utilizadas para a descrição das espécies deste trabalho, com ênfase às de maior subjetividade.

Teste da aplicabilidade da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – etapa realizada em parceria com o “Laboratório de Ficologia do Centro de Ciências Biológicas (UFSC)”

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV ou *SEM*, em inglês) é tradicionalmente empregada na investigação das características anatômicas em algas calcárias (p. ex. Chamberlain *et al.* 1991; Riosmena-Rodríguez *et al.* 1999; Athanasiadis 2001; Peña & Barbara 2004; Nunes *et al.* 2008; Villas-Boas *et al.* 2009; Horta *et al.* 2011). Isto se justifica pelo fato de este tipo de ilustração propiciar uma boa clareza de detalhes, com uma acuidade de até 3 nm - enquanto que a microscopia óptica (MO) é limitada aos 200 nm. Com base nisto e considerando os objetivos propostos, testamos a aplicabilidade da técnica para a obtenção de características informativas para a taxonomia de Lithophylloideae.

Realizamos uma etapa de treinamento junto à equipe do Laboratório de Ficologia do Centro de Ciências Biológicas (Universidade Federal de Santa Catarina) que têm uso corrente da técnica. Também participamos de treinamento através da disciplina “Microscopia Eletrônica I”, ministrada no Instituto de Física da USP. Ao final destas duas etapas e tendo experimentado a aplicabilidade da técnica, comparamos os resultados que podem ser obtidos através de MEV e de MO (Microscopia Óptica, com o preparo de lâminas permanentes, l.c.). Com base na comparação das duas técnicas de microscopia, optamos por focar no uso da MO. Isto se justifica pela conclusão de que os detalhes anatômicos taxonomicamente informativos vislumbrados por MEV são igualmente acessíveis através da MO. Comparativamente, a técnica de MO apresenta ainda algumas vantagens:

- i. Uma maior viabilidade da MO para a observação de amostras com pouca biomassa, principalmente no que se refere à disponibilidade de conceptáculos - já que para a técnica de MEV é comum sacrificar-se uma porção de conceptáculos até se obter sucesso na fratura perpendicular, passando exatamente pela região do poro, para a captação de imagens. Enquanto isso, o preparo das lâminas histológicas para MO permite uma melhor regulação do plano de observação (de corte) das amostras e, portanto, necessita uma quantidade menor de conceptáculos. Além de ser possível a obtenção de cortes seriados que permitem uma observação mais detalhada e completa das estruturas em MO.
- ii. A melhor observação em MO de estruturas pouco ou não calcificadas do conceptáculo, como as células papiliformes² e os tetrasporângios, que colapsam com a desidratação das amostras, necessária para a MEV.
- iii. A redução do tempo despendido, possibilitando a dedicação de uma maior quantidade de tempo em outras vertentes deste trabalho.
- iv. A redução dos gastos envolvidos, já que o preparo das amostras para observação em MEV compreende o uso de materiais custosos. Exemplos são a cobertura de ouro dos exemplares, o uso de fita de carbono para fixação das amostras em *stub* e o uso de tinta de prata para redução do ruído de leitura.

² Células papiliformes são células delicadas e arredondadas, muitas vezes efêmeras, que partem do teto do conceptáculo em algumas espécies de algas calcárias.

INFERÊNCIAS MOLECULARES

Extração de DNA

Um tempo considerável deste projeto foi investido em testes de diferentes protocolos, especialmente de extração de DNA e PCR. Dada a importância desta etapa, segue uma síntese das metodologias empregadas.

Para a correta preservação do DNA, desde a coleta até a extração, a alga deve ser mantida em sílica-gel ou etanol 70-80% logo após a coleta - sendo que a metade do material deve ser armazenada em formalina para ser depositada como voucher em herbário. Faz-se necessária uma terceira etapa de triagem do material (vide a sessão de “coleta e preservação das amostras”) para se garantir que o material que será submetido à extração está livre de epífitos e endófitos, o que é bastante comum nos talos de algas calcárias. A presença de outros organismos contaminantes na amostra normalmente é a principal responsável pela falha na obtenção de sequências finais de qualidade. A limpeza do material foi feita com o uso de pincel, cortes e raspagem do material tomando-se o cuidado de excluir as camadas de coloração não usual (esverdeado, enegrecido, amarronzado). Deve-se priorizar a preservação de camadas mais pigmentadas da amostra. Uma quantidade de 10 e 50 mg de biomassa fresca limpa é suficiente para a extração de DNA das amostras geniculadas e incrustantes, respectivamente. Salientamos o cuidado extra que deve ser tomado nos casos de material epífito, principalmente nos casos em que ambos os organismos (epífito e hospedeiro) pertencem a grupos intimamente relacionados. Como exemplo o trabalho com *Paulsilvella*, com indivíduos diminutos desenvolvidos sobre ramos de outras calcárias articuladas incluindo *Amphiroa*, pertencente à mesma subfamília (**Capítulo 5**, publicado como Torrano-Silva *et al.* 2014). Para este trabalho, efetuamos a separação minuciosa do epífito do hospedeiro, além de amplificar ambos os organismos (epífito e hospedeiros) a fim de validar-se a identificação das sequências produzidas.

Existe uma variedade de metodologias publicadas para a extração de DNA de algas marinhas. Utilizamos: i. protocolos “manuais” (i.e., em que preparamos todos os reagentes) propostos para o trabalho com as algas calcárias (Huguey *et al.* 2001; Harvey *et al.* 2003); ii. protocolos e kits industrializados que são comumente utilizados com algas não-calcificadas (Faugeron *et al.* 2001; Goff & Moon 1993; *kit NucleoSpin Plant II*, da MN; *kit NDease Plant MiniKit*, da Quiagen; *kit Phire Plant Direct PCR Kit*, da Finnzyme); iii. Adaptações dos protocolos originais (l.c.), incluindo o uso de proteinase K, RNase e alterando o tempo de banho inicial. A moagem das amostras sempre utilizou nitrogênio líquido e foi realizada com almofariz e pistilo.

Verificamos que o sucesso da extração de DNA utilizando os protocolos de Faugeron *et al.* (2001) e Huguey *et al.* (2001), passa pela adição de proteinase K, RNase e o aumento do tempo de banho para 2-6 horas. Apesar disto, são métodos que envolvem reagentes extremamente tóxicos, como o beta-mercaptoetanol e o clorofórmio, devendo ser evitados.

Também indicamos o aumento do tempo de banho para 2-6 horas para o incremento do sucesso da extração de DNA utilizando os kits industriais (*kit NucleoSpin Plant II*, da MN; *kit NDease Plant MiniKit*, da Quiagen; *kit Phire Plant Direct PCR Kit*, da Finnzyme). São métodos mais simples e rápidos, porém de custo mais elevado do que os métodos manuais.

O protocolo de Goff & Moon (1993), utilizando resina Chelex® 100 foi o utilizado neste trabalho para a maioria das amostras pela simplicidade dos procedimentos empregados. É um processo rápido e relativamente barato, mas que não inclui uma etapa de limpeza do produto de extração; desta forma esta metodologia tem funcionado perfeitamente, mas ainda não sabemos por quanto tempo, a longo prazo, as cadeias de DNA permanecerão íntegras. Segue a descrição da adaptação da metodologia originalmente proposta com este tipo de material, que desenvolvemos para o trabalho com as algas calcárias:

Extração de DNA de algas coralináceas

(adaptado para algas calcárias a partir do protocolo de Goff & Moon 1993)

Amostra: 10 a 50 mg de biomassa limpa.

Tampão: 5 g de resina Chelex® 100 + 100 ml de água MilliQ.

Moagem: em almofariz e pistilo, com o resfriamento direto e constante da amostra com N₂ líquido; transferência do pó para um eppendorf.

Extração do DNA: banho a 90 °C por 2 a 6 horas (o incremento do tempo de banho é indicado, por aumentar a concentração final de DNA em solução); temperatura ambiente por 10 minutos; imersão em gelo por 10 a 15 minutos; centrifugação a 10.000 RPM a 4 °C por 5 minutos; pipetagem do sobrenadante a um Eppendorf.

Armazenamento: -20 °C a curto prazo; liofilização e -80 °C a longo prazo.

Concluindo, o DNA das algas coralinas pode ser extraído utilizando-se um amplo leque de metodologias, passando por kits e protocolos manuais, de modo que o processo pode ser adaptado a diversas condições de laboratório.

Amplificação (PCR)

Realizamos diversos testes para a amplificação dos produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ou Reação em Cadeia da Polimerase; Sambrook *et al.* 1989) para amostras de algas coralinas, incluindo diferentes quantidades de *primers*, DNA total, enzima (*Taq* polimerase), magnésio e tampão de reação. O sucesso de amplificação é uma combinação de diversos fatores, como a correta preservação da amostra (método de secagem e tempo de armazenamento), a quantidade de biomassa rica em DNA (pigmentada e preferencialmente fértil, principalmente no caso das amostras incrustantes), da composição mineral e de polissacarídeos inerentes da própria amostra e da adaptação do método de extração. Estes fatores são capazes de interferir não apenas na quantidade de DNA íntegro e disponível, quanto também na eficiência da PCR, especialmente no caso da presença de inibidores da enzima *Taq* polimerase ou da associação dos inibidores a qualquer um dos componentes utilizados na reação, como o magnésio (Schrader *et al.* 2012). Desta forma, percebemos que o DNA de algas calcárias é bastante sensível à degradação e não é possível obter um “protocolo universal” para a amplificação, devendo-se fazer a adequação dos protocolos caso a caso com base no histórico e na natureza de cada amostra.

É comum que a diluição da solução de DNA, minimizando os inibidores da PCR, viabilize a amplificação dos marcadores moleculares. Recomendamos Diluições de 20x e de 50x do DNA recém-extraído.

Utilizamos o kit de PCR da Invitrogen de forma que o volume de reação utilizado variou de acordo com o tamanho do marcador. Para marcadores > 700 pb (pares de base) empregamos um volume de 41,5 µl, sendo 1 µl de DNA total ou diluído, 1 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*, à concentração inicial de 10 pmol), 1 µl de dNTP (à concentração inicial de 10 mM para cada um dos quatro tipos de desoxirribonucleotídeo), 1,6 µl de -MgCl₂ (à concentração inicial de 50 mM, fornecido pelo fabricante) e 4 µl de tampão (à concentração inicial de 10X, 200 mM, fornecido pelo fabricante), 0,25 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl, fornecida pelo fabricante) e 31,2 µl de água MilliQ. Para marcadores <700pb preparamos um volume de reação de 34,8 µl, sendo 1 µl de DNA, 1 µl de cada *primer*, 1 µl de dNTP, 1,3 µl de -MgCl₂, 3,3 µl de tampão, 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase e 26,3 µl de água MilliQ.

As especificações do ciclo de PCR e *primers* estão descritas na sessão **2 “Marcadores Moleculares”**.

Para a conferência do tamanho do produto de PCR realizamos a corrida em gel de eletroforese com um marcador com bandas de pesos moleculares conhecidos (*1 Kb DNA Ladder- Gibco BRL*). Para a purificação dos

produtos de PCR utilizamos o *Illustra™ GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante.

Sequenciamento e sequências consenso

Para o sequenciamento usamos o método de Sanger (Sanger, 1977) e os reagentes do kit *Cycle Sequencing, Big-Dye Terminator* (Applied Biosystems). O produto purificado da PCR foi quantificado em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ através do equipamento NanoDrop (Thermo Scientific, modelo 2000) ou através de uma estimativa visual pela intensidade das bandas do gel de eletroforese comparada com uma banda padrão de tamanho e quantidade conhecidos (*1 Kb DNA Ladder*, Gibco BRL). A partir desta concentração (em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) adequamos o volume necessário para a quantidade de 30-40 μg , que foi completado com água MilliQ até o volume de 5 μl . Para o preparo de cada solução de reação de sequenciamento, adicionamos 2 μl de preparo enzimático Ready Reaction Mix (à concentração fornecida pelo fabricante), 2 μl de BigDye® Terminator Sequencing Buffer (à concentração de 5X) e 1 μl de um único tipo de *primer* (à concentração de 3,2 pmol).

As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas ao ciclo único de 40 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Seguiu-se a precipitação dos produtos utilizando EDTA, acetato de sódio e etanol conforme o protocolo da Applied Biosystems. As amostras foram então ressuspensas em formamida e carregadas em sequenciador automático modelo ABI 3730 (Applied Biosystems). A qualidade dos picos das sequências finais foi verificada visualmente. A conferência da identidade aproximada do material amplificado utilizou a plataforma *online Blast* (Altschul *et al.* 1990) a partir do banco de dados do GenBank (Benson *et al.* 2013) – as sequências *forward* e *reverse* devem ser compatíveis com o marcador amplificado e com o grupo taxonômico das amostras analisadas.

As sequências consenso foram montadas através do Sequencher® (v. 4.1.4, Gene Codes Corporation), sendo que os nucleotídeos divergentes foram corrigidos manualmente com a consulta dos cromatogramas.

Matrizes

Para a construção das matrizes alinhamos as sequências consenso através do ClustalW no BioEdit (Hall *et al.* 1999). O início e o final de cada matriz foram excluídos para a remoção das sequências referentes aos *primers* e/ou para que todas as sequências tivessem o mesmo tamanho, com base na menor sequência da matriz.

A montagem das matrizes deve levar em conta a questão a ser investigada, de forma que as sequências incluídas variaram de caso a caso, sendo detalhadas na sessão de “metodologia específica” dos **Capítulos 3, 4 e 5**. Os *ingroups* são as sequências que participam efetivamente da pergunta – no nosso caso, Lithophylloideae, sendo as espécies incrustantes no **Capítulo 3**, *Amphiroa* no **Capítulo 4** e Lithophylloideae no **Capítulo 5**. As sequências denominadas *outgroup* (ou grupo externo) devem polarizar as relações filogenéticas dentro do *ingroup*. Para a escolha do *outgroup* escolhemos um representante do grupo taxonômico mais próximo do *ingroup*, através de consultas da inferência filogenética do grupo em trabalhos pretéritos (p.ex. Bittner *et al.* 2011 e Kato *et al.* 2011) e de acordo com a disponibilidade no GenBank. O *outgroup* não é necessário em análises de agrupamento (ou *cluster analysis*) de espécies, quando o foco não é a relação entre as espécies, mas sim a proximidade relativa de um táxon a outro em relação aos demais, através da quantificação da distância entre eles sob diferentes algoritmos possíveis³.

Cabe neste ponto a nota de que, se por um lado a aplicação dos resultados apontados pela inferência filogenética passa por constante discussão, a própria metodologia envolvida, incluindo a seleção (ou seja, a montagem das matrizes), o tratamento e a análise dos dados moleculares também devem ser criteriosos. Discute-se, por exemplo, se a adição consecutiva de dados (sequências dos marcadores moleculares) às análises poderia incrementar ou prejudicar a inferência das relações filogenéticas. Vemos que em um dos casos os resultados são cada vez mais consistentes com a consecutiva adição de táxons à análise (Bittner *et al.* 2011), enquanto que em outros se recomenda, ao contrário, que se invista no aumento do número de genes, a partir dos mesmos táxons

³ Quando se infere uma identidade taxonômica a um táxon a partir da comparação com um banco de dados pré-existente (de forma que cada espécie seja determinada por um ou mais haplótipos exclusivos), estamos falando da técnica de *Barcoding* (Hebert *et al.* 2003).

(e.g. Rokas & Carroll 2005). No caso desta Tese, que tem como um dos objetivos a investigação da diversidade de espécies, limitar a quantidade de indivíduos incluídos na análise não seria condizente, mesmo porque a diversidade molecular que encontramos ao longo da costa foi crescente com o número de amostras coletadas. Desta forma, como detalhado no **Capítulo 2** (Ferramentas e Metodologia gerais), buscamos um balanço entre as duas necessidades, incluindo amostras molecularmente distintas e de regiões geográficas distintas, em múltiplas matrizes de marcadores. Mesmo não seguindo a forma ideal para alguma das duas abordagens supracitadas, acreditamos que, ao final, obtivemos uma visualização preliminar bastante útil do cenário encontrado (quanto à diversidade dos táxons e também quanto à aplicabilidade dos marcadores), possibilitando o direcionamento de futuras investigações na área. Com esta metodologia também pudemos testar a hipótese de que é subestimada a diversidade de espécies em Lithophylloideae no país.

Marcadores moleculares

Um marcador molecular é um segmento específico do DNA (correspondentes a regiões expressas ou não) que é escolhido em função da pergunta científica, sendo amplificado e sequenciado em laboratório. Como existem regiões extremamente heterogêneas na totalidade de DNA de um organismo (nuclear e organelares), sujeitas a diferentes taxas de mutação, inserção ou deleção, sob diferentes mecanismos celulares e diferentes pressões ambientais encontradas ao longo do tempo, o grau de variação entre os marcadores moleculares varia bastante.

A **Tabela II.2** sumariza os marcadores utilizados neste trabalho e os *primers* relacionados a eles. O **Anexo I** lista as amostras e sequências produzidas nesta Tese.

A seguir revemos o uso de cada marcador junto às algas coralináceas, bem como a metodologia específica que empregamos para a amplificação e sequenciamento de cada um deles.

SSU rDNA (18S)

(Nuclear; gene que codifica o RNA da subunidade pequena do ribossomo)

Este é o principal marcador para as algas calcárias, utilizado desde as primeiras publicações (Bailey *et al.* 1996; Bailey & Chapman 1998; Bailey 1999), sendo consecutivamente amplificado para fins de inferência filogenética, de forma que seu banco de dados tem crescido desde então. Foi um dos marcadores utilizados na criação da subclasse Corallinophycideae (Le Gall & Saunders 2007), além de ser frequentemente utilizado para a distinção de ordens, famílias, subfamílias e gêneros (Bailey & Chapman 1996; Bailey 1999; Vidal *et al.* 2002; 2003; Bailey *et al.* 2004; Le Gall *et al.* 2010; Bittner *et al.* 2011; Torrano-Silva *et al.* 2014). O SSU rDNA também foi utilizado na distinção de espécies (Harvey *et al.* 2002; Vidal *et al.* 2003; Broom *et al.* 2008; Peña *et al.* 2011; Vieira-Pinto *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015), apesar de não ser o mais indicado para este objetivo, para o qual se recomenda a utilização de marcadores que apresentam taxas de substituição mais rápidas (Vidal *et al.* 2003). Na bibliografia encontramos que, em comparação com o *psbA* e com o LSU rDNA, o SSU rDNA apresenta menor resolução para análises filogenéticas (Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011). Ainda assim o fato de apresentar o maior banco de dados disponível faz com que este marcador continue sendo útil para dois objetivos, empregados nesta Tese: para a inferência filogenética; para o posicionamento taxonômico de amostras para as quais não se encontra uma identificação aproximada com base na comparação com a informação existente para os outros marcadores (Broom *et al.* 2008).

Assim sendo, utilizamos o SSU rDNA para a comparação de grupos específicos com as sequências disponíveis no banco de dados, bem como para a definição das relações filogenéticas entre os gêneros de Lithophylloideae.

Para amplificação utilizamos os *primers* 18S5' × 1055R e 1055F × 18S3'; para sequenciamento empregamos os mesmos *primers*, além do 530F e do 536R (Milstein & Oliveira 2005). O ciclo para PCR segue Milstein & Oliveira (2005). O consenso obtido desta maneira apresenta até 1749 pb.

PsbA

(Cloroplastidial; gene que codifica a proteína D1 do fotossistema II)

Sendo um marcador do cloroplasto, o *psbA* apresenta o mesmo padrão de herança genética que o *rbcl*, com a vantagem de ser mais curto e por isto necessitar um menor esforço de amplificação e sequenciamento.

Este marcador foi aplicado com sucesso com outros grupos de algas vermelhas (Seo *et al.* 2003; Yang & Boo 2004) e mais recentemente junto às algas calcárias (Broom *et al.* 2008). Seu uso foi proposto com a busca por um marcador que pudesse diferenciar espécies que divergiram mais recentemente - e que o SSU rDNA não poderia detectar. A prática com a amplificação deste marcador a partir de algas calcárias revelou maiores taxas de sucesso em comparação com as encontradas para outros marcadores (Broom *et al.* 2008). Estes dois aspectos conferiram ao *psbA* a categoria de um candidato promissor para a discriminação de espécies com este grupo de algas (Broom *et al.* 2008). Adicionalmente, Bittner *et al.* (2011) conferiram que o *psbA* apresenta maior resolução filogenética que o SSU rDNA. Broom *et al.* (2008) concluíram ainda que a combinação do *psbA* com o SSU rDNA pode inferir de forma apropriada as relações filogenéticas em diferentes magnitudes (i.e., para ramos distais e proximais).

Nossos esforços iniciais confirmaram a facilidade de aplicação do *psbA* junto às amostras brasileiras de Lithophylloideae. Apesar disto, o sequenciamento a partir do *primer* reverso interno (600R, Yoon *et al.* 2002) foi pouco efetivo, de modo que desenvolvemos um novo *primer* reverso interno (550R, Torrano-Silva *et al.* 2014) a partir de sequências brasileiras. Este *primer* melhorou a qualidade das sequências produzidas, apesar de ainda não funcionar todas as vezes.

Utilizamos este marcador tanto para os testes de agrupamento quanto para a inferência filogenética no grupo.

Essa região foi amplificada e sequenciada com os *primers* *psbAF1* × *psbAR2*; para sequenciamento os *primers* internos 500F e 550R também foram utilizados. O ciclo para PCR seguiu Saunders & Moore (2013). O consenso obtido desta maneira apresenta até 948 pb.

RbcL

(Cloroplastidial; gene que codifica a subunidade grande da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase, rubisco)

O *rbcl* atualmente é o principal marcador molecular para a inferência filogenética em Florideophyceae (Freshwater *et al.* 1994; 1995; Sherwood & Shearth 2000; Lin *et al.* 2001; Yang & Boo 2004; Gurgel & Fredericq 2004; De Clerck *et al.* 2005; Myung-Sook *et al.* 2006; Huguey & Hommersand 2008). Apesar disto ainda é pouco usado para as algas coralinas, com exceção do grupo das Corallinoideae (Gabrielson *et al.* 2011; Martone *et al.* 2012) e mais recentemente com as Hapalidiaceae (Sissini *et al.* 2014). A possibilidade de usar a porção 3' desse gene (*rbcl*-3P) como marcador para *DNA barcoding* foi proposta por Saunders & Moore (2013). Gabrielson *et al.* (2011) verificaram que é possível utilizar o *rbcl* para a distinção de gêneros nos casos em que o SSU rDNA (mais conservado) não propicia distinção. O mesmo trabalho mostrou a viabilidade da amplificação de fragmentos do *rbcl* a partir de materiais históricos de algas coralínáceas (utilizando amostra de Corallinoideae), como os Tipos depositados em herbários. Esta propriedade é importante para a aplicação em estudos taxonômicos, especialmente em grupos onde as características anatômicas que separam espécies pode ser bastante sutil, como é o caso das algas calcárias. Desta forma, concordamos que a consecutiva colaboração para o aumento de sequências depositadas nos bancos de dados irá propiciar, no futuro, maiores esclarecimentos quanto à filogenia e com o *DNA Barcoding* no grupo das algas calcárias.

A amplificação deste marcador para as amostras brasileiras de Lithophylloideae foi bastante efetiva e favorecida pela disponibilidade de uma grande variedade de *primers* previamente desenvolvidos (e.g., os registrados no banco de dados do BOLD; Ratnasingham & Hebert 2007), com base no quê realizamos os testes pela busca das melhores combinações para amplificação e sequenciamento. Apesar disto, dado que existem poucos dados pretéritos deste marcador com para Lithophylloideae, o alcance de comparações de identidade ainda é limitado. Utilizamos o *rbcl*-3P tanto para os testes de agrupamento quanto para a inferência filogenética no grupo. O que estaremos chamando de *rbcl*-3P (714 pb) apresenta alguns pares de base que o fragmento apresentado por Saunders & Moore (2013; 785 pb), mas iremos nos referir a ele pelo mesmo nome. Apesar de utilizarmos somente a porção 3' (*rbcl*-3P) para as análises, adicionalmente produzimos sequências mais longas

para este marcador (dentro da combinação de *primers* abaixo proposta), o que acreditamos ser importante para o enriquecimento dos bancos de dados.

Para amplificação da porção 3' do gene *rbcl* utilizamos os *primers* 577F (ou 753F) × RrbcS-start; para o sequenciamento utilizamos 753F × RrbcS-start. O ciclo para PCR seguiu Saunders & Moore (2013). O consenso obtido desta maneira apresenta até 714 pb (a extremidade 3', referente ao espaçador *rbclS*, foi retirada durante o preparo da sequência consenso).

Para amplificação do gene *rbcl* inteiro utilizamos os *primers* F57 × R897c e 577F (ou 753F) × RrbcS-start; esses mesmos *primers* foram empregados para o sequenciamento, além do 1150aR (Cassano 2009). O ciclo para PCR seguiu Saunders & Moore (2013). O consenso obtido desta maneira apresenta até 1410 pb (a extremidade 3', referente ao espaçador *rbclS*, foi retirada durante o preparo da sequência consenso).

UPA (ou 23S rDNA)

(Cloroplastidial; domínio V do gene que codifica o RNA da subunidade grande do ribossomo)

O UPA foi proposto como um marcador do tipo *DNA Barcode* para todas as linhagens de organismos fotossintetizantes (Presting 2006). Um par de *primers* universal (tanto para amplificação quanto para sequenciamento) é capaz de amplificar cianobactérias, diatomáceas, euglenofíceas, xantofíceas e as macroalgas vermelhas, verdes (com algumas exceções) e pardas (Presting 2006; Sherwood & Presting 2007). Sua aplicação como *DNA Barcode* tem sido controversa por ser mais conservativo que o COI-5P (ver abaixo), e talvez até conservativo demais para ser capaz de distinguir espécies proximamente relacionadas (e.g. Sherwood *et al.* 2010a; 2010b; Clarkston & Saunders 2010; Milstein *et al.* 2011). Entre os poucos trabalhos que utilizaram este marcador junto às algas coralinas estão Sissini *et al.* (2014), Torrano-Silva *et al.* (2014) e Vieira-Pinto *et al.* (2014), sendo que os dois últimos com Lithophylloideae.

Este marcador é facilmente amplificado e sequenciado, o que fez com que o elegêssemos como ferramenta de controle da qualidade do DNA e para uma triagem molecular preliminar.

Tanto a amplificação quanto o sequenciamento utilizaram apenas p23SrV f1 × p23SrV r1 (Presting 2006). O ciclo para PCR também seguiu Presting (2006). O consenso obtido desta maneira apresenta até 372 pb.

COI-5P (ou *cox1*)

(Mitocondrial; porção 5' do gene que codifica a proteína citocromo oxidase I)

É o marcador proposto como *DNA Barcode* para todos os organismos mitocondriados (Hebert *et al.* 2003). Saunders (2005) recomenda sua aplicação junto às algas vermelhas, o que tem sido seguido desde então. Em um trabalho envolvendo todos os grupos de Corallinophycideae, Bittner *et al.* (2011) encontraram uma maior variação quando comparado ao *psbA*, LSU rDNA e SSU rDNA. Outros trabalhos também utilizaram o COI-5P com as algas calcárias (Bittner *et al.* 2011; Hind & Saunders 2013; Carro *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014; Richards *et al.* 2014; Torrano *et al.* 2014; Vieira-Pinto *et al.* 2014), mas em nenhum se comenta que o sucesso na amplificação e na obtenção final de sequências limpas e não ambíguas é baixo. Apesar disso, Carro *et al.* (2014) comentam que, comparativamente, a amplificação do *psbA* apresenta melhores taxas de sucesso. Entretanto, a dificuldade do trabalho com o COI-5P é consenso entre os pesquisadores da área (com. pess.). Devido a isto, existem poucas sequências disponíveis nos bancos de dados quando comparado às de outros marcadores. Adicionalmente, acreditamos que, uma vez que já existe uma dificuldade de amplificação utilizando-se amostras frescas, sua aplicação com materiais históricos e de referência depositados em herbário (Holótipos, Sintipos, etc) será ainda mais problemática.

Durante este trabalho, investimos esforços consideráveis para a obtenção de sequências de um número restrito de amostras brasileiras de Lithophylloideae. Estas sequências foram utilizadas na comparação do potencial dos outros marcadores em comparação com o desempenho do COI-5P como *DNA Barcode*. Realizamos incontáveis testes para encontrar as melhores combinações de *primers* com as amostras brasileiras. Selecionamos três como os melhores pares foram selecionados para amplificação e sequenciamento de Lithophylloideae, GHaIF × GWSR, GHaIF × GazR1 e GazF1 × GazR1. O ciclo para PCR segue Saunders (2005). O consenso obtido apresenta até 664 pb.

Tabela II.2. *Primers* para PCR e sequenciamento para os diferentes marcadores moleculares envolvidos no presente projeto.

Marcador	Primers	Sequência 5'→3'	Referência
COI-5P	GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	Saunders 2005
	GHaIF	TCAACAAATCATAAAGATATYGG	Saunders 2008
	GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA	Saunders 2005
	GwsR (metade distal)	GGRTGTCCRAARAAYCARAA	Hind & Saunders 2013
<i>psbA</i>	psbA-F	ATGACTGCTACTTTAGAAAGACG	Yoon <i>et al.</i> 2002
	psbA500F	CTCTGATGGWATGCCWYTAGG	Yoon <i>et al.</i> 2002
	psbA550R	CCRAAYACACCHGCWACACC	Torrano-Silva <i>et al.</i> 2014
	psbA600R	CCAAATACACCAGCAACACC	Yoon <i>et al.</i> 2002
	psbA-R2	GCTAAATCTARWGGGAAGTTGTG	Yoon <i>et al.</i> 2002
<i>rbcl</i>	F57	GTAATTCCATATGCTAAAATGGG	Hommersand <i>et al.</i> 1994
	F577	GTATATGAAGGTCTAAAAGGTGG	Freshwater & Rueness 1994
	RrbcS-Start	GTTCTTGTGTTAATCTCAC	Freshwater & Rueness 1994
	R1150a	GCATTTGRCCRCARTGAATACC	Cassano 2009
	R897c	CGTGAATATGTWGARTTACCDGC	Dr. Morgan Vis, não publicado
SSU rDNA	18S5	CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Milstein & Oliveira 2005
	530F	GAGGGCAAGTCTGGTG	Milstein & Oliveira 2005
	1055F	GGTGGTGCATGGCCG	Milstein & Oliveira 2005
	18S3	GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA	Milstein & Oliveira 2005
	536R	GAATTACCGCGGCTGCTG	Milstein & Oliveira 2005
	1055R	CGGCCATGCACCACC	Milstein & Oliveira 2005
UPA	p23SrV_f1 ("UPAF")	GGACAGAAAGACCCTATGAA	Sherwood & Presting 2007
	p23SrV_r1 ("UPAR")	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	Sherwood & Presting 2007

Análises das sequências

Existe uma ampla gama de ferramentas e análises para sequências de DNA. Dentro deste universo, a escolha do método deve considerar a pergunta inicial e o conjunto amostral envolvido. É comum que se empreguem mais de uma análise para uma mesma pergunta, de forma que se possam comparar os resultados ou mesmo reforçá-los.

Utilizamos duas linhas de abordagem, as análises de agrupamento e a inferência filogenética, que são detalhados a seguir.

Análises de agrupamento

Objetivos: identificar a diversidade de espécies para Lithophylloideae dentro do conjunto amostral utilizado; comparar a eficiência dos diferentes marcadores moleculares (COI-5P, UPA, *psbA* e *rbcL*-3P) como *DNA Barcodes* para amostras de Lithophylloideae brasileiras.

Esta comparação se deu quanto à manutenção das unidades taxonômicas operacionais baseadas em dados moleculares, (ou *MOTUs*, do inglês *Molecular Operational Taxonomic Units*; Blaxter 2004) entre os diferentes marcadores, bem como quanto à sustentação destes agrupamentos frente aos distintos métodos utilizados, listados a seguir. Além disso, níveis de divergência INTER e INTRAespecíficos foram computados e comparados com os valores da literatura.

Outro fator importante para a avaliação da capacidade destes marcadores como *DNA Barcodes* é a estimativa do *barcode gap*, que calcula quantas vezes a divergência mínima da diversidade entre espécies é maior do que o valor máximo encontrado na divergência interna para uma espécie (Freshwater *et al.* 2010):

$$\text{magnitude do } \textit{barcoding gap} = \frac{\text{diversidade INTERespecífica mínima}}{\text{diversidade INTRAespecífica máxima}}$$

Taxa de Divergência entre grupos intimamente relacionados

Com a amplificação de um mesmo marcador para uma grande quantidade de amostras, é comum que encontremos grupos de amostras que apresentam similaridade muito maior entre si, em comparação com outros grupos de amostras – que por sua vez também apresentam outras relações mais fortes de similaridade entre si. Estes agrupamentos são facilmente distintos através da visualização gráfica gerada pelo método de *Neighbor Joining* (NJ, Saitou & Nei, 1987). O *threshold* de divergência usado para limitar grupos ou espécies distintas varia entre os distintos marcadores. Além disso, o resultado da aplicação do método com grupos distintos de algas como objeto de estudo leva à conclusão de que este *threshold* não tem um valor estritamente definido, aplicável a todos os grupos. Com base nisto, preparamos uma tabela com os intervalos conhecidos para outros grupos de algas vermelhas, que utilizamos como referência para os resultados que encontramos (**Tabela II.3**).

Para a utilização do método de NJ foi computada a distância entre os táxons a partir do número de bases divergentes e a organização dos pares mais próximos entre si em uma árvore com a menor soma total de ramos, através do MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). Ainda considerando o método de NJ, computamos o suporte para cada ramo através de 2000 repetições de *Bootstrap*.

Tabela II.3. Valores de divergência INTRAespecífica e INTERespecífica (%) para aos marcadores utilizados, encontrados na bibliografia disponível para Rhodophyta. Incluímos: Saunders 2005, Cassano 2009, Clarkston & Saunders 2010, Freshwater *et al.* 2010; Gabrielson *et al.* 2011; Milstein *et al.* 2011; Hind & Saunders 2013, Iha 2014, Nauer 2014, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014⁴. Os dados para *rbcL* foram computados a partir de matrizes com tamanhos bastante distintos, passando de 293 pb (Sissini *et al.* 2014) a 1401 pb (Gabrielson *et al.* 2011), o que pode envolver taxas distintas de evolução.

Marcador	Bibliografia: divergência INTRAespecífica	Bibliografia: divergência INTERespecífica
COI-5P	0-2,6%	3,3-18,2%
UPA	0-0,8%	0,6-8,4%
<i>psbA</i>	0-0,3%	2,5-13,1%
<i>rbcL</i>	0-0,7%	(0,57) 0,9-12; (qualquer valor >2 para Freshwater <i>et al.</i> 2010)

Automatic Barcode Gap Discovery , ABGD (Puillandre et al. 2012)

Este método infere o número de grupos presentes (como *hipóteses preliminares de espécies*, ou *psh* em inglês), através da verificação do *barcoding gap* das diferenças par-a-par para um determinado conjunto de dados. A estimativa foi feita através da plataforma disponível online: <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd>.

Multidimensional Scaling, MDS (Lessa 1990)

É um dos métodos mais usados para a visualização da distribuição dos dados no Espaço Euclidiano, a partir da distância (ou da similaridade) entre eles. Utilizamos o software Primer 6 v.1.0.16 (Clarke 1993), optando pelo método de distâncias euclidianas.

Poisson Tree Process, PTP (Zhang et al. 2013)

Este método leva em conta o comprimento dos ramos (o número de substituições) para a estimativa do limite entre as espécies. Utilizamos o modo de *ML flavor* e enraizamos as árvores fornecidas com o grupo mais próximo de nosso *ingroup*, através de consulta à bibliografia (Bittner *et al.* 2011) e de acordo com a disponibilidade para cada marcador no banco de dados do Genbank.

Statistical Parsimony Network, SPN (Templeton et al. 1992)

Através deste método podemos visualizar a organização do conjunto de haplótipos em uma estimativa de *network* de um conjunto de dados, entre si e também por grupos (ou supostas espécies) que os unificam. Utilizamos o TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000).

Inferências filogenéticas

Objetivo: verificar as possíveis relações filogenéticas entre os gêneros e outros sub-agrupamentos dentro de Lithophylloideae.

Enquanto que alguns autores defendem que da reconstrução das árvores filogenéticas a partir de dados moleculares pode ser maximizada pelo aumento consecutivo no número de táxons incluídos (Bittner *et al.* 2011), outros afirmam que esta prática apenas diminui a acurácia da análise, sendo mais recomendado o aumento dos marcadores incluídos na análise (Rokas & Carroll, 2005). Optamos por incluir, nas matrizes para inferência filogenética, o maior número de haplótipos disponíveis, tanto para o país quanto para os do restante do globo, a

⁴ Muitos outros trabalhos utilizaram estes marcadores para a distinção de espécies, mas não avaliaram o valor ou intervalo encontrado para estes parâmetros.

partir do banco de dados do GenBank. Apesar de o foco ser Lithophylloideae, incluímos táxons dos outros grupos de Corallinophycideae que em conjunto pudessem incrementar o suporte para os ramos de nosso *ingroup*.

Inferir as relações filogenéticas para as espécies advém da escolha prévia de um modelo evolutivo que procure descrever, sob uma série de parâmetros, a forma como as sequências se alteraram ao longo do tempo, incluindo a frequência dos nucleotídeos e as taxas de cada tipo de substituição (transições e transversões). Também existem variações no método da escolha do melhor modelo. Os métodos de *Akaike Information Criterion* (AIC) e de *Bayesian Information Criterion* (BIC) são os mais utilizados atualmente, sendo relacionados, pois utilizam o mesmo critério estatístico. Eles buscam um equilíbrio entre o ajuste e a complexidade do modelo, penalizando o número de parâmetros envolvidos, sendo que a penalidade é maior com o BIC. Optamos pelo AIC.

“Ao selecionarmos modelos é preciso ter em mente que não existem modelos verdadeiros. Há apenas modelos aproximados da realidade, que causam perda de informações” Emiliano et al. (2010)

Máxima Verossimilhança (MV, ou Maximum Likelihood, ML, Guindon & Gascuel 2006)

Este método avalia a probabilidade de que os dados disponíveis (matriz) reflitam um processo histórico que teria sido regido por um determinado modelo evolutivo, sob a representação gráfica da topologia da árvore, incluindo o comprimento dos ramos. Tanto a busca pelo melhor modelo evolutivo por PhyML-aLRT (v.2.4.5., por Anisimova & Gascuel 2006; e sob o método de AIC), quanto a análise de MV foram realizados através do TOPALI 2.5 (Milne et al. 2004). O suporte para cada ramo foi computado pelo método de *Bootstrap* (500 repetições).

Inferência Bayesiana (IB, ou Bayesian Inference, BI, Huelsenbeck & Ronquist 2001)

Este método é matematicamente relacionado ao de MV; baseia-se no Teorema de Bayes, calculando-se as probabilidades *a posteriori* de que a hipótese evolutiva seja correta, através da informação proveniente dos dados observados, distribuições e valores prévios (Pereira, 2012).

Para a análise, utilizou-se duas cadeias de Markov através do método de Monte Carlo do programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) dentro do TOPALI v.2.5. Uma árvore foi extraída a cada 100 gerações por 5.000.000 gerações, começando-se por uma árvore aleatória, descartando-se as primeiras 1.000.000 gerações como *burnin*.

Análises dos marcadores moleculares combinados

É conhecido que a análise combinada (ou concatenada) de distintos marcadores moleculares tem o poder de incrementar a precisão da inferência filogenética (Rokas & Carroll, 2005), o que já foi verificado para Corallinophycideae (Broom et al. 2008; Bittner et al. 2011).

Para essas análises, sequências para dois ou mais marcadores devem ser provenientes de amplificações realizadas de um mesmo indivíduo. Desta forma, neste trabalho seguimos esta premissa e combinamos as sequências de marcadores diferentes obtidos sempre de um mesmo indivíduo coletado, além de apenas incorporar às análises concatenadas as sequências de trabalhos que adotaram a mesma prática (e.g. Broom et al. 2008; Bittner et al. 2011; Kato et al. 2011; Hind & Saunders 2013; Richards et al. 2014; Hernandez-Kantun et al. 2015). Utilizamos a análise concatenada no **Capítulo 5**, o que também já foi apresentado na forma de artigo (Torrano-Silva et al. 2014).

O melhor modelo evolutivo foi avaliado separadamente para cada marcador através do MrModeltest 2.2 (Nylander 2004). A checagem da inconsistência da associação dos marcadores escolhidos para a concatenação utilizou o *Incongruence-Length Difference Test* (ILD, Farris et al. 1994), através do PAUP (Swofford 2003). O “índice P” apontado é um indicador da compatibilidade da análise conjunta dos dados, de forma que estes aumentam a precisão da inferência quando o valor é maior que 0,01, mas são inconsistentes quando menores que 0,001 (Cunningham, 1997).

Apresentação das árvores

Os filogramas apresentados para as análises de agrupamento foram gerados pelo método de *NJ* através do MEGA 6.06 (l.c.). Para os resultados de inferência filogenética adotamos os filogramas obtidos por *MV* através do Topali 2.5 (l.c.). Os arquivos foram exportados e o layout foi ajustado para melhor exibição dos dados, sem alteração dos valores para escala, pelo FigTree v.1.3.1 (Rambaut 2009); o filograma foi novamente exportado e novamente editado sob a forma vetorial através do Inkscape v.0.48 (software livre, por diversos autores, “The Inkscape Team”; Bah 2011) recebendo os valores de suporte para cada ramo (quando acima de 70% para *NJ* e *MV*; e maior ou igual a 0,95 para *IB*).

ANÁLISE CONJUNTA DE DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

De cada “tipo morfológico”, selecionamos os mais variáveis quanto à morfologia, além dos que representaram os extremos geográficos, sendo submetidos aos testes de agrupamento iniciais com base nos marcadores moleculares (detalhados na sessão seguinte). Estes marcadores moleculares, por sua vez (e como já comentado), agruparam as amostras em *MOTUs*. Os *MOTUs* foram então confrontados com os “tipos morfológicos” obtidos através da morfologia, o que nos permitiu avaliar criticamente a validade de caracteres morfológicos tradicionalmente importantes. Este processo de comparação entre os resultados moleculares e morfológicos se deu de forma contínua, na medida que novas amostras foram coletadas e incluídas às análises. Seguiu-se a aplicação de diferentes testes de agrupamento baseados nos marcadores moleculares (detalhes na sessão seguinte). Baseado em um consenso dos métodos, foi feita a delimitação e caracterização das espécies, juntamente à comparação com os dados da bibliografia especializada para cada caso.

Capítulo 3

Espécies incrustantes

INTRODUÇÃO

Antes desta Tese conhecíamos oito espécies de Lithophylloideae com hábito incrustante para a costa brasileira: *Lithophyllum atlanticum*, *L. corallinae*, *L. depressum*, *L. johansenii*, *L. margaritae*, *L. stictaeforme*, *Titanoderma pustulatum* e *T. prototypum*. *Lithophyllum* e *Titanoderma* são encontrados sobre praticamente todo substrato consolidado das zonas de meso e infralitoral incluindo costões rochosos, recifes biogênicos, recifes de arenito e recifes mesofóticos. Esta variação de substrato também inclui outras algas, plantas e as carapaças e conchas de animais. A maioria destas espécies de algas também é encontrada em forma livre como rodolitos, formando bancos. No **Capítulo 1** revimos com mais detalhes a distribuição e o histórico do estudo destes organismos.

Também comentamos no **Capítulo 1** o fato de que é comum que as algas calcárias incrustantes não sejam incluídas nas investigações sobre a flora marinha no país, dada a peculiaridade das técnicas envolvidas, a dificuldade na observação dos caracteres taxonômicos e a acentuada plasticidade fenotípica deste grupo de algas. Apesar do número crescente de trabalhos realizados com estes organismos nos últimos 20 anos, ainda estamos longe de conhecer uma parcela considerável da diversidade encontrada na costa brasileira. Neste capítulo incrementamos este conhecimento, no que concerne às espécies incrustantes de Lithophylloideae.

As amostras foram coletadas ao longo da costa brasileira, entre o Ceará e Santa Catarina incluindo diversas porções insulares. Elas foram submetidas a variadas abordagens de investigação da diversidade específica, incluindo ferramentas morfológicas/anatômicas e moleculares, conforme descrito no **Capítulo 2**. Não apenas as amostras, mas também os métodos, passaram por avaliação de sua validade e aplicabilidade junto ao grupo.

OBJETIVOS DESTE CAPÍTULO

- Apontar e caracterizar as espécies incrustantes de Lithophylloideae no país com a aplicação conjunta de abordagens moleculares e morfológicas.
- Avaliar o uso de diferentes marcadores como ferramenta para a distinção de espécies (*DNA Barcodes*), incluindo COI-5P, UPA, *rbcL*-3P e *psbA*, sob distintas ferramentas de agrupamento (Tx.Div., ABGD, MDS, PTP e SPN), além dos aspectos de divergência intra e interespecífica e do *barcoding gap*.
- Comparar a diversidade encontrada no país com a que está incluída nos bancos de dados de sequências dos referidos marcadores moleculares para amostras oriundas de todo o mundo.
- Buscar novas relações filogenéticas dentro de Lithophylloideae, incluindo a validação dos gêneros atualmente aceitos e a relação entre eles. Ainda neste sentido, com o aumento do banco amostral para análise (com as sequências que produzimos), buscamos reforçar o conhecimento prévio das relações anteriormente publicadas, incluindo as que ainda passam por discussão.

METODOLOGIA ESPECÍFICA

Abaixo revemos brevemente a metodologia utilizada, descrevendo os detalhes da análise do conjunto amostral específico para o **Capítulo 4**. Para o detalhamento de cada metodologia, consultar o **Capítulo 2** (Metodologia Geral). Basicamente, os detalhes metodológicos que são específicos para este conjunto amostral são reflexo da composição das matrizes de dados utilizadas. As amostras incluídas neste capítulo também estão listadas no **Anexo 1**.

Morfologia e caracterização das espécies

Todas as etapas utilizadas para a caracterização morfológica e anatômica dos exemplares, bem como da comparação com a bibliografia especializada, encontram-se na sessão “identificação de espécies - morfologia”, do **Capítulo 2**.

Análises Moleculares

Análises de agrupamento para as espécies brasileiras

A produção das sequências consenso e a construção das matrizes seguem a sessão de “**inferências moleculares**” do **Capítulo 2**, assim como as características dos marcadores e métodos utilizados.

Especificamente para as análises de agrupamento, as matrizes foram compostas exclusivamente por sequências oriundas de material brasileiro, o que incluiu apenas as produzidas para esta Tese, já que não havia sequências brasileiras pretéritas disponíveis nos bancos de dados.

Utilizamos os marcadores UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P (**matrizes 1, 2, 3 e 4; Tabela III.1**). Para cada qual foi construída uma matriz de consensos, que foram submetidas a cinco métodos de agrupamento: Tx.Div., ABGD, MDS, PTP e SPN. A decisão final quanto à quantidade de espécies na costa brasileira levou em consideração a comparação dos resultados encontrados para todos os marcadores e para todos os métodos de análise (representando 20 pontos de vista distintos). Os casos conflitantes também foram observados sob os aspectos de valores de divergência e de verificação de *barcoding gap* suficiente.

A avaliação dos marcadores quanto a seu potencial como *DNA Barcodes* se deu pela capacidade de discriminação entre as espécies encontradas.

Comparação com dados do Genbank

Para esta etapa as matrizes foram construídas incluindo apenas um representante de cada haplótipo (dentre a variedade encontrada para a costa brasileira), além das sequências de outros pontos do globo, acessíveis através do banco de dados do Genbank. A repetição de um mesmo haplótipo para duas ou mais sequências estrangeiras retiradas do Genbank se deu apenas nos casos de provirem de regiões geográficas distintas (por exemplo, França e Irlanda)¹.

Não existem muitos dados disponíveis para os marcadores UPA, COI-5P e *rbcL*, enquanto que os maiores bancos de dados são o de SSU rDNA e, secundariamente, o de *psbA*.

Três marcadores são frequentemente utilizados para análises filogenéticas: *rbcL*, SSU rDNA e *psbA*. Apesar disto, por ora pudemos produzir apenas sequências parciais do marcador SSU rDNA para uma parte das espécies brasileiras coletadas para este trabalho.

As matrizes que incorporaram dados do Genbank foram submetidas às seguintes análises:

¹ Outra exceção se deu na matriz para SSU rDNA, pois, como as sequências que produzimos não estavam completas, tivemos que realizar cortes na matriz, de modo que é possível que houvessem divergências nas regiões de cortes. Assim, existem sequências idênticas para esta matriz, porém quando acessadas via GenBank estarão mais longas e divergentes entre si.

- NJ para os marcadores curtos, UPA e COI-5P (**matrizes 5 e 6; Tabela III.2**). Objetivo: busca por identidade de espécies.
- NJ, MV e IB para os marcadores mais longos, *psbA*, *rbcL*-3P, SSU rDNA (**matrizes 7, 8 e 9; Tabela III.2**). Objetivo: inferências filogenéticas. Para estas matrizes foram incluídas também as sequências que representam outros grupos de Corallinophycideae, buscando o incremento do suporte dos ramos dentro de Lithophylloideae. Apesar disto, não tivemos a intenção de discutir as relações filogenéticas em categorias hierárquicas mais abrangentes (fora do *ingroup*), por exemplo no que confere à relação de Lithophylloideae com as demais subfamílias de Corallinaceae. Estes aspectos já foram amplamente abordados em trabalhos anteriores (e.g. Bailey 1999; Bailey *et al.* 2004; Kato *et al.* 2011).

Tabela III.1. Características das matrizes produzidas para as diferentes análises realizadas.

Número da matriz	Marcador	Comprimento da matriz	Número de sequências	Outgroup (Genbank)	Análises realizadas	Figura
1	UPA	339 pb	57	<i>Spongites</i> sp. (HQ420978)*	NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	III.1
2	COI-5P	450 pb	24	<i>Spongites</i> sp. (HQ422715)*	NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	III.2
3	<i>psbA</i>	904 pb	36	<i>Spongites</i> sp. (JQ917419)*	NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	III.3
4	<i>rbcL</i> -3P	597 pb	38	<i>Calliarthron tuberculosum</i> (HQ322325)*	NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	III.4
5	UPA	339 pb	31	-	NJ	III.5
6	COI-5P	450 pb	28	-	NJ	III.6
7	<i>psbA</i>	709 pb	89	<i>Sporolithon durum</i> (DQ168023)	NJ, MV e IB	III.7
8	<i>rbcL</i> -3P	597 pb	67	<i>Mesophyllum vancouveriense</i> (HQ322337)	NJ, MV e IB	III.8
9	SSU rDNA	1036 pb	72	<i>Sporolithon ptychoides</i> (DQ629014)	NJ, MV e IB	III.9

* Apenas para a análise PTP

RESULTADOS

1. FERRAMENTAS MOLECULARES

1.1. Espécies no Brasil

Encontramos dez espécies de Lithophylloideae com hábito incrustante para a costa brasileira, sendo oito *Lithophyllum* e duas *Titanoderma*: *L. atlanticum*, *L. corallinae*, *L. cf. depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *L. Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *L. cf. margaritae*, *T. pustulatum* e *T. prototypum*.

Sua caracterização molecular e morfológica é dada nos itens a seguir.

Aplicação dos métodos de agrupamento, avaliação dos diferentes marcadores como DNA Barcodes e quantificação das espécies presentes

O êxito de amplificação por PCR variou bastante entre os marcadores. Desta maneira, não são todas as espécies que estão representadas por todos os marcadores. Não amplificamos amostras dos seguintes grupos para o UPA: *Titanoderma prototypum*, *Lithophyllum cf. margaritae*; para o COI-5P: *L. corallinae*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *L. cf. depressum* e *L. cf. margaritae*; *psbA*, *T. pustulatum* e *Lithophyllum* sp. 2; e *rbcl-3P*, *Lithophyllum* sp. 1 e *Lithophyllum* sp. 2.

Os valores de divergência par-a-par para cada marcador, tanto intraespecífica quanto interespecífica, assim como os valores de *barcoding gaps* encontrados, encontram-se na **Tabela III.2**.

As sequências previamente publicadas para *Lithophyllum* para a costa brasileira também foram incluídas na análise, sendo UPA e COI-5P para *L. atlanticum* e *L. margaritae* do Brasil (Vieira-Pinto *et al.*, 2014).

Os resultados encontrados para os diferentes métodos de agrupamento (Tx.Div., ABGD, MDS, PTP e SPN) estão sumarizados para cada marcador através das **Figuras III.1-4**. Nestas mesmas figuras incluímos a representação da conclusão tirada de cada marcador (indicada como “consenso”), de acordo com o que foi apontado pela maioria destes cinco métodos de agrupamento. Para os casos mais conflitantes recorreremos ao apoio dos valores de divergência (“intraespecífica” e “interespecífica”) e de *barcoding gap* (**Tabelas III.2 e 3**).

Sustentação das espécies através dos diferentes marcadores

Qual a quantidade mínima de dados (sequências) para cada espécie, para se embasar corretamente a inferência do número de espécies presentes em um conjunto de dados, utilizando os quatro métodos propostos? Embora não haja um valor pré-estabelecido para o número mínimo de amostras que representem um grupo molecular, podemos considerar que esse número não deva ser inferior a 3 (F. Gurgel, *com. pess.*). Apesar disto, para alguns casos de nosso conjunto de amostras isto não foi possível. Nos casos mais extremos, alguns grupos são representados por apenas uma sequência, indicando que se tratam de espécies menos frequentes² nos locais coletados: *Lithophyllum* sp. 2, *T. prototypum*, *T. pustulatum* – e *Lithophyllum* sp. 3 para três dos marcadores. Para a avaliação deste tipo de caso, algumas ponderações devem ser feitas:

- i. os valores de *barcoding gap* (par-a-par) que envolvem estes grupos devem ser observados com cautela, já que se baseiam em só espécime e, portanto, não existe valor de variação intraespecífica;
- ii. as espécies indicadas através dos métodos de agrupamento de ABGD, MDS e PTP tendem a ser sempre individualizadas quando compostas por uma só sequência, de modo que o critério de decisão deve basear-se nos outros métodos de agrupamento.

² O termo “espécies raras” não será utilizado. Consideramos que nos casos de espécies para as quais encontramos poucos representantes ainda exista a possibilidade que se distribuam [até mesmo em abundância] em áreas não incluídas neste trabalho, seja ao longo da extensa costa do país, seja crescendo a maiores profundidades.

Para *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *T. prototypum* e *T. pustulatum*, tanto os valores de distância interespecífica (**Tabela III.3**) quanto à topologia do filograma de NJ (**Figuras III.1-4**) indicam que se tratam de espécies distintas das demais.

Por outro lado, outras espécies são abundantemente representadas, indicando que são espécies mais frequentes. Este é o caso de *L. atlanticum*, que formou um grupo único com as sequências de UPA e COI-5P junto com as sequências anteriormente publicadas para *L. atlanticum*, para todos os métodos utilizados e com valores de divergência intraespecífica nulos, representando uma única espécie. O mesmo ocorre para *Lithophyllum* sp. 4, que apesar de ser uma espécie nova, inclui vários indivíduos coletados.

Lithophyllum corallinae e *L. cf. margaritae* são espécies distintas através da metade dos métodos utilizados (comparação disponível para *psbA* e *rbcl*-3P). Apesar de relacionadas, a divergência entre estas duas espécies é de 4,42-4,54% com o *psbA* e 6,53-7,87% com o *rbcl*-3P, valores relativamente elevados para que fossem uma variação intraespecífica. Os valores de *barcoding gap* também indicam a distinção destes dois grupos, sendo de 2,35 para *psbA* e 3,25 para *rbcl*-3P. Deste modo, *L. corallinae* e *L. cf. margaritae* são consideradas espécies distintas entre si.

Os marcadores UPA e COI-5P permitiram a comparação de *L. corallinae* com as amostras brasileiras de *L. margaritae* retiradas do Genbank. Enquanto que estes dois clados se agrupam através de parte das análises realizadas com o UPA, eles se mantêm sempre separados com o uso do COI-5P – apesar de estarem proximamente relacionados. Quando utilizamos os valores de divergência entre *L. corallinae* e as amostras brasileiras de *L. margaritae* retiradas do Genbank, ambos os marcadores indicam a separação destes clados, encontrando 2,1-3% (2-6 pb) para o UPA e 7,11-7,33% para o COI-5P. O valor de *barcoding gap* entre estas duas espécies utilizando o COI-5P é bastante elevado (32,32), enquanto que para o UPA, apesar de baixo (1,17), também é suficiente para suportar a separação das espécies. De acordo com o método proposto, apesar da proximidade molecular entre *L. corallinae* e *L. margaritae* do Brasil, estas são espécies distintas baseando-nos em 7/10 das análises feitas (além dos valores de distância e de *barcoding gap*).

Lithophyllum sp. 1 é uma nova espécie, proposta para dois conjuntos de haplótipos proximamente relacionados, que daqui em diante referidos como *Lithophyllum* sp. 1(1) e *Lithophyllum* sp. 1(2). Se verifica uma alternância entre sua separação e seu agrupamento em uma única espécie, de acordo com o método, utilizando o UPA e o *psbA*. Apesar disto, 6/10 das análises sugerem que estes haplótipos devem pertencer a uma única espécie. A divergência par-a-par entre eles é de 1,5% (5 bp) para UPA e 1,11% para *psbA*; estes valores indicam que não se trata de uma mesma espécie, apesar de o valor de divergência encontrado para o *psbA* ainda estar abaixo do que é comum se encontrar como divergência entre espécies (**Tabela III.3**). O *barcoding gap* não pôde ser calculado, já que não encontramos variação intraespecífica para *Lithophyllum* sp. 1(2) com o UPA e com o *psbA*, ao mesmo tempo em que *Lithophyllum* sp. 1(1) foi representado por apenas uma sequência para o *psbA*. O reduzido número de amostras para *Lithophyllum* sp. 1(1) e para *Lithophyllum* sp. 1(2) poderia nos levar à afirmação premeditada da inexistência de outros haplótipos para esta espécie, que ainda não foram coletados. Também não está muito clara a tendência geral das metodologias de agrupamento em indicar a união ou não destes grupos, que se unem em 6/10 destas abordagens. Devemos destacar o fato que as amostras de *Lithophyllum* sp. 1(1) e *Lithophyllum* sp. 1(2) têm uma distribuição bastante específica na costa, além de existir um grande distanciamento geográfico e ambiental entre estes dois subgrupos: *Lithophyllum* sp. 1(1) foi coletado em bancos de rodolitos de Fernando de Noronha, enquanto que *Lithophyllum* sp. 1(2) foi encontrado crescendo aderido a recifes biogênicos na costa do Espírito Santo – uma distância de aproximadamente 2.000 km. Desta maneira, a distância geográfica pode explicar pelo menos parte da divergência genética encontrada entre essas amostras. Os dados moleculares nos compelem a considerar uma única espécie para estes dois grupos moleculares, acrescido ao fato de não termos encontrado distinções morfológicas/anatômicas associadas a esta distinção. Uma melhor discussão quanto aos aspectos morfológicos/anatômicos se encontra na sessão específica (item “Descrição morfológica das espécies”, dentro da sessão 2, “Caracterização morfológica e anatômica das espécies”).

Tabela III.2. Relação dos valores de diversidade intraespecífica (diagonal amarela), de distância interespecífica (abaixo da diagonal) e de *barcoding gap* (acima da diagonal) entre as espécies de Lithophylloideae incrustantes encontrados para a costa do Brasil. (-) indica grupos que não foram amplificados para o marcador; (na) indica os grupos representados por apenas uma sequência (valor de divergência intraespecífica “não aplicável”); (x) indica os valores de *barcoding gap* que não puderam ser calculados (pela ausência de diversidade intraespecífica em ambos os grupos). “*Lithophyllum atlanticum* bibliografia” e “*L. margaritae* bibliografia” se referem às sequências publicadas para a costa brasileira por (Vieira-Pinto *et al.* 2014), que foram incluídas para fins de comparação da identidade das espécies.

UPA		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>L. atlanticum</i>	0	5	x	x	x	x	x	8	-	x	-	0	x
2	<i>L. corallinae</i>	8-9,6	0,9-1,8 %	4,6*	3,3*	4*	4,3*	5,3*	10	-	4*	-	5	x
3	<i>T. pustulatum</i>	8,1	8,4-9	na	x	x	x	x	9,3*	-	x	-	x	x
4	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(1)	6	8,1-9	7,8	0	x	x	x	8,6	-	x	-	x	x
5	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(2)	6,9	7,2-8,1	7,5	1,5	0	x	x	7,3	-	x	-	x	x
6	<i>Lithophyllum</i> sp. 2	5,1	7,8	9,6	6,3	6	na	x	8,6	-	x	-	x	x
7	<i>Lithophyllum</i> sp. 3	6	9,6-10,2	9,9	8,1	7,8	6,6	na	7,3*	-	x	-	x	x
8	<i>Lithophyllum</i> sp. 4	7,2-7,5	9-10,8	8,4-9	7,8-8,1	6,6-7,2	7,8-8,1	6,6	0-0,9 %	-	12,3*	-	x	x
9	<i>T. prototypum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	8,7	7,2-8,7	11,4	11,7	11,4	10,8	10,2	11,1-11,7	-	0	-	x	x
11	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>L. atlanticum</i> bibliografia	0	9-9,6	8,1	6	6,9	5,1	6	7,5	-	7,2-8,7	-	0	7,5
13	<i>L. margaritae</i> bibliografia	7,5	2,1-3	7,2	7,5	7,2	8,1	8,7	8,7	-	8,0	-	7,5	0
COI-5P		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>L. atlanticum</i>	0-0,4 %	30,8*	30,3*	-	33,3*	-	30,8*	11,6	39,4*	31,3*	-	0	30,8
2	<i>L. corallinae</i>	13,5	na	x	-	x	-	x	12*	x	x	-	x	32,3
3	<i>T. pustulatum</i>	13,3	14,4	na	-	x	-	x	9,8*	x	x	-	x	59,6
4	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(2)	14,7	15,3	12,7	-	0	-	x	12	x	x	-	x	65,6
6	<i>Lithophyllum</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Lithophyllum</i> sp. 3	13,5	13,8	12,2	-	13,3	-	na	11,2*	x	x	-	x	58,6
8	<i>Lithophyllum</i> sp. 4	12,9-14,7	13,3	10,9-11,8	-	13,3-14,7	-	12,4-14,7	0-1,1 %	14,6*	11*	-	11,6	10,2
9	<i>T. prototypum</i>	17,3-17,5	15,8	17,5	-	18,2	-	18,2	16,2-17,1	na	x	-	x	71,7
10	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	13,8-14	12,2	11,1	-	13,1	-	13,5	12,2-13,1	15,3	na	-	x	49,5
11	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>L. atlanticum</i> bibliografia	0-0,4	13,5	13,3	-	14,7	-	13,5	12,9-14,7	17,5	14	-	0	61,6
13	<i>L. margaritae</i> bibliografia	13,5-13,8	7,1-7,3	13,1-13,3	-	14,4-14,7	-	12,9-13,1	11,3-13,3	15,8-16	10,9-11,1	-	13,5-13,8	0,2

Tabela III.2. (continuação)

psbA		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>L. atlanticum</i>	0-0,3 %	5,73	-	35,5*	35,5*	-	35,2*	32,2	41,2*	38,2*	32,8*
2	<i>L. corallinae</i>	10,9-11,8	1,9 %	-	4,4*	4,6*	-	5,3*	5	6,3*	2,3*	2,3*
3	<i>T. pustulatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(1)	11,7-11,8	8,3-8,4	-	na	x	-	x	48,3*	x	x	x
5	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(2)	11,7-11,9	8,6-8,8	-	1.1	0	-	x	49,3*	x	x	x
6	<i>Lithophyllum</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Lithophyllum</i> sp. 3	11,6-11,8	9,9-10,3	-	10,6	10,8	-	na	56,3*	x	x	x
8	<i>Lithophyllum</i> sp. 4	10,6-10,9	9,4-9,9	-	9,4	9,9-10,2	-	12,4	0-0,2 %	55,8*	49,8*	46,3*
9	<i>T. prototypum</i>	13,6-13,8	11,8-12,5	-	12,6	12,3	-	11,9	12,3-12,4	na	x	x
10	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	12,6-12,8	9,3-10,3	-	13	11,1-12,7	-	11,2	10,9-11,6	10,9	0	x
11	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	10,8-11	4,4-4,5	-	9,1	9,2	-	9,5	10,2	12,4	9,3	0
rbcl-3P		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>L. atlanticum</i>	0-0,7 %	7,3	24,7	-	-	-	23,2*	24,5	24*	24*	20,2
2	<i>L. corallinae</i>	14,7-15,7	1-2 %	9,0	-	-	-	8,1*	8,2	9,2*	6,7*	3,2
3	<i>T. pustulatum</i>	16,6-16,9	18,1-18,9	na	-	-	-	x	39,9*	x	x	94,6*
4	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Lithophyllum</i> sp. 1(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Lithophyllum</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Lithophyllum</i> sp. 3	15,6-15,7	16,2-16,9	19,9	-	-	-	0	33,8*	x	x	85,7*
8	<i>Lithophyllum</i> sp. 4	16,4-16,9	13,9-14,7	18,2-18,6	-	-	-	16,9-17,1	0-0,5 %	37,8*	36,5*	26,5
9	<i>T. prototypum</i>	16,1-16,2	18,4-18,9	17,4	-	-	-	18,1	18,9	na	x	104,5*
10	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	16,1-16,4	13,6-14,1	17,7	-	-	-	16,9	18,2-18,4	18,7	0	110,3
11	<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	13,6-14,4	6,5-7,9	16,1-16,2	-	-	-	14,6	13,2-13,6	17,7-17,9	14,6	0-0,2 %

UPA

Figura III.1. Análises de agrupamento com o marcador UPA para as espécies incrustantes de Lithophylloideae da costa brasileira. À esquerda, filograma de agrupamento obtido pelo método de NJ; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas. Cada coluna em cinza indica uma hipótese de espécie, resultado de cada um dos cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP). Com base no resultado dos cinco métodos, além dos valores de divergência e de *barcoding gap*, a barra em laranja (à direita) indica o que consideramos como “consenso” para a delimitação das espécies. Abreviaturas: IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); IPal, Ilha de Palmas (SP); AAlc, Arquipélago de Alcatrazes (SP); IR, Ilha da Rapada (SP); IXa, Ilha do Xavier, SC; IArv, Ilha do Arvoredo (SC); TR, Ilha da Trindade (ES); AB, Abrolhos (Bahia); FN, Arq. Fernando de Noronha (PE).

COI-5P

Figura III.2. Análises de agrupamento com o marcador COI-5P para as espécies incrustantes de Lithophylloideae da costa brasileira. À esquerda, filograma de agrupamento obtido pelo método de NJ; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas. Cada coluna em cinza indica uma hipótese de espécie, resultado de cada um dos cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP). Com base no resultado dos cinco métodos, além dos valores de divergência e de *barcoding gap*, a barra em laranja (à direita) indica o que consideramos como “consenso” para a delimitação das espécies. Abreviaturas: IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); IArv, Ilha do Arvoredo (SC); TR, Ilha da Trindade (ES); FN, Arq. Fernando de Noronha (PE).

psbA

Figura III.3. Análises de agrupamento com o marcador *psbA* para as espécies incrustantes de Lithophylloideae da costa brasileira. À esquerda, filograma de agrupamento obtido pelo método de NJ; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas. Cada coluna em cinza indica uma hipótese de espécie, resultado de cada um dos cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP). Com base no resultado dos cinco métodos, além dos valores de divergência e de *barcoding gap*, a barra em laranja (à direita) indica o que consideramos como “consenso” para a delimitação das espécies. Abreviaturas: IGde, Ilha Grande (RJ); AAlc, Arquipélago de Alcatrazes (SP); IArv, Ilha do Arvoredo (SC); TR, Ilha da Trindade (ES); FN, Arq. Fernando de Noronha (PE).

rbcl

Figura III.4. Análises de agrupamento com o marcador *rbcl*-3P para as espécies incrustantes de Lithophylloideae da costa brasileira. À esquerda, filograma de agrupamento obtido pelo método de NJ; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas. Cada coluna em cinza indica uma hipótese de espécie, resultado de cada um dos cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP). Com base no resultado dos cinco métodos, além dos valores de divergência e de *barcoding gap*, a barra em laranja (à direita) indica o que consideramos como “consenso” para a delimitação das espécies. Abreviaturas: IGde, Ilha Grande (RJ); IArv, Ilha do Arvoredo (SC); Bind, Banco do Índio (ES); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); TR, Ilha da Trindade (ES); FN, Arq. Fernando de Noronha (PE).

Comparação do desempenho dos marcadores como *DNA Barcodes*

Conforme comentado anteriormente, parte das espécies encontradas não foi representada por sequências para todos os quatro marcadores. Já *L. atlanticum* e *Lithophyllum* sp. 4 foram abundantemente representados em todos os marcadores.

Os cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP) agruparam as sequências produzidas para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P) de maneira muito similar (**Figuras III.1-4**). As exceções envolvem espécies com grande diversidade intraespecífica (como *L. corallinae*), que acabam agrupando-se com os grupos imediatamente vizinhos com o método de ABGD (no caso, *Lithophyllum* cf. *margaritae* ou as sequências anteriormente publicadas como *L. margaritae* para o Brasil), o que é compreensível já que este método se baseia na magnitude dos *barcoding gaps*, que apresentam valores reduzidos quando existe uma grande diversidade intraespecífica.

Os quatro marcadores empregados proporcionaram alto valor de suporte através do método de NJ para todas as espécies encontradas, variando de 96 a 99% com o UPA, 99 a 100% com o *psbA* e sempre 100% com o COI-5P e o *rbcL*-3P.

Lithophyllum corallinae, conforme vem sendo notado, provoca um viés nos três parâmetros aqui analisados (divergências intra e interespecífica e *barcoding gap*). Vimos que esta espécie é proximamente relacionada a *L. cf. depressum*, *L. cf. margaritae* e as sequências anteriormente publicadas como *L. margaritae* para o Brasil (**Figuras III.1-4; Tabela III.2**). De fato, estes quatro grupos são relacionados, formando um ramo à parte nas análises de NJ. Seria necessária uma investigação mais aprofundada sobre este grupo de espécies para o esclarecimento da existência ou não de um divisor representativo entre elas, incluindo um grupo mais representativo de amostras. Enquanto isto, indicaremos os valores relacionados a *L. corallinae* à parte (**Tabela III.3**), seguindo com os comentários a respeito dos marcadores através do que foi encontrado para o restante das espécies.

Os valores de divergência intra e interespecífica estão sumarizados e comparados com a bibliografia na **Tabela III.3**, bem como os valores para *barcoding gap*.

Tabela III.3. Valores de divergência INTRAespecífica e INTERespecífica (%) para aos marcadores encontrados, pareados aos valores encontrados para Florideophycideae na bibliografia disponível. Incluímos: Saunders 2005, Cassano 2009, Clarkston & Saunders 2010, Freshwater *et al.* 2010; Gabrielson *et al.* 2011; Milstein *et al.* 2011; Hind & Saunders 2013, Iha 2014, Nauer 2014, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014³. Os dados para *rbcL* foram computados a partir de matrizes com tamanhos bastante distintos entre os trabalhos publicados, passando de 293 pb (Sissini *et al.* 2014) a 1401 pb (Gabrielson *et al.* 2011), o que pode envolver taxas distintas de evolução.

Marcador	Divergência INTRAespecífica	Divergência INTERespecífica	Barcoding gap	Bibliografia: divergência INTRAespecífica	Bibliografia: divergência INTERespecífica
COI-5P	0-1,1%	10,9-18,2%	11-71,7	0-2,6%	3,3-18,2%
UPA	0-0,9(1,8 ^{obs})%	(2,10 ^{obs})5,1-11,7%	(1,2 ^{obs})7,3-12,3	0-0,8%	0,6-8,4%
<i>psbA</i>	0-0,3(1,9 ^{obs})%	(4,4 ^{obs})9,1-13,8%	(2,3 ^{obs})32,2-56,3	0-0,3%	2,5-13,1%
<i>rbcL</i>	0-0,7(1-2 ^{obs})%	(6,5 ^{obs})13,6-19,9%	(3,2 ^{obs})20,2-110,3	0-0,7%	(0,57) 0,9-12; (qualquer valor >2 para Freshwater <i>et al.</i> 2010)

^{obs} Os valores atípicos, entre parênteses, estão relacionados a *L. corallinae*.

³ Muitos outros trabalhos utilizaram estes marcadores para a distinção de espécies, mas não avaliaram o valor ou intervalo encontrado para estes parâmetros.

Divergência INTRAespecífica

Os quatro marcadores apresentaram intervalos de valor de divergência intraespecífica dentro do que é conhecido para as algas vermelhas em geral (**Tabela III.4**). Porém isto só acontece quando se exclui *L. corallinae* da análise, sendo um grupo molecularmente muito diverso, de forma que para ele nem mesmo encontramos haplótipos iguais para um mesmo marcador. A amplitude de distribuição das amostras desta espécie na costa reforça essa possibilidade, de Alagoas até São Paulo, incluindo o isolamento das populações por barreiras diversas ao longo da costa, o que poderia agir como fator gerador de diferenciação de espécies (Oliveira 1977). Outra possibilidade é a de que este seja um grupo no qual a diferenciação molecular se dá de forma mais acelerada. Apesar disso, não poderemos confirmar esta hipótese com os dados atuais, apenas com um aprofundamento na investigação molecular para *L. corallinae*, incluindo a coleta de mais indivíduos.

O marcador UPA foi bastante conservador, de forma que não encontramos qualquer divergência intraespecífica para *L. atlanticum*, enquanto que para *Lithophyllum* sp. 4 pouca variação foi encontrada, para apenas duas das 18 sequências produzidas (**Figura III.1**). Existe uma discrepância quando comparamos a divergência intraespecífica apontada por outros marcadores para estas duas espécies: a de *L. atlanticum* foi maior com o *rbcl*-3P, seguido pelo COI-5P e do *psbA*, enquanto que para *Lithophyllum* sp. 4 esta divergência foi maior com o COI-5P, seguido pelo *rbcl*-3P e por último a do *psbA* (**Tabela III.2**).

Em comparação com os resultados encontrados anteriormente para algas calcárias (Hind & Saunders 2013, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014), os valores que encontramos aqui são iguais usando o COI-5P e o *psbA*; porém é pela primeira vez que observamos valores maiores que zero para algas calcárias utilizando o UPA e o *rbcl*.

Divergência INTERespecífica

Os valores de divergência interespecífica encontrados com os quatro marcadores foram bastante representativos, partindo de valores mínimos mais elevados do que é comum se encontrar na bibliografia (**Tabela III.3**).

Em comparação com os resultados encontrados anteriormente para algas calcárias (Hind & Saunders 2013, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014), os valores que encontramos estão dentro do que é conhecido para COI-5P, porém são maiores com o *psbA*.

Barcoding gap

Considerando-se que o valor mínimo de *barcoding gap* deve ser 1 (Freshwater *et al.* 2010), os valores que encontramos para todos os marcadores, sejam COI-5P (9,8-39,4), UPA (4-12,3), *psbA* (32,2-56,3) e *rbcl*-3P (20,2-110,4) indicam que as espécies identificadas neste trabalho são distintas entre si.

Não encontramos valores de *barcoding gap* para comparação na bibliografia disponível para algas coralináceas, com os quais pudéssemos comparar os que encontramos para Lithophylloideae. Desta forma, esta é a primeira vez que estes valores são apresentados.

Comparação com dados do Genbank

Comparamos as espécies coletadas no Brasil com as sequências produzidas a partir de amostras coletadas fora do país (retiradas do Genbank) através da análise de Tx.Div. e NJ (para UPA e COI-5P, **Figuras III.5-6**) ou de [Tx.Div.+NJ]+MV+IB (para *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA, **Figuras III.7-9**). Os detalhes para cada matriz foram previamente apresentados na **Tabela III.1**, enquanto que a súmula da comparação entre os grupos-irmãos encontrados está na **Tabela III.4** e são discutidos a seguir, para cada marcador.

As matrizes feitas a partir dos marcadores *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA também foram utilizadas para a observação de novas inferências filogenéticas em Lithophylloideae, conforme veremos no item seguinte (**1.2 - Aspectos filogenéticos**).

UPA (Figura III.5)

. Entre *Lithophyllum* sp. 1(1) e *L. insipidum* do Havaí (vouchers ARS02573, ARS02818, ARS02347 e ARS02358): existe uma divergência de 1,47-1,77%, que está acima do intervalo de divergência intraespecífica que encontramos entre as amostras brasileiras (0-0,9%, **Tabela III.3**).

. Entre *L. corallinae*, *L. margaritae* do México (IBC2647) e *L. margaritae* previamente referidas para o Brasil (KP192381 e KP192380): conforme comentado anteriormente, a divergência de 2,1-2,9% (7-10 pb) entre *L. corallinae* e *L. margaritae* publicadas para o Brasil (Vieira-Pinto *et al.* 2014) é relativamente elevada para esse marcador. Este valor é menor quando a comparação é feita com o exemplar coletado no México, com 0,88-1,77% (3-6 pb), mas ainda assim está acima do que é comum para os valores de divergência intraespecífica que costumam ser aceitos com o uso deste marcador (**Tabela III.3**). Vale colocar que o material mexicano foi coletado na Bahía de Concepción, longe do local Tipo de *L. margaritae*.

. Entre *Lithophyllum* sp. 1(2) e *L. insipidum* do Havaí (vouchers ARS02573, ARS02818, ARS02347 e ARS02358): a divergência é de 0,59-1,47% (2-5 pb), que é o mesmo que encontramos como divergência entre *Lithophyllum* sp. 1(1) e *Lithophyllum* sp. 1(2) (1,47%), que consideramos uma espécie única. Apesar disto, a divergência encontrada entre *Lithophyllum* sp. 1(2) e o mesmo voucher de *L. insipidum* do Havaí para o COI-5P (6,4-6,7%) indica a separação de espécies.

. Entre *Lithophyllum* cf. *depressum* e *L. kotschyanum* (HQ421552): a divergência entre estes dois grupos é de apenas 0,29% (1 pb). O valor de divergência para o COI-5P de *L. kotschyanum*, amplificado a partir do mesmo voucher (**Tabela III.4**), também não chega próximo ao valor comum para a divergência interespecífica no grupo. Este é um caso em que a comparação é inconclusiva, pois ao mesmo tempo em que a divergência entre as duas espécies é baixa, não temos acesso a outros dados que indiquem se estamos lidando com uma única espécie ou não, o que exigiria um aprofundamento maior quanto à variedade de marcadores utilizados e também de conjunto amostral envolvido.

COI-5P (Figura III.6)

. Entre as amostras que coletamos para *L. atlanticum* e as previamente publicadas para o Brasil (KP192393): assim como o que encontramos com o UPA, o COI-5P também indica que estes grupos pertencem a uma mesma espécie, com uma divergência de apenas 0-0,44%.

. Entre *L. corallinae* e *L. margaritae* do Brasil (KP192398 e KP192397): a divergência entre estes dois grupos é de 7,11-7,33%, o que é bastante elevado quando comparado com os valores conhecidos de divergência intraespecífica com este marcador (**Tabela III.3**).

. Entre *Lithophyllum* sp. 1(2) e *L. insipidum* (HQ422710 e HQ423068) (não amplificamos COI-5P para *Lithophyllum* sp. 1(1)): diferente do que foi apontado com o UPA, o COI-5P indica uma divergência de 6,44-6,67% (29-30 pb), apontando mais claramente que se tratam de espécies distintas.

. Entre *Lithophyllum* cf. *depressum* e *L. kotschyanum* (HQ423072). A divergência encontrada é de 2,22%. Conforme comentado acima, na mesma comparação utilizando o UPA, não há como resolver esta semelhança a partir dos dados atuais.

PsbA (Figura III.7)

. Entre as amostras que coletamos para *L. atlanticum* e *L. margaritae* do México (apenas JQ896235): os valores de divergência encontrados indicam a proximidade desses dois grupos (3,67 a 3,81%), mas não está claro se podem ou não ser consideradas espécies distintas (ver os valores para comparação na **Tabela III.3**).

. Entre *L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *margaritae* e *L. margaritae* do México (apenas JQ896253): a divergência entre *L. corallinae* e *Lithophyllum* cf. *margaritae* é de 4,37-4,8%; entre *L. corallinae* e *L. margaritae* do México é de 1,27-1,83%; e entre *Lithophyllum* cf. *margaritae* e *L. margaritae* do México é de 4,09%. Estes valores são elevados, sugerindo serem três espécies distintas. A maior proximidade é entre *L. corallinae* e *L. margaritae* do México, novamente dificultando a questão se são ou não pertencentes à mesma espécie (ver os valores para comparação na **Tabela III.3**). Lembrando que a divergência entre estes dois grupos através do UPA e do COI-5P foi bastante elevada, concluímos que *L. corallinae* e este haplótipo específico de *L. margaritae* do México são espécies bastante relacionadas, porém distintas.

. Entre *Lithophyllum* sp. 4 e *L. kotschyannum* do Japão (AB576029 e AB576030): A divergência entre estes dois grupos é de 7,62-7,9%, indicando serem espécies distintas.

. Entre *Lithophyllum* cf. *depressum* e outro *L. kotschyannum* do Japão (AB576031): esta diferente amostra de *L. kotschyannum* é semelhante a *Lithophyllum* cf. *depressum*, apresentando apenas 0,42% de divergência, indicando que provavelmente pertencem a uma mesma espécie.

RbcL-3P (Figura III.8)

Nenhuma afinidade foi encontrada com as sequências depositadas no banco.

SSU rDNA (Figura III.9)

. Entre as amostras que coletamos para *L. atlanticum*, as sequências previamente publicadas para a mesma espécie (KP192389 e KP192390) e *L. margaritae* do México (apenas JQ896262). Os valores de divergência entre estes três grupos é de: 0,19-0,29% entre as amostras atuais e as sequências previamente publicadas para *L. atlanticum*; 0,29% entre as amostras que coletamos para *L. atlanticum* e *L. margaritae* do México; e de 0,48-0,58% entre as sequências anteriores para *L. atlanticum* e *L. margaritae* do México. Estes valores indicam que as novas sequências de *L. atlanticum* pertencem à mesma espécie que as apresentadas durante a proposta de criação de *L. atlanticum* e também à do voucher GALW15764 de *L. margaritae* do México. O fato de que estas duas últimas espécies têm um valor mediano para divergência entre si (0,48-0,58%) indica que estes sejam três subgrupos de uma única espécie, em processo incompleto de especiação. Isto é reforçado pela comparação que fizemos com o *psbA*, entre as amostras que coletamos para *L. atlanticum* e o mesmo voucher GALW15764.

. Entre *Lithophyllum* sp. 1(1) e *L. insipidum* (DQ628977). São sequências idênticas, tratando-se da mesma espécie.

. Entre *Lithophyllum* sp. 4, *L. kotschyannum* do Japão (AB576008 e AB576010) e *L. kotschyannum* do Havaí (DQ628974 e DQ628975). A divergência de *Lithophyllum* sp. 4 com estes dois grupos é de 0,77-0,87%, indicando serem espécies distintas.

. Entre *Lithophyllum* cf. *depressum*, *L. kotschyannum* do Japão (AB576009 e AB576011) e *L. cf. kotschyannum* do Havaí (DQ628976). Não existe divergência entre estes três grupos, confirmando que se tratam de uma mesma espécie.

. Entre *Lithophyllum* cf. *margaritae*, *L. margaritae* do México (apenas JQ896280) e a sequência previamente reportada como *L. margaritae* do Brasil (KP192392). As sequências são idênticas, tratando-se de uma única espécie. Apesar disto, iremos nos referir aos espécimes brasileiros como *Lithophyllum* cf. *margaritae*, dado o impasse atual sobre qual sequência (do Genbank) representaria verdadeiramente a espécie *L. margaritae*, conforme detalharemos mais adiante – conferir no item “observações” da descrição morfológica de *Lithophyllum* cf. *margaritae*.

Tabela III.4. Comparação entre as amostras que coletamos para a costa brasileira e as sequências disponíveis (Genbank) mais similares. Os números de *voucher* permitem o cruzamento dos dados de comparação encontrados com diferentes marcadores, no caso de a amplificação ter sido feita a partir dos mesmos espécimes.

Espécie	Nome referido às sequências afins (Genbank)	Local de coleta dos vouchers	Marcadores	Número dos vouchers	Valores de divergência (par a par)	Interpretação
<i>L. atlanticum</i>	<i>L. atlanticum</i>	Brasil, SC e RS	UPA	FLOR 14568 e FLOR 14576	0%	mesma espécie;
	<i>L. atlanticum</i>	Brasil, SC e RS	COI-5P	FLOR 14567	0-0,44%	mesma espécie;
	<i>L. atlanticum</i>	Brasil, SC e RS	SSU rDNA	FLOR 14576 e FLOR 14566	0,19-0,29%	mesma espécie;
	<i>L. margaritae</i>	México, Isla de San José	<i>psbA</i>	GALW15764	3,67-3,81%	?
	<i>L. margaritae</i>	México, Isla de San José	SSU rDNA	GALW15764	0,29%	mesma espécie.
<i>L. corallinae</i>	<i>L. margaritae</i>	Brasil, SC	UPA	FLOR 14580 e FLOR 14581	2,06-2,95% (7-10 pb)	diferentes;
	<i>L. margaritae</i>	Brasil, SC	COI-5P	FLOR 14570 e FLOR 14571	7,11-7,33%	diferentes;
	<i>L. margaritae</i>	México, La Paz	<i>psbA</i>	GALW15767	1,27-1,83%	?
	<i>L. margaritae</i>	México, Bahía de Concepción	UPA	(IBC2647)	0,88-1,77% (3-6 pb)	diferentes.
<i>Lithophyllum</i> sp. 1(1 e 2)	<i>L. insipidum</i>	Havaí	UPA (para <i>Lithophyllum</i> sp. 1(1 e 2))	ARS02347, ARS02818 e ARS02358	0,59%-1,77% (2-6 pb)	diferentes;
	<i>L. insipidum</i>	Havaí	COI-5P (para <i>Lithophyllum</i> sp. 1(2))	ARS02347 e ARS02818	6,44-6,67%	diferentes;
	<i>L. insipidum</i>	Havaí	SSU rDNA (para <i>ithophyllum</i> sp. 1(1))	BISH683170	0%	mesma espécie.
<i>Lithophyllum</i> sp. 4	<i>L. kotschyanum</i>	Japão	<i>psbA</i>	RYUA0001 e RYUA0006	7,62-7,9%	diferentes;
	<i>L. kotschyanum</i>	Japão	SSU rDNA	RYUA0005 e RYUA0006	0,77%	diferentes;
	<i>L. kotschyanum</i>	Havaí	SSU rDNA	BISH683245 e BISH683166	0,77-0,87%	diferentes.
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	<i>L. kotschyanum</i>	Havaí	UPA	ARS02355	0,29% (1 pb)	mesma espécie;
	<i>L. kotschyanum</i>	Havaí	COI-5P	ARS02355	2,22%	?
	<i>L. kotschyanum</i>	Japão	<i>psbA</i>	RYUA0008	0,42%	mesma espécie.
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>margaritae</i>	<i>L. margaritae</i>	Brasil, SC	SSU rDNA	FLOR 14571	0%	mesma espécie;
	<i>L. margaritae</i>	México, La Paz	SSU rDNA	GALW15767	0%	mesma espécie;
	<i>L. margaritae</i>	México, La Paz	<i>psbA</i>	GALW15767	4,09%	diferentes.

UPA

Figura III.5. Filograma de agrupamento com o marcador **UPA** gerado por NJ, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. A distância entre os terminais foi calculada através do número de substituições; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas (apenas valores ≥ 70 são mostrados). A análise foi feita através da matriz de dados número 5, cujas características foram discriminadas na **Tabela III.1**.

COI-5P

Figura III.6 Filograma de agrupamento com o marcador **COI-5P** gerado por NJ, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. A distância entre os terminais foi calculada através do número de substituições; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas (apenas valores ≥ 70 são mostrados). A análise foi feita através da matriz de dados número 6, cujas características foram discriminadas na **Tabela III.1**.

Figura III.7. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador **psbA**, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de seqüências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As seqüências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma seqüência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ/MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 7, cujas características estão discriminadas na **Tabela III.1**.

Figura III.8. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador **rbcl-3P**, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de seqüências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As seqüências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma seqüência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ;MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 8, cujas características estão discriminadas na **Tabela III.1**.

Figura III.9. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador **SSU rDNA**, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de seqüências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As seqüências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma seqüência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ/MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 9, cujas características estão discriminadas na **Tabela III.1**.

1.2. Aspectos filogenéticos

O suporte para Lithophylloideae apareceu nas três reconstruções filogenéticas (**Figuras III.7-9**).

Paulsilvella vem de um ramo que divergiu mais precocemente na subfamília (“ramo basal”) em duas das três reconstruções (*rbcl*-3P e SSU rDNA), apesar de não encontrarmos valores significativos de suporte (NJ, MV ou IB).

Também com estas duas reconstruções (*rbcl*-3P e SSU rDNA) encontramos o mesmo padrão de subdivisões de Lithophylloideae, de forma que as sequências se agruparam em dois grandes ramos, que chamamos de A e B (**Figuras III.8-9**).

Para o ramo **A** existe suporte filogenético através das três metodologias de inferência (NJ, MV e IB) usando o SSU rDNA. Neste grupo estão os gêneros geniculados (*Amphiroa* e *Lithothrix*) e o grupo dos talos incrustantes, delgados e com crescimento dímero (*Titanoderma*). *Amphiroa* é monofilético através dos dois marcadores (*rbcl*-3P e SSU rDNA), apesar de só termos valores de suporte significativos com o SSU rDNA (NJ e MV). Fora o ramo de *Amphiroa*, os demais subgrupos dentro do ramo **A** não estão bem resolvidos, de forma que suas interações variam de acordo com os marcadores utilizados.

Ainda para o ramo **A**, eventualmente encontramos alguns indivíduos identificados como *Lithophyllum* (sequências obtidas no Genbank): *L. impressum* para *rbcl*-3P (duas sequências) e *L. insipidum* para SSU rDNA (uma sequência). Existe a possibilidade de que estes talos não tenham sido identificados corretamente, o que é muito comum para este gênero com elevada convergência fenotípica. Enquanto que uma das sequências de *L. impressum* não foi publicada, a outra aparece como parte de um trabalho que enfoca outro grupo de algas (Corallinoideae, por Gabrielson *et al.* 2011), de forma que não encontramos a descrição da anatomia do exemplar. A sequência de *L. insipidum* também faz parte de um trabalho que ainda não foi publicado. Apesar disto, estas três sequências contam com *vouchers* depositados em herbário, de forma que nossa intenção é conferir a identidade das amostras futuramente.

No ramo **B** estão todas as amostras do gênero *Lithophyllum* (com exceção das três comentadas há pouco), formando um grupo monofilético, mesmo que sem valores significativos de suporte. A conformação dos subgrupos dentro do ramo **B** varia muito com o uso dos dois marcadores (*rbcl*-3P e SSU rDNA), o que é reforçado pelo fato de que a composição de espécies entre as matrizes para os dois marcadores é bastante distinta, o que obviamente influencia o resultado final.

A reconstrução filogenética a partir do *psbA* também dividiu Lithophylloideae em dois grandes ramos, mas neste caso muitos subgrupos moleculares de *Lithophyllum* foram integrados ao ramo de *Amphiroa*, *Titanoderma* e *Lithothrix* – mas sem valores representativos de suporte para estas relações. O gênero *Amphiroa* é o único que se mantém monofilético com o uso deste marcador.

2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DAS ESPÉCIES

2.1. Chave dicotômica

1a. Talos delgados, biestratificados (considerando-se apenas as áreas onde não há formação de conceptáculos).	2
1b. Talos mais espessos, com o engrossamento do peritalo.	3
2a. Existe um padrão de sobreposição de lâminas em forma de leque na superfície do talo.	<i>T. prototypum</i>
2b. Talos com superfície irregular, sem a existência de lâminas que se sobrepõem.	<i>T. pustulatum</i>
3a. Talo com abundantes projeções foliosas; ou com projeções que tendem a achatar-se dorso-ventralmente, distribuídas esparsamente na superfície de um talo de natureza predominantemente “liso” (<i>encrusting</i>); cavidade do conceptáculo tetrasporofítico com 6-7 células de altura.	<i>L. cf. margaritae</i>
3b. Talos sem projeções foliosas ou que não tendem a achatar-se dorso-ventralmente.	4
4a. Conceptáculos tetrasporangiais pequenos (200-280 µm de diâmetro), com contorno quase retangular (ou de “halteres”); alongamento da camada de células subepitelial na porção do teto.	<i>Lithophyllum</i> sp. 1
4b. Conceptáculos tetrasporangiais maiores ou, se igualmente pequenos, apresentam contorno distinto, além de não apresentarem o alongamento das células subepiteliais na porção do teto.	5
5a. Conceptáculos tetrasporangiais pequenos (com 200-225 µm de diâmetro); uma camada extra de células quadráticas que se coram intensamente com o azul de toluidina forram o teto do conceptáculo.	<i>L. corallinae</i>
5b. Conceptáculos tetrasporangiais maiores.	6
6a. Nos conceptáculos tetrasporofíticos existe uma columela bastante evidente (4-6 camadas de células); uma camada extra de células quadráticas que se coram intensamente com o azul de toluidina forram o teto do conceptáculo.	<i>L. cf. depressum</i>
6b. Conceptáculos tetrasporangiais com columela menor.	7
7a. No piso do conceptáculo tetrasporangial se observa uma columela pequena (1-2 camadas de células) e um largo feixe de paráfises, bastante evidentes; canal do poro com um amplo ângulo de abertura, conferindo um contorno bastante específico para a cavidade do conceptáculo (ver na Figura III.18-C)	<i>Lithophyllum</i> sp. 4
7b. Conceptáculos tetrasporangiais com columela mais estreita e canal do poro com menor ângulo de abertura.	8
8a. Produção de conceptáculos bisporangiais, com 3-4 células de altura e menos de 20 células de diâmetro (ou em torno de 250-280 µm); altura total do conceptáculo (do piso às células epiteliais) de 5-7 células.	<i>Lithophyllum</i> sp. 2
8b. Conceptáculos tetra/bisporangiais com cavidade mais alta e diâmetro maior.	9
9a. Produção de conceptáculos bisporangiais, no piso do qual existe uma columela com aspecto mais robusto; em vista superficial do talo, estes conceptáculos são distintamente amarelos.	<i>Lithophyllum</i> sp. 3
9a. Produção de conceptáculos tetra/bisporangiais, no piso do qual existe uma columela com aspecto delicado.	<i>L. atlanticum</i>

2.2. As principais características para a distinção das espécies

Uma grande quantidade de características foi observada na busca das que pudessem ser informativas na distinção de espécies. Listaremos estas características seguindo quatro categorias:

- . i. as que puderam ser observadas em todas as espécies, mas que não foram informativas;
- . ii. as que não puderam ser observadas em todas as espécies, o que se deu principalmente nos casos das que foram representadas por poucos indivíduos.
- . iii. as que não foram observadas, para os casos de não encontrarmos determinadas estruturas para observação, ou ainda por opção após a ponderação de alguns fatores;
- . e iv. as características que são informativas, mesmo que somente em conjunto com outras.

i. Características observadas e não informativas

- . Presença ou ausência da concentração das paráfises na porção central do conceptáculo tetra/bisporofítico. Todos os indivíduos apresentaram esta característica.
- . Presença ou ausência de mucilagem no processo de liberação dos tetra/bísporos. Não havia mucilagem neste tipo de conceptáculo, para todos os indivíduos observados.
- . Formato das células epiteliais (redondas, quadradas ou, retangulares). É comum a variação do formato das células epiteliais, inclusive em um mesmo corte do talo.
- . Profundidade na coluna d'água. Apesar de termos encontrado algumas espécies exclusivamente em determinada faixa de profundidade (ver sessão **3. Distribuição no país - Distribuição na coluna d'água**), não consideramos que esta deva ser uma característica tomada como informativa para a distinção de espécies. Nosso posicionamento é o de que novos esforços de coleta e de identificação através de dados moleculares deverão trazer novos dados quanto à profundidade de ocorrência destas mesmas espécies, o que não deverá ser levado como um dado contraditório, mas sim complementar ao que apresentamos.
- . Tipo de tricocito produzido, seguindo Townsend & Adey (1990). Apesar de observados para todas as espécies que encontramos para *Lithophyllum*, não encontramos uma constância dos tipos de tricocitos que ocorrem para uma mesma espécie, além de termos encontrado diferenças de presença e ausência de tricocitos entre diferentes amostras para as mesmas espécies. Mesmo assim, apresentamos os tipos que encontramos na sessão de descrição vegetativa para cada espécie. O caso de *Titanoderma* é diferente pois, diferente do que acontece para *Lithophyllum*, os talos não se caracterizam na existência de um peritalo e do crescimento do peritalo, que nas espécies que encontramos para *Titanoderma* se resume à camada epitelial (nas áreas estéreis). Não existe ainda a caracterização da variação do aspecto dos tricocitos para *Titanoderma*. São ainda necessárias investigações específicas quanto à existência ou não, da aparência e da relação destas células inchadas em relação às demais células subepiteliais (que nas duas espécies que encontramos se resume ao hipotalo) antes que se possa ter certeza que se tratam ou não de tricocitos.

ii. Características observadas, porém inconclusivas

- . Coloração do talo. Temos a suspeita que esta característica pode ser distintiva para algumas espécies (por exemplo para *Lithophyllum* sp. 2, vermelho). Apesar disto, nenhuma conclusão pode ser tirada sobre a variação desta característica, pois ou esta informação provém de uma única amostra que representa esta espécie (para *Lithophyllum* sp. 2), ou lidamos com talos passaram por condições que alteram a coloração do talo, seja seu desenvolvimento sob diferentes condições de luminosidade e/ou exposição ao ar (no caso de mesolitoral), seja sejam suas condições de fixação e armazenamento após a coleta; ainda neste sentido, como parte das amostras foi coletada por outros grupos de pesquisa, não pudemos observar a coloração destes talos em campo, antes do acondicionamento para preservação do material.
- . Tipo de substrato / forma de vida (rodolito ou associada ao substrato). Para a maioria das espécies, encontramos tanto os indivíduos crescendo como rodolito quanto os que cresciam aderidos ao substrato. Em outros, sejam *Lithophyllum* sp. 2, *T. pustulatum* e *T. prototypum* cada espécie é representada por apenas um indivíduo, o que não permite conclusões neste aspecto; ao mesmo tempo, não foram tomadas amostras de mesolitoral nas

mesmas regiões mesmos locais onde coletamos os espécimes destas três espécies (onde é mais comum encontrarmos os indivíduos que crescem aderidos ao substrato). Há também o caso de *Lithophyllum* cf. *margaritae*, o que era conhecido como espécie exclusivamente formadora de rodolitos para o país (Vieira-Pinto *et al.* 2014) e em nosso trabalho também foram encontrados indivíduos que crescem aderidos ao substrato. Deste modo se vê que o conhecimento quanto ao hábito de desenvolvimento [como rodolito ou associado ao substrato] dos indivíduos que representam uma espécie é diretamente dependente do esforço de coleta de amostras de indivíduos que representam estes dois tipos morfológicos nos pontos de coleta, essencialmente nos locais conhecidos pela proximidade aos depósitos de rodolitos (ilhas).

. Arranjo dos filamentos espermatangiais (simples ou dendróides) / número de células suporte destes filamentos. Não dispusemos de indivíduos masculinos férteis de todas as 10 espécies. Como nota, temos que para as quatro espécies que apresentaram conceptáculos masculinos, três produziam filamentos espermatangiais com arranjo simples (*L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *depressum* e *Lithophyllum* sp. 4), enquanto que *T. prototypum* é a única com ramificação dos espermatângios (ou seja, tipo dendróide). Os dois tipos apresentaram sempre apenas uma célula suporte.

. Tipo de tricocito produzido, seguindo Townsend & Adey (1990), sendo: **A** iniciais, superficiais, com uma célula refringente e maior que as vizinhas; **B** megacito com uma célula, enterrado no peritalo; **C** megacito com 2-3 células, enterrado no peritalo; **D** megacito mais longo, normalmente com 5 a mais células de comprimento, enterrado no peritalo (**Figura II.2H**, do **Capítulo 2**); **A** costuma ter contorno quadrático (por vezes inflado), enquanto que **B** e **C** têm o aspecto de ânfora. Apesar de termos observado esta característica para quase todas as espécies, ela não foi constante entre todos os indivíduos de cada espécie, havendo casos em que são muito raros ou ausentes, enquanto que em outros são abundantes. Não fizemos o cruzamento do estado deste caráter com as condições do ambiente onde cada amostra foi encontrada, a fim de encontrar possíveis relações com a disponibilidade de nutrientes, profundidade ou luminosidade, já que o propósito deste trabalho (de natureza taxonômica e não ecológica) é encontrar características estáveis para cada espécie trabalho é a distinção das espécies.

iii. Características não observadas

. Distribuição dos filamentos gonimoblásticos desenvolvidos, em relação à célula de fusão nos conceptáculos carposporofíticos (sejam por toda a superfície, dorsais ou apenas nas porções de borda, ou seja, periféricos). Não encontramos conceptáculos carposporofíticos.

. Dimensões celulares. Woelkerling e Campbell (1992) também chegaram à conclusão de que este quesito não deveria ser utilizado para a distinção de espécies, após realizarem extensiva pesquisa bibliográfica e também da observação das amostras em seu trabalho. Apesar de que por motivos distintos, nós também optamos por não incluir a tomada de medidas celulares (inclusive de tetrasporângios) no conjunto de características investigadas para a discriminação de espécies. Não existem estudos publicados que comprovem a estabilidade das dimensões celulares em algas calcárias frente a diferentes condições de crescimento dos espécimes, como temperatura e pH da água e profundidade na coluna d'água - além das taxas de crescimento associadas a estes mesmos fatores.

iv. Características informativas

A **Tabela III.5** sumariza as principais características que distinguem ou caracterizam cada uma das espécies para as dez espécies que serão descritas neste capítulo.

As características incluídas na tabela estão listadas a seguir. As que têm interpretação difícil ou subjetiva foram ilustradas na sessão de metodologia geral deste trabalho (**Capítulo 2**).

- DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

1. Estado ou região geográfica onde cada espécie foi encontrada - considerando-se apenas os talos coletados para esta Tese.

- CARACTERÍSTICAS VEGETATIVAS

2. Aspecto geral do talo, seguindo Farr *et al.* (2009) (**Figura II.2F**, do **Capítulo 2**): **E** *encrusting*; **FR** *fruticoso*, **FO** *folioso*; **La** *layered*, **L** *lumpy*, **W** *warty*).

3. Tipo de desenvolvimento/crescimento do talo: **M** monômero; **D** dímero; **B** biestratificado (**Figura II.2G**, do **Capítulo 2**).

4. Formato das células do hipotalo em paliçada: **P** presentes; **A** ausentes (**Figura II.2G**, do **Capítulo 2**).

- CARACTERÍSTICAS DO CONCEPTÁCULO TETRA(BI)ESPOROFÍTICO

5. Tipo de esporos produzidos nos conceptáculos esporofíticos: **T** tetrásporos; **B** bisporos.

6. Disposição dos conceptáculos, em relação à superfície do talo: **D** deprimido (ou afundado); **R** raso; **PS** pouco saliente; **MS** saliente de maneira mediana, intermediária a PS e BS; **BS** bastante saliente (**Figura II.2I**, do **Capítulo 2**).

(os itens 8 a 19 seguem a **Figura II.2J**, do **Capítulo 2**).

7. Cavidade: altura (μm).

8. Cavidade: diâmetro (μm).

9. Cavidade: altura (nº de camadas de células).

10. Cavidade: diâmetro (nº de camadas de células).

11. Altura total do conceptáculo, do piso à célula epitelial (nº de camadas de células).

12. Columela: (elevação central do piso do conceptáculo) **P** presentes; **A** ausentes / número de camadas de células da columela (quando presentes).

13. Feixe de paráfises centrais: **D** delicado; **F** relativamente mais “robusto”; **L** relativamente mais largo.

14. Espessura do teto (número de camadas de células).

15. Camada subepitelial do teto do conceptáculo caracterizada por células longas: **P** presentes; **A** ausentes.

16. Células inchadas circundando o poro: **G** grandes; **P** pequenas; **A** ausentes, ou seja, estas células não se diferenciam em aspecto geral das demais células epiteliais/subepiteliais.

17. Células papiliformes pendendo do teto do conceptáculo: **P** presentes; **A** ausentes.

18. Células oblíquas, direcionadas para cima, ao longo do canal do conceptáculo: **P** presentes; **A** ausentes.

Tabela III.5. Distinção das espécies através das principais características. (no) indica características não observadas. Abreviatura das espécies: *L. atlanticum* (*L.atl.*); *L. corallinae* (*L.cor.*); *Lithophyllum* cf. *depressum* (*L.dep.*); *Lithophyllum* cf. *margaritae* (*L.mar.*); *Lithophyllum* sp.1[1] e [2] (*L.sp.1*[1]) e (*L.sp.1*[2]); *Lithophyllum* sp. 2 (*L.sp.2*); *Lithophyllum* sp. 3 (*L.sp.3*); *Lithophyllum* sp. 4 (*L.sp.4*); *T. prototypum* (*T.pro.*); *T. pustulatum* (*T.pus.*).

Características (detalhes na página anterior)																		
Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>L.atl.</i>	AL, RJ, SP, SC	L/E/(FR)	M(D)	A	T(B)	D/R/PS/MS	(70)80-125(150)	315-440	(5)6-9(10)	36-35(39)	10-16	P (1)3(5)	D	4-7(8)	A	A	P	P
<i>L.cor.</i>	AL, RJ, SP	E/(E-L)	M	A	T	R/PS/BS	90-100	200-225	6	20-23	9-10	P (1-2)	D	4-5	A	A	P	P
<i>L.dep.</i>	BA, AB(BA), TR(ES)	FR-L	-	A	T	PS	80-140	270-360	6 a 8	26-30	14-15	P (4-6)	F	6-10	A		?	P
<i>L.mar.</i>	RJ, SC	FO/E/W	D	A	T	R	87-92	255-270	6 a 7	20-25	10-11	P (2-3)	F	4-5	A	A	A	P
<i>L.sp.1</i>[1]	FN(PE)	FR-L	D	A	T/B	D/R/PS	75-135	200-280	4 a 6	(13)18-21	7-9	P (1-2)	D	3(4)	P	G/A**	A	P
<i>L.sp.1</i>[2]	ES	E-W	D(M)	A	B	D/R/PS	(75)80-110(180)	225-270	5 a 7	19-27	9	P (1-2)	D	3(4)	P	G	A	P
<i>L.sp.2</i>	TR(ES)	L	D	A	B	MS	82,5-107	250-280	3 a 4	18	5-7	P (1-2)	D	3(4)	A	A	P	P
<i>L.sp.3</i>	AL	E-L	(no)	(no)	B	PS	125-130	300-350	5 a 6	28-37	12	P (2-3)	F	5	A	A	P	P
<i>L.sp.4</i>	FN(PE), BA, ES	W-L/ FR/FR-FO	D	A	T	R/PS	57-90 (95-100)	250-325	3 a 5	22-26	7-11	P (1-2)	L	4-5(6)	A	A	P	P
<i>T.pro.*</i>	TR(ES)	La	B	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T.pus.</i>	FN(PE)	W	B	P	B	BS	67-75	280-310	-	22-24	3(4)	P (1)	D	2(3)	P	A	A	P

* Apenas conceptáculos masculinos foram observados em *T. prototypum*.

** Registramos o estouro desta célula em alguns dos exemplares; sendo assim, é importante lembrar aqui que a caracterização de um espécime deve ser feita a partir de cortes realizados em vários conceptáculos, de preferência em estágio distinto de desenvolvimento.

Abreviaturas para a característica 1 (loais de ocorrência): TR, Ilha da Trindade (ES); FN, Arquipélago Fernando de Noronha (PE).

2.3. Descrição morfológica das espécies

Lithophyllum atlanticum T.Vieira-Pinto, M.C.Oliveira & P.A.Horta (Figura III.10)

Vieira-Pinto T., Oliveira M.C., Bouzon J., Sissini M., Richards J.L., Riosmena-Rodriguez R. & P.A.Horta 2014. *Lithophyllum* species from Brazilian coast: range extension of *Lithophyllum margaritae* and description of *Lithophyllum atlanticum* sp. nov. (Corallinales, Corallinophycidae, Rhodophyta). *Phytotaxa* 190(1): 355-369

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL* e SSU rDNA.

Localidade tipo: Ilha do Arvoredo, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 27°16.32'S, 48°22.74'W.

Distribuição geográfica: Brasil.

Distribuição no Brasil: AL, RJ, SP, SC, PR e RS, incluindo Ilha Grande (RJ), Arquipélago dos Alcatrazes (SP), Ilha das Palmas (SP), Ilha da Queimada Grande (SP), Ilha Rapada (SP), Ilha do Arvoredo (SC) e Ilha do Xavier (SC).

Material examinado

AL: IBC1289, Pr. do Francês, Marechal Deodoro, 1m prof. 9°46'07.79"S 35°50'17.44"W, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 10.III.2013. **RJ:** IBC1079, Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, 3m prof. 22°44'27.27"S 41°52'25.81"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer 27.IX.2011; IBC1082, Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, 3m prof. 22°44'27.27"S 41°52'25.81"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer 27.IX.2011; IBC1088, Prainhas do Pontal do Atalaia, Arraial do Cabo, mesolitoral 22°59'17.09"S 42°00'46.14"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer 28.IX.2011; IBC2646, Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof. 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, B. Torrano-Silva & F. Nauer 09.VII.2013. **SP:** IBC1009, Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, 15m prof. 23°59'12"S 46°11'15"W, B. Torrano-Silva & M. Sissini 19.IV.2010; IBC1014, Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, 5m prof. 23°59'12"S 46°11'15"W, B. Torrano-Silva & M. Sissini 19.IV.2010; IBC1027, Ilha das Palmas, Ubatuba, 5m prof. 23°32'50.00"S 45°01'50.19"W, B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer 29.VIII.2011; IBC1104A, Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, 10m prof. 24°06'14.7"S 045°42'10.3"W, B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira 26.X.2011; IBC1106, Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, 12m prof. 24°06'14.7"S 045°42'10.3"W, B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira 26.X.2011; IBC1140A, Ilha Rapada, Ubatuba, 12m prof. 23°25'34.07"S 44°54'12.83"W, P.A. Horta 12.I.2012; IBC1232 Pr. de Cibratel, Itanhaém, entremarés 24°13'18.72"S 46°51'05.11"W, B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues & W. Oliveira 20.VII.2012; IBC1016 Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, 5m prof. 23°59'12"S 46°11'15"W, B. Torrano-Silva & M. Sissini 19.IV.2010. **SC:** IBC1157 Rancho Norte, ilha do Arvoredo, Florianópolis, 27°17'19.49"S 48°22'05.95"W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo 25.II.2012; IBC1161 Pr. de Palmas, Governador Celso Ramos, entremarés 27°18'47.90"S 48°32'23.01"W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo 27.II.2012.

Observações ecológicas

Talos de vida livre como rodolitos, crescendo sobre pedras soltas, cracas ou sobre o costão rochoso. Distribui-se da faixa entremarés até os 15 m de profundidade.

Características vegetativas

Crostras espessas com forma de crescimento do tipo *encrusting a lumpy-warty* e coloração vermelho-vinácea a amarronzada. Construção monômera ou dímera, células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos simples, subepiteliais (ou sem a célula epitelial), refringentes e de tamanho maior que as células vizinhas. Células subepiteliais alongadas ausentes ou raras.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos (raro bisporofíticos) rasos ou salientes, produzindo quase sempre tetrasporângios – apenas em IBC1157 observamos bísporos. Cavidade com (70)80-125(150) µm de altura [ou (5)6-9(10) células] por 315-440 µm de diâmetro [ou 36-35(39) células], raso, pouco ou um pouco mais saliente em relação à superfície, ou ainda abaixo dela (deprimido). Teto com 4-7(8) células de espessura, o piso localizado a 10-16 células abaixo das epiteliais, apresentando elevação central (columela) com (1)3(5) células de altura, sobre as quais se observa um cone de paráfises. No teto se observam células papiliformes, enquanto que no canal se vêem

ou células oblíquas para cima, ou as papiliformes (para baixo); canal do poro sem células diferenciadas. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

É a primeira vez que são descritos tricocitos imersos no peritalo para *L. atlanticum*. Outra novidade é o aumento drástico do conhecimento de sua distribuição na costa brasileira, que tinha como limite Norte o Estado de SP, e agora passa a ser AL. Também adicionamos informações para a espécie quanto à caracterização do canal do poro, que apresenta células oblíquas, inclinadas para cima, além das células papiliformes no teto do conceptáculo. Apesar de não terem sido citadas, estes dois últimos tipos de estrutura são discretamente visíveis na figura da descrição original (Fig. 19, p. 361 de Vieira-Pinto *et al.* 2014). Os espécimes analisados têm as mesmas características morfológicas descritas para a espécie, além de valores e dimensões anatômicas dentro do intervalo conhecido, segundo Vieira-Pinto *et al.* (2014).

***Lithophyllum corallinae* (P.Crouan & H.Crouan) Heydrich (Figura III.11)**

Heydrich F.1897. Corallinaceae, insbesondere Melobesieae. *Berichte der deutsche botanischen Gesellschaft* 15: 34-70.

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*.

Basiônimo: *Melobesia corallinae* P.L.Crouan & H.M.Crouan

Sinônimos homotípicos e heterotípicos seguem Guiry & Guiry (2015).

Localidade Tipo: Banc du Chateau et Baie de la Ninon, Rade de Brest, France (Chamberlain 1991: 67).

Distribuição geográfica: Espanha, Grã-Bretanha, Grécia, Irlanda, França, Alemanha, Itália, Suíça, Is. Faroe, Is. Canárias, Arq. da Madeira, EUA (costa Leste), Mauritânia, Senegal, Chipre, Turquia, China, Austrália, Nova Zelândia, Japão, Coreia, Arq. da Madeira, Brasil.

Distribuição no Brasil: BA, ES e Fernando de Noronha.

Material examinado

AL: IBC1292, Pr. do Francês, Marechal Deodoro, 1m prof. 9°46'07.79"S 35°50'17.44W, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 10.III.2013; IBC1294, Pr. do Francês, Marechal Deodoro, 1 m prof. 9°46'07.79"S 35°50'17.44W, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 10.III.2013. **ES:** IBC1194, Banco do Índio, Anchieta, 19 m prof. 20°53'12.137"S 40°34'58.355"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio 11.V.2012. **RJ:** IBC1072, Pr. de João Fernandinho 5m prof. 22°44'20.3"S 41°52'27.2"W, Búzios (RJ), B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer 26.IX.2011; IBC1011, Ilha da Queimada Grande 15m prof. 23°59'12"S 46°11'15"W, Itanhaém (SP), B. Torrano-Silva & M. Sissini 19.IV.2010.

Observações ecológicas

Indivíduos desta espécie foram encontrados sob as mais diversas formas, incluindo rodolitos, crostas aderidas a recifes, sobre conchas ou pequenas pedras (rodolito nucleado), sempre em infralitoral, a 1-19m de profundidade.

Características vegetativas

Crostas grossas e bastante rígidas, coloração vermelha, rosa escuro ou róseo-esbranquiçada, superfície lisa e brilhante, crescimento do tipo *encrusting*. Construção dímera ou monômera. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos longos, enterrados de forma dispersa no peritalo.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos geralmente rasos ou pouco salientes, produzindo tetrásporos; cavidade com 90-100 µm de altura [ou 6 camadas de células] por 200-225 µm de diâmetro [ou 20-23 células], com o piso a 9-10 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 4 a 5 células de espessura (incluindo a epitelial), sem o alongamento das células subepiteliais; columela central pequena, com 1 ou 2 camadas de célula, de onde parte um feixe de paráfises; parte do teto e do canal do conceptáculo são caracterizados pela neoformação de uma camada de células quadráticas que se coram intensamente (com o azul de toluidina), de onde partem células papiliformes delicadas e efêmeras. Os conceptáculos femininos que pudemos observar estavam enterrados no peritalo, apesar do quê pudemos fazer algumas medições: cavidade com 37,5-52,5 µm de altura, 52,5-37,5 µm de diâmetro [ou 6-8 células], sem columela ou paráfises centrais; piso localizado a 9-10 camadas de células abaixo da superfície do talo (estimado a partir da interrupção e retomada do padrão de crescimento das células); teto com 4-5 camadas de células (igualmente); canal do poro com células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade. Conceptáculos masculinos rasos com piso a 5-6 camadas de células abaixo da superfície do talo e o teto com 3(4) células de espessura (incluindo a epitelial); cavidade com 25-37,5 µm de altura [ou 2-3 camadas de células] e 125-170 µm de diâmetro [ou 14-16 células]; os espermatângios são simples (não ramificados), cada qual apresentando uma única célula suporte, cobrindo todo o piso do conceptáculo; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade. Conceptáculos carposporofíticos não observados.

Observações

É a primeira vez que *L. corallinae* é encontrada em porções costeiras da costa (ou seja, fora de porções insulares ou de bancos de rodolitos. As amostras são similares às previamente descritas para o Brasil (Villas-Bôas *et al.* 2009; Henriques *et al.* 2014), contudo apresentando as dimensões absolutas dos conceptáculos maiores. Henriques *et al.* (2014) não registram uma columela para a espécie, porém pensamos que este pode ser apenas um artefato do corte ou do deslocamento da própria columela do centro do conceptáculo. O mesmo aspecto foi visto para *L. depressum*, como veremos a seguir.

***Lithophyllum cf. depressum* Villas-Boas, Figueiredo & Riosmena-Rodriguez (Figuras III.12)**

Villas-Boas A.B., Riosmena-Rodriguez R., Amado-Filho G.M., Maneveldt G.W. & O. Figueiredo M.A. 2009. Rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales; Rhodophyta) from Espírito Santo State, Brazil, including the description of *L. depressum* sp. nov.. *Phycologia* 48(4): 237-248.

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL* e SSU rDNA.

Localidade Tipo: costa sul do Espírito Santo 40°38'46.1"W, 20°53'69.3"S (Villas-Bôas *et al.* 2009).

Distribuição geográfica: BA incluindo o Parcel de Abrolhos (BA), além da I. da Trindade (ES).

Material examinado:

Material Tipo: lâminas fornecidas pelo curador do herbário, espécime coletado na costa sul do Espírito Santo: RB454263 (Holótipo), banco de rodolitos em Anchieta (ES), 40°38'46.1"W, 20°53'69.3"S, 18 m prof. coll.?.; RB454264, banco de rodolitos em Anchieta (ES), 40°34'50.1"W, 20°53'73.4"S, 18 m prof. coll.?.; RB454265 banco de rodolitos em Anchieta (ES), 40°34'49.6"W, 20°53'71.8"S, 18 m prof. coll.?.; RB454266 banco de rodolitos em Anchieta (ES), 40°34'64.9"W, 20°53'82.1"S, 18 m prof. coll.?. **BA:** IBC1006, Chapeirão no Parcel de Abrolhos 17°58'24.72"S 038°40'27.36"W (BA), 6m prof., B. Torrano-Silva & E.C. Oliveira 27.I.2008; IBC1444, Pr. da Coroa 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, Ilha de Itaparica, Vera Cruz (BA), 1m prof., B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013. **ES:** IBC2632, Crista do Galo, I. da Trindade, 20°29'22.1"S 29°20'03.1"W, M. Sissini 12.VI.2012; IBC2638, Orelhas, I. da Trindade, 20°29'40.2"S 29°20'32.9"W, M. Sissini 31.VII.2012; IBC2640, Crista do Galo, I. da Trindade, 20°29'22.1"S 29°20'03.1"W, M. Sissini 12.VI.2012; IBC2641, Crista do Galo, I. da Trindade, 20°29'22.1"S 29°20'03.1"W, M. Sissini 12.VI.2012; IBC2633, Crista do Galo, I. da Trindade, 20°29'22.1"S 29°20'03.1"W, M. Sissini 12.VI.2012.

Observações ecológicas

Crescem como crostas sobre recifes, incluindo chapeirões, do entremarés até os 10 m de profundidade.

Características vegetativas

Crostas grossas, coloração vermelho-rosada e crescimento do tipo *warty*, incluindo ramificações nas projeções. Tipo de construção (monômera ou dímera) não observada. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos abundantes e de todos os tipos, dos simples, subepiteliais (ou sem a célula epitelial), refringentes e de tamanho maior que as células vizinhas, aos enterrados no peritalo, com 2 ou múltiplas células.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos pouco salientes, produzindo tetrásporos ou bísporos (em um mesmo talo); cavidade com 80-140 µm de altura [ou 6-8 camadas de células] por 270-360 µm de diâmetro [ou 26-30 células], com o piso a 14-15 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 6-10 células de espessura (incluindo a epitelial), sem o alongamento das células subepiteliais; columela central com 4-6 camadas de célula, de onde parte um feixe de paráfises centrais; parte do teto e do canal é caracterizada pela neoformação de uma camada de células quadráticas que se coram intensamente (com o azul de toluidina), de onde partem células papiliformes delicadas e efêmeras. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

Ampliamos consideravelmente a distribuição conhecida para a espécie, que até recentemente era conhecida apenas para um banco de rodolitos do ES. Os espécimes analisados são muito similares ao que foi apresentado para a espécie (Villas-Bôas *et al.* 2009). A característica diagnóstica para a espécie é a depressão do teto do conceptáculo tetrasporofítico, próximo ao poro (**Figura III.13**). Esta característica não foi observada nos espécimes que analisamos, mas ainda assim consideramos muito provável se tratar da mesma espécie, já que o afundamento do conceptáculo é característica variável nas outras espécies aqui apresentadas, *L. atlanticum* e *Lithophyllum* sp.1. O afundamento ocasional do teto do conceptáculo também foi reportado para *L. atlanticum* e *L. margaritae* por Vieira-Pinto *et al.* (2014). Outra diferença encontrada na comparação com a descrição do material Tipo é quanto à columela. No trabalho original, os autores usam o termo para se referir ao feixe central de paráfises do conceptáculo (Fig. 20 indicada pela seta branca, p. 245 de Villas-Bôas *et al.* 2009); na mesma figura, não está claro se existe a elevação do piso do conceptáculo (que é ao que nos referimos como columela),

podendo existir ali uma única camada; a dimensão desta columela não é citada no manuscrito. Contudo, a partir das lâminas cedidas pelo herbário RB, oriundas de material Tipo, pudemos observar uma columela bastante conspícua em parte dos cortes (**Figura III.13**). O trabalho com este tipo de material revela que, dependendo do ângulo de corte para a produção das lâminas, ou ainda de um deslocamento do centro de crescimento da columela no fundo do conceptáculo, esta característica pode ser observada ou não, o que é claro nas lâminas do material Tipo (**Figura III.13**). Estes conceptáculos com columela evidente seriam idênticos aos de *L. cf. depressum*, não fosse a ausência do afundamento do teto do conceptáculo. Apesar disto, conforme discutimos, é possível que esta característica não seja constante para a espécie – conforme encontramos para *L. atlanticum* e *Lithophyllum* sp.1 – de forma que a confirmação do nome do que estamos chamando de *L. cf. depressum* só poderá ser feita com a comparação molecular de espécimes que apresentem o conceptáculo afundado. Caso seja confirmada a identidade do material, novas características anatômicas serão referência para a caracterização da espécie: a presença dos variados tipos de tricocitos no talo, dos simples unicelulares e subepiteliais, aos longos e enterrados no peritalo; o afundamento ou não do teto do conceptáculo tetrasporangial; columela caracterizada por 4-6 camadas de células; apresentação dos talos sob a forma de rodolitos (Villas-Bôas *et al.* 2009) ou como crostas aderidas ao recife (presente trabalho).

***Lithophyllum cf. margaritae* (Hariot) Heydrich (Figuras III.14)**

Heydrich F. 1901. Die Lithothamnien des Museum d'Histoire Naturelle in Paris. Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 28: 529-545.

Marcadores amplificados: *rbcL* e *SSU rDNA*.

Localidade Tipo: Bahía de La Paz, Baja Califórnia Sur, México (Guiry & Guiry 2015; Woelkerling 1998: 354).

Distribuição geográfica: I. Grande (RJ) e I. do Arvoredo (SC).

Material examinado

RJ: IBC2642, Pr. Vermelha, Ilha Grande, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, 5 m prof., B. Torrano-Silva & F. Nauer 09.VII.2013; IBC2643, Pr. Vermelha, Ilha Grande, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, 5 m prof., B. Torrano-Silva & F. Nauer 09.VII.2013; IBC2644, Pr. Vermelha, Ilha Grande, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, 5 m prof., B. Torrano-Silva & F. Nauer 09.VII.2013. **SC:** IBC1156, Rancho Norte, ilha do Arvoredo, Florianópolis 27°17'19.49"S 48°22'05.95"W, 6 m prof., B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo 25.II.2012.

Observações ecológicas

Crescem livres (rodolitos, I. do Arvoredo) ou como crostas sobre rochas soltas do costão rochoso (I. Grande), sendo coletados a 5-6 m de profundidade.

Características vegetativas

Crostas grossas, coloração vermelha a vermelho-vinácea, crescimento do tipo folioso (I. do Arvoredo) ou *encrusting-warty* (Ilha Grande), neste último caso as projeções tendendo à forma foliosa. Construção do tipo dímera. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos abundantes, do tipo megacito com 1 a 3 células, enterrados no peritalo.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos rasos, produzindo tetrásporos; cavidade com 87-92 µm de altura [ou 6-7 camadas de células] por 255-270 µm de diâmetro [ou 20-25 células], com o piso a 10-11 camadas de células abaixo da superfície do talo. Teto com 4-5 células de espessura (incluindo a epitelial), sem o alongamento das células subepiteliais. Columela central com 2-3 camadas de células, de onde parte um largo feixe de paráfises centrais. No canal do poro se observam células papiliformes. Conceptáculos masculinos rasos ou pouco salientes com piso a 5-7 camadas de células abaixo da superfície do talo e o teto com 3-4 células de espessura (incluindo a epitelial), sendo que ocasionalmente observa-se o alongamento das células subepiteliais; cavidade com 26-31 µm de altura [ou 2-3 camadas de células] e 117-127 µm de diâmetro [ou 12-13 células]; os espermatângios são simples (não ramificados), cada qual apresentando uma única célula suporte, cobrindo todo o piso do conceptáculo; ausência de columela ou paráfises centrais; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade. Conceptáculos femininos ou carposporofíticos não observados.

Observações

É a primeira vez que a espécie é encontrada crescendo aderida ao costão rochoso, já que antes só havia sido encontrada como rodolitos. Também é a primeira vez que são descritos tricocitos imersos no peritalo para *L. margaritae*. Outra novidade é a extensão do conhecimento de sua distribuição na costa brasileira a Norte, até o RJ. A espécie, desde o primeiro registro no país por Horta (2000) e mais tarde por Vieira-Pinto *et al.* (2014) é caracterizada pelo aspecto folioso dos ramos, apesar da natureza monômera ou dímera dos talos (já que o espécime Tipo o talo é monômero; Riosmena *et al.* 1999). Os espécimes que encontramos incluem tanto os talos com abundantes ramos foliosos quanto os de natureza incrustante com ramos esparsos, achatados dorso-ventralmente. Percebe-se que em comum os ramos de todas as amostras têm a tendência (incrementada ou não) do achatamento evidente dos ramos. Esta característica pode ser tomada como distintiva da espécie, considerando-se a variação que encontramos nos espécimes. Também encontramos ramos achatados em alguns talos de *Lithophyllum* sp.4. Apesar disto, nestes talos os ramos são abundantes e agrupados, o que não acontece com os espécimes que coletamos para *Lithophyllum cf. margaritae*, o que também deve ser considerado na caracterização da espécie para a costa brasileira. A acentuada plasticidade da forma dos ramos em *L. margaritae*

já foi apresentada por Riosmena-Rodríguez *et al.* (1999), quando se observaram talos foliosos com ramos com variados graus de estreitamento e de agrupamento, outros do tipo fruticosos, *warty*, *lumpy* ou ainda quase incrustantes, incluindo, claro, formas intermediárias entre todas estas variedades. Apesar disto, as características anatômicas do conceptáculo tetrasporofítico se mantiveram estáveis entre estes talos (sendo as mesmas para o espécime Tipo) de forma que a partir de então estas passaram a ser os fatores decisivos para a identificação da espécie. Esta certeza teve uma reviravolta quando a caracterização de marcadores moleculares revelaram uma diversidade críptica de espécies, onde se observam as mesmas características anatômicas para o conceptáculo tetrasporofítico (Hernandez-Kantún *et al.* 2015). Sendo assim, sabemos que existe uma diversidade críptica em *L. margaritae*, de forma que a confirmação de qual grupo de espécimes receberá esta nomenclatura ainda depende da amplificação do DNA do material Tipo, ou, em último caso, a partir de um espécie designado como Topotipo (Hernandez-Kantún *et al.* 2015). Estes últimos achados colocam em dúvida a identificação de todos os registros para *L. margaritae*, incluindo os do Brasil. Os indivíduos que coletamos para *Lithophyllum* cf. *margaritae* têm afinidade molecular com os previamente publicados (Vieira-Pinto *et al.* 2014) para o Brasil e ao mesmo tempo com um exemplar coletado em La Paz (México), mesma cidade onde foi coletado o material Tipo, de forma que podemos dizer que os três casos se tratam de uma mesma entidade, de identificação ainda a confirmar.

***Lithophyllum* sp. 1 (Figura III.15)**

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA* e SSU rDNA.

Conforme esclarecido no item de “Observações” e também na sessão dos marcadores moleculares, esta espécie é representada por dois grupos moleculares distintos, que caracterizaremos separadamente por apresentarem distinção molecular e geográfica relevantes.

Distribuição geográfica: ES (Grupo molecular [2]) e Fernando de Noronha (Grupo molecular [1]).

Material examinado:

Grupo molecular [1]: **PE:** IBC1491, Laje Dois Irmãos, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, 20-25m. prof., P.A. Horta 09.VIII.2013; IBC1492, Ponta da Sapata, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, 20-25m. prof., P.A. Horta 08.VIII.2013.

Grupo molecular [2]: **ES:** IBC1221, Enseada Azul, Meaípe, 20°43'46.26"S 40°31'25.67"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha 08.V.2012; IBC1204, Pr. dos Castelhanos, Anchieta, 20°50'04.18"S 40°37'21.57"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha 05.V.2012; IBC1205 Pr. dos Castelhanos, Anchieta, 20°50'04.18"S 40°37'21.57"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha 05.V.2012.

Observações ecológicas

Os dois talos do grupo molecular [1], ambos de Fernando de Noronha, cresciam em vida livre (rodolitos) a 20-25 m de profundidade, enquanto que os de grupo molecular [2] se restringiram à costa do Espírito Santo, desenvolvendo-se como crostas aderidas ao recife de praia, na faixa entremarés.

Características vegetativas

Crostas espessadas, coloração roxo-acinzentada, crescimento do tipo *encrusting-warty* ou *lumpy-warty*. Construção dímera, ocasionalmente alguma porção do talo se desenvolve de forma monômera. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos simples nos exemplares do grupo molecular [1], subepiteliais ou enterrados no peritalo, enquanto que no grupo molecular [2] se observam megacitos com 2-3 células, enterrados no peritalo. É importante ressaltar que o modelo proposto por Townsend & Adey (1990) descreve as etapas de desenvolvimento dos tricocitos, sendo que os megacitos (que aqui chamamos de “B”) se originam de tricocitos simples, unicelulares (que chamamos de “A”), que é exatamente o que vemos na **Figura III.15-E**.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos rasos, deprimidos ou ainda um pouco salientes, produzindo tetrásporos ou bisporos (em talos distintos); cavidade com 75-135(180) µm de altura [ou 4-7 camadas de células] por 200-280 µm de diâmetro [ou (13)18-27 células], com o piso a 7-9 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 3(4) células de espessura (incluindo a epitelial), sendo evidente o alongamento das células subepiteliais, o que é bastante distintivo para esta espécie; columela central ausente ou bastante reduzida, com 1 ou 2 camadas de células; existe um feixe de paráfises centrais bastante discretas, só aparecendo nos cortes que passam exatamente pela porção central do conceptáculo; células oblíquas para cima, inchadas, são visíveis ao longo do canal, além de células inchadas ao redor do poro; estas células inchadas são efêmeras, podendo estourar, e ser mal-interpretadas como ausentes. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

Apesar de apresentarem características moleculares distintas entre si (apresentadas na próxima sessão deste trabalho), os grupos moleculares [1] e [2] são muito semelhantes, além de bastante distintos de outras espécies descritas. Como características distintivas, temos: o alongamento evidente das células subepiteliais do teto do conceptáculo; o formato das células oblíquas que bordeiam o canal do poro, compridas e inchadas; o formato oblongo ou ainda lembrando halteres⁴ dos conceptáculos tetrasporangiais. Apesar de ser conhecido que em *Titanoderma* também encontramos células alongadas na camada subepitelial destes conceptáculos,

⁴ *dumbbell shape*, em inglês.

consideramos que o estado do caráter deve ser distinto, pois se no caso de *Lithophyllum* sp. 1 esta camada provavelmente se alonga a partir de células menores, como é visto nas outras porções do talo, em *Titanoderma* temos que por toda a extensão do talo a camada subepitelial tem esta característica. *Lithophyllum* sp. 1 parece ser uma nova espécie para a ciência, o que será melhor investigado nas etapas seguintes deste trabalho.

Lithophyllum sp. 2 (Figura III.16)

Marcador amplificado: UPA.

Marcador amplificado: UPA.

Distribuição geográfica: I. da Trindade (ES).

Material examinado

ES: IBC2634, Farol, I. da Trindade, 20°29'54.1"S 29°19'19.1"W, M. Sissini 10.VII.2012.

Observações ecológicas

Esta espécie foi representada por uma única amostra, um rodolito esférico vermelho coletado de infralitoral.

Características vegetativas

Crostras delicadas, apesar do engrossamento do peritalo, coloração vermelho-vinácea, crescimento do tipo *lumpy*. Construção dímera. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos simples, subepiteliais (com ou sem a célula epitelial), refringentes e de tamanho maior que as células vizinhas.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos bisporofíticos medianamente salientes, sendo que a porção mais proximal do poro é distintamente afundada; cavidade com 82,5-107 µm de altura [ou 3-4 camadas de células] por 250-280 µm de diâmetro [ou 18 células], com o piso a 4-5 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 3(4) células de espessura (incluindo a epitelial), sem o alongamento das células subepiteliais; columela central discreta, com 1 ou 2 camadas de células; feixe de paráfises centrais também discretos; parte do teto e do canal do conceptáculo são caracterizados pela neoformação de uma camada de células quadráticas que se coram intensamente (com o azul de toluidina), de onde partem células papiliformes delicadas e efêmeras; flanqueando cada lado da porção interna do canal do poro se vê uma célula oblíqua para cima, grande e pouco corada, sendo oriunda do mesmo filamento que produz a neoformação de células no teto do conceptáculo. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

A amplificação do marcador UPA deixa claro que se trata de uma entidade distinta das demais da costa, com 7,2-8,4% de divergência, conforme apresentaremos melhor na próxima sessão deste trabalho. A coloração vermelha do talo chama a atenção, pois só foi encontrada para *Lithophyllum sp. 2*. Apesar disto, considerando que esta é a única amostra encontrada para esta espécie, não sabemos se esta característica seria estável em outros indivíduos da espécie. O distinto afundamento da porção proximal do canal do poro também poderia ser considerado característica distintiva para *Lithophyllum sp. 2*, se não tivéssemos conferido que esta característica varia bastante para outras espécies. Consideramos que um amadurecimento do conhecimento das características morfológicas e anatômicas do grupo só poderá ser feita com a coleta e amplificação do mesmo marcador para novos indivíduos, já que a única amostra que encontramos é demasiado reduzida, devendo ser depositada como registro no Herbário SPF.

***Lithophyllum* sp. 3 (Figura III.17)**

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL* e SSU rDNA.

Distribuição geográfica: AL.

Material examinado

AL: IBC1288, Pr. do Francês, Marechal Deodoro, 9°46'07.79"S 35°50'17.44W, 1 m prof., B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 10.III.2013; IBC1293, Pr. do Francês, Marechal Deodoro, 9°46'07.79"S 35°50'17.44W, 1 m prof., B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 10.III.2013.

Observações ecológicas

Os dois talos encontrados cresciam como crostas aderidas ao recife de praia, a 1 m de profundidade.

Características vegetativas

Crostas espessadas, coloração roxo-avermelhada, crescimento do tipo *encrusting-warty*. Tipo de construção do talo não observada, bem como o formato das células do hipotalo. Tricocitos do tipo megacito com 2-3 células, enterrados de forma dispersa no peritalo.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos bisporofíticos pouco salientes, produzindo bisporos; cavidade com 125-130 µm de altura [ou 5-6 camadas de células] por 300-350 µm de diâmetro [ou 28-37 células], com o piso a 12 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 5 células de espessura (incluindo a epitelial), não existindo o alongamento das células subepiteliais; columela central evidente, com 2-3 camadas de células, acima da qual parte um feixe de paráfises centrais; células papiliformes são evidentes no teto do conceptáculo e no canal. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

A única característica distintiva para esta espécie é a cor amarela dos conceptáculos tetrasporofíticos, em vista superficial do talo. Apesar disto, a observação anatômica foi realizada em apenas uma das duas amostras disponíveis, de modo que não sabemos se o outro exemplar (que não apresenta coloração amarela dos conceptáculos) é tetrasporofítico, e portanto não sabemos se esta é uma característica estável e que portanto pudesse ser distintiva para *Lithophyllum* sp. 3. Ainda assim, é possível identificar esta espécie através da observação em conjunto de todas as características morfológicas e anatômicas que apresentamos, conforme apresentado na Chave Dicotômica e na **Tabela III.5**. Apesar disto, confirmamos a distinção de *Lithophyllum* sp. 3 das demais espécies através de cinco marcadores, o que não deixa dúvidas da distinção da espécie.

***Lithophyllum* sp. 4 (Figura III.18)**

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcl* e SSU rDNA.

Distribuição geográfica: BA e Fernando de Noronha (PE), além das Ilhas Rasas (ES), I. Escalvada (ES) e I. da Trindade (ES).

Material examinado

PE: IBC1469, Buraco do Inferno, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, F. Scherner & D. Burgos 21.XI.2011; IBC2648, Pta. da Sapata, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, 25m. prof., P.A. Horta 07.VIII.2013; IBC2649, Pta. da Sapata, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, 10m. prof., P.A. Horta 07.VIII.2013; IBC1477, Pr. do Leo, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, M. Sissini 21.XI.2011. **BA:** IBC1419, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1425, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1426, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1427, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1428, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1429, Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, entremarés, B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 24.V.2013; IBC1474, Pr. de Subaúma, Entre Rios, 12°14'15.9"S 37°46'11.8"W, entremarés, B. Torrano-Silva, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto 27.V.2013; IBC2537, Pta. do Corumbau, Prado, 16°53'52.0"S 039°06'34.7"W, 0,5 m prof., B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos 13.V.2014; IBC2589, Pr. do Tororão, Prado, 17°14'21.8"S 039°12'48.3"W, entremarés, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos 14.V.2014; IBC2631, Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, 14°48'21.4"S 039°01'25.2"W, 0,5 m prof., B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos 16.V.2014. **ES:** IBC1303, Ilha Escalvada 20°40'S 44°24'W, 20-25m prof., M. Sissini 28.III.2012; IBC1315, Ilhas Rasas 20°40'80"S 40°22'00"W, 15m prof., M. Sissini 29.III.2012; IBC1322, Ilha Escalvada 20°40'S 44°24'W, 20-25m prof., M. Sissini 28.III.2012; IBC1328, M. Sissini 2012; IBC2637, Calheta, I. da Trindade, 20°30'29.5"S 29°18'37.0"W, M. Sissini 24.VI.2012; IBC2639, Noroeste, I. da Trindade, 20°29'57.8"S 29°20'39.2"W, M. Sissini 04.VII.2012.

Observações ecológicas

Crescem tanto livres (rodolitos) quanto como crostas sobre recifes costeiros incluindo formações do tipo "chapeirão", da região entremarés até os 25 m de profundidade.

Características vegetativas

Crostas bastante grossas, coloração vermelho-rosada a roxo-rosada, crescimento do tipo encrusting-warty, encrusting-lumpy ou totalmente forrados por projeções ramificadas ou não, digitiformes ou, em raros casos, um pouco aplainadas. Construção do tipo dímera. Células do hipotalo quadráticas (não formam uma paliçada). Tricocitos variados e abundantes, dos simples e subepiteliais (ou sem a célula epitelial), refringentes e de tamanho maior que as células vizinhas, aos semelhantes porém enterrados no peritalo, ou ainda aos do tipo megacito com múltiplas células, enterrados no peritalo.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos rasos ou pouco salientes, produzindo tetrásporos; cavidade com 57-90(95-100) µm de altura [ou 3-5 camadas de células] por 250-325 µm de diâmetro [ou 22-26 células], com o piso a 7-11 camadas de células abaixo da superfície do talo; teto com 4-5(6) células de espessura (incluindo a epitelial), sem o alongamento das células subepiteliais; columela central discreta, 1-2 camadas de célula, de onde parte um largo feixe de paráfises centrais, bastante conspícuas, características desta espécie; canal do poro amplo (grande grau de abertura). Parte do teto e do canal do conceptáculo é caracterizada pela neoformação de uma camada de células quadráticas, de onde partem células papiliformes delicadas e efêmeras. Conceptáculos masculinos rasos ou pouco salientes com piso a 5-9 camadas de células abaixo da superfície do talo e o teto com 4-6 células de espessura (incluindo a epitelial), observando-se o alongamento das células subepiteliais; cavidade com 45-70 µm de altura [ou 1-3 camadas de células] e 290-430 µm de diâmetro [ou 38-41 células]; os espermatângios são simples (não ramificados), cada qual apresentando uma única célula suporte, cobrindo todo o piso do

conceptáculo; ausência de columela ou paráfises centrais; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade. Conceptáculos femininos ou carposporofíticos não observados.

Observações

O formato da cavidade do conceptáculo, aparentemente “achatado” dorsiventralmente, principalmente pelo fato de que o ângulo de abertura do canal do poro é amplo. O feixe largo de paráfises centrais também é único para a espécie, em comparação com as outras incluídas neste trabalho. Um feixe bastante parecido pode ser visto em *L. johansenii* apresentado por Villas-Bôas *et al.* (2009); apesar disto, em *L. johansenii* se observam células inchadas ao redor do poro do conceptáculo (Fig. 7, pág. 240 de Villas-Bôas *et al.* 2009), o que não acontece nos talos coletados para *Lithophyllum* sp.4. Assim concluímos que: *L. johansenii* não está representado entre as espécies identificadas neste trabalho.

***Titanoderma pustulatum* (J.V.Lamouroux) Nägeli in Nägeli & Cramer (Figura III.19)**

Nägeli C. & Cramer C. 1858. Die Stärkekörner: Morphologische, physiologische, chemisch-physicalische und systematisch-botanische Monographie. *Pflanzenphysiologische Untersuchungen* 2 Heft. pp. [i]-x, [1]-623.

Marcadores amplificados: UPA e *rbcl*.

Basiônimo: *Melobesia pustulata* J.V.Lamouroux

Sinônimos homotípicos e heterotípicos seguem Guiry & Guiry (2015).

Localidade tipo: França (Silva, Basson & Moe 1996: 274).

Distribuição geográfica: Irlanda, Romênia, Espanha, Itália, Escandinávia, Eslovênia, Turquia, Antilhas, Açores, Bermuda, Barbados, Cuba, Is. Canárias, EUA (costa Leste), Colômbia, Venezuela, Argélia, Djibouti, Egito, Líbia, Is. Maurício, Somália, Tunísia, Índia, Paquistão, Turquia, Japão, Taiwan, Indonésia, Fiji, Polinésia Francesa e Brasil.

Distribuição no Brasil: PE, ES, incluindo o Arq. Fernando de Noronha (PE).

Material examinado

PE: IBC1415, Buraco do Inferno, Fernando de Noronha, 03°50'S 32°25'W, F. Scherner & D. Burgos 21.XI.2011.

Observações ecológicas

Encontrado apenas um indivíduo, caracterizado por um pequeno rodolito de superfície rugosa. Coletado em infralitoral (profundidade desconhecida).

Características vegetativas

Crostras delgadas com forma de crescimento do tipo *encrusting*. Construção dímera com desenvolvimento biestratificado, observando-se inúmeras camadas sobrepostas apenas com a realização de cortes histológicos. Células do hipotalo alongadas (formando uma paliçada). Tricocitos não observados.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos bisporofíticos salientes, produzindo bispóros. Cavidade com 67-75 µm de altura por 280-310 µm de diâmetro [ou 22-24 células], teto com 2(3) células de espessura sendo as subepiteliais alongadas; elevação central (columela) muito discreta e por isso mesmo é detectada em pequena quantidade dos cortes (1 camada de células); paráfises centrais delicadas; canal do poro apresentando delicadas células papiliformes e oblíquas para cima. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

A Diversidade de espécies globalmente conhecida para os talos biestratificados de Lithophylloideae (*Titanoderma*) é reduzida, apenas 9 (Guiry e Guiry 2015). Ao mesmo tempo poucas espécies passaram pela caracterização utilizando os caracteres diagnósticos mais modernos. *T. pustulatum* não foi categoricamente descrita através destes aspectos, mas sim por outros bastante gerais como a dimensão da cavidade do conceptáculo, de modo que, virtualmente, a espécie seria conhecida para o mundo todo (Henriques *et al.* 2014). A primeira descrição detalhada para a costa brasileira foi recentemente feita por Henrique *et al.* (2014 pág. 114, Tabela 1). Os autores incluíram comparações com as descrições da mesma espécie a partir de material oriundo das Ilhas Britânicas (Chamberlain 1991), para a Austrália (Irvine & Chamberlain 1994), para o Caribe (Littler & Littler 2000) e a Nova Zelândia (Harvey *et al.* 2005), sem esquecer do Brasil (Henriques *et al.* 2014). Dentre todas estas descrições, as que mais se assemelham ao talos que coletamos no Brasil são os das Ilhas Britânicas, mas ainda assim a cavidade dos conceptáculos tetrasporofíticos brasileiros é menor. Um aspecto interessante nos trabalhos publicados é a contagem do número de células do teto do conceptáculo, sendo 2(3) nos que aqui apresentamos. Quantidades maiores de camadas de células, observada em parte dos outros trabalhos, devem-se a um artifício de observação, provocado pela sobreposição de camadas do talo, como se vê em Henrique *et al.* (2014, página 114, Fig. 1-E), de maneira que, antes deste soterramento, o teto do conceptáculo apresentava apenas 2-3 camadas. Desta forma, propomos uma nova observação do aspecto do teto do conceptáculo para as espécies previamente descritas, fazendo esta correção. Como ainda não existem trabalhos que indiquem a existência de diferentes espécies [crípticas nos dias atuais] através dos marcadores moleculares, manteremos o nome de *T. pustulatum* para o espécime brasileiro.

***Titanoderma prototypum* (Foslie) Woelkerling, Y.M.Chamberlain & P.C.Silva (Figura III.20)**

Woelkerling W.J., Chamberlain Y.M. & Silva P.C. 1985. A taxonomic and nomenclatural reassessment of *Tenarea*, *Titanoderma* and *Dermatolithon* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of type and other critical specimens. *Phycologia* 24: 317-337.

Marcadores amplificados: COI-5P, *psbA* e *rbcL*.

Basiônimo: *Lithothamnion prototypum* Foslie

Sinônimos homotípicos e heterotípicos seguem Guiry & Guiry (2015).

Localidade tipo: St. Croix, US Virgin Islands (Womersley 1996: 227).

Distribuição geográfica: Caribe, Colômbia (Atlântico), Japão e Brasil.

Distribuição no Brasil: Arquipélago de Trindade (ES) e Arquipélago de Martim Vaz (ES).

Material examinado

ES: IBC2636, I. da Trindade, 20°30'49.9"S 29°20'13.4"W, M. Sissini 6.VIII.2012.

Observações ecológicas

Talo crescendo sobre o recife. Único exemplar, coletado em infralitoral.

Características vegetativas

Crosta delgadas com forma de crescimento do tipo do tipo *layered*, ou seja, com a sobreposição de camadas, observadas com o auxílio de uma lupa de mão comum; coloração róseo-avermelhada. Construção dímera com desenvolvimento biestratificado, observando-se inúmeras camadas sobrepostas. Células do hipotalo alongadas (formando uma paliçada), tricocitos não observados.

Estruturas reprodutivas

Não observamos conceptáculos tetrasporofíticos. Conceptáculos masculinos com 74 µm de altura por 307 µm de diâmetro [ou 26-33 células], teto com 2(3) células de espessura sendo as subepiteliais alongadas. Ausência de elevação central ou paráfises centrais. Espermatângios dendróides (ramificados), com uma célula suporte. Canal do poro caracterizado por fileiras que partem do piso da região periférica da cavidade. Conceptáculos gametofíticos ou carposporofíticos não observados.

Observações

Como não encontramos conceptáculos tetrasporofíticos até o momento, não pudemos fazer sua descrição e tampouco comparar com os dados da bibliografia. Devemos considerar ainda a escassez de dados modernos para a descrição anatômica das espécies de *Titanoderma*, conforme comentado acima para *T. pustulatum*. Apesar disto, o hábito caracterizado pela sobreposição de lâminas biestratificadas em forma de leque é típica da espécie, de forma que manteremos esta nomenclatura para os talos brasileiros.

Figura. III.10. *Lithophyllum atlanticum*. A: desenvolvimento sobre rocha. B: como rodolito. C e D: conceptáculo tetrasporófito, sendo que a seta indica as células papiliformes. E: tricocito simples, subepitelial e refringente (seta). F: hipotalo com desenvolvimento monômero.

Figura III.11. *Lithophyllum corallinae*. A: desenvolvimento sobre uma concha. B: desenvolvimento como rodolito. C e D: conceptáculo masculino. E: Conceptáculo feminino. F: conceptáculo tetrasporofítico, sendo que a seta branca aponta a camada de células da camada de neoformação do teto do conceptáculo e do canal do poro, enquanto que a seta preta aponta as células papiliformes. G: hipotalo com desenvolvimento monômero.

Figura III.12. *Lithophyllum cf. depressum*. A e B: desenvolvimento sob a forma de rodolitos. C e D: conceptáculos respectivamente bisporofítico e tetrasporofítico, sendo que a seta preta aponta o bi/tetrásporo, as pontas de seta preta apontam as células oblíquas na parede do canal do poro e as pontas de seta brancas apontam as células papiliformes. E: tricocito do tipo megacito com duas células, enterrado no peritalo (seta branca).

Figura III.13. Material Tipo de *L. depressum*. A: exemplo de como é possível observar, em um mesmo talo, conceptáculos com (à direita) e sem columela (à esquerda), resultado de artifício de preparo, já que no último caso o corte não passa exatamente pelo centro do piso do conceptáculo. B: um conceptáculo tetrasporofítico onde não se observa a columela (como observado no item A), semelhante à ilustração que foi apresentada para a descrição original de *L. depressum* (Villas Bôas *et al.* 2009). C: um conceptáculo tetrasporofítico exibindo a columela e o feixe de paráfises centrais, muito semelhante ao que encontramos para *Lithophyllum* cf. *depressum* (Figura III.12), excetuando-se o afundamento da porção mais proximal ao poro do conceptáculo (indicado por *). Pontas de seta pretas apontam as células oblíquas na parede do canal do poro e as pontas de seta brancas apontam as células papiliformes.

Figura III.14. *Lithophyllum cf. margaritae*. A: indivíduo desenvolvido sobre rocha, com projeções esparsas achatadas dorso-ventralmente. B: rodolito com projeções foliosas. C e D: conceptáculos tetrasporófitos, sendo que as setas negras apontam tetrasporângios, as pontas de seta preta apontam células papiliformes e “*” aponta o afundamento do teto na porção mais proximal do poro de um destes conceptáculos. E: conceptáculo masculino., sendo que a seta aponta os filamentos esporangiais. F: corte da porção basal do talo, onde se observa o desenvolvimento dímero do hipotalo e também um conceptáculo do tipo simples, enterrado no peritalo (ponta de seta).

Figura III.15. *Lithophyllum* sp. 1. A: rodolito. B: fragmento de crosta de recife em região mesolitoral. C e D: Conceptáculos bisporofíticos, onde se observa o alongamento da camada subepitelial, no teto do conceptáculo (seta branca), uma longa célula oblíqua bordeando cada lado do interior do canal do poro (setas pretas) e os bisporângios (pontas de seta brancas). E: tricocito subepitelial com formato de ânfora, provavelmente em estágio de desenvolvimento intermediário entre o estágio simples (“A”) e o de megacito (“B”). F: região do hipotalo com desenvolvimento dímero.

Figura III.16. *Lithophyllum* sp. 2. A: aspecto geral do talo, como rodolito. B. Conceptáculo tetrasporófitico, onde se aponta uma célula oblíqua no canal do poro (seta), além do afundamento da porção mais proximal do poro (indicado por *).

Figura III.17. *Lithophyllum* sp. 3. A: fragmento do talo, onde se observa a coloração amarela dos conceptáculos. B: conceptáculo bisporofítico enterrado no peritalo, onde se observam as células papiliformes em abundância (setas brancas) e os bisporângios (ponta de seta preta).

Figura III.18. *Lithophyllum* sp. 4. A: exemplar com projeções digitiformes. B: amostra onde se observa o achatamento das projeções. C: Conceptáculo tetrasporofítico apresentando um largo feixe central de paráfises, células papiliformes no teto e no canal do poro (seta) e um tetrasporângio (ponta de seta). D: conceptáculo masculino, enterrado no peritalo. E: tricocito do tipo megacito com uma célula, enterrado no peritalo (ponta de seta). F: tricocitos do tipo megacito longos, com mais de cinco células, formando fileiras mais escuras no peritalo (pontas de seta). G: hipotalo com padrão dímero de desenvolvimento.

Figura III.19. *Titanoderma pustulatum*. A: detalhe da amostra, sob a forma de rodolito. B e C: conceptáculos bisporangiais, onde se indicam as células papiliformes e oblíquas (seta preta) e um bisporângio (seta branca). D. área sem formação de conceptáculos em que se observam inúmeras camadas de crescimento do talo, cada uma biestratificada, sendo que o hipotalo é caracterizado por células em paliçada, cada qual suportando uma célula epitelial; as setas brancas apontam células iniciais da margem do talo.

Figura III.20. *Titanoderma prototypum*. A: amostra coletada como rodolito, onde se observa a superfície caracterizada pela sobreposição de inúmeras e diminutas lâminas com formato de leque. B e C: conceptáculos masculinos, sendo que em B houve a sobreposição posterior por outras lâminas de crescimento do talo; a seta aponta espermatângios dendróides. D e E: área sem formação de conceptáculos em que se observam inúmeras camadas de crescimento do talo, cada uma biestratificada, sendo que o hipotalo é caracterizado por células em paliçada, cada qual suportando uma célula epitelial; as pontas de seta brancas apontam porções de conexão celular entre duas lâminas de crescimento distintas; em E, as pontas de seta pretas apontam a formação de rizoides, observada em algumas porções do talo. Assim como em *T. pustulatum* (**Figura III.19**), aqui também observamos a sobreposição de inúmeras camadas de crescimento do talo, de hábito biestratificado, sendo que o hipotalo é caracterizado por células em paliçada, cada qual suportando uma célula epitelial.

3. DISTRIBUIÇÃO NO PAÍS

3.1. Distribuição na coluna d'água

Plotamos na **Figura III.21** a distribuição das espécies encontradas, de acordo com a profundidade do ponto onde as amostras foram coletadas. Também estão discriminados os dois grupos moleculares de *Lithophyllum* sp. 1 e os dados pretéritos para *L. margaritae*, retirados do Genbank, já que incluímos todos os dados disponíveis que tiveram confirmação molecular – vista a diversidade críptica encontrada para *Lithophyllum*, conforme já tratado em sessões anteriores deste capítulo.

A distribuição segundo sua profundidade de ocorrência foi categorizada em três áreas, de acordo com a metodologia empregada para a coleta dos exemplares:

- . mesolitoral;
- . infralitoral até os 6 m de profundidade;
- . infralitoral em profundidades superiores a 6 m.

Neste cenário, temos que:

- . a maior diversidade de formas incrustantes se encontra na porção infralitoral;
- . todas as espécies encontradas em mesolitoral também estão presentes no infralitoral;
- . e, enquanto existe apenas um grupo exclusivo para a zona de mesolitoral, são cinco os que são exclusivos de infralitoral, sendo que quatro destes ocorrem em profundidades maiores do que 6 m e, portanto, tipicamente só são acessíveis através da técnica de SCUBA.

Estes dados sugerem que as formas incrustantes de Lithophylloideae são melhor adaptadas para o ambiente de infralitoral. Neste sentido, as condições de exposição às quais os talos são submetidos em ocasiões de baixa-maré na porção de mesolitoral atuam como seletores das espécies que suportam as grandes oscilações diárias de hidratação e ressecamento do talo, além do aumento da irradiância solar e da temperatura do talo na baixa-maré.

Historicamente, a maior parte das atividades de coleta de algas marinhas na costa brasileira se dá na zona de mesolitoral, seja por “tradição”, seja por restrições dos próprios coletores (que não nadam ou não mergulham) ou ainda por restrições financeiras – já que o uso de SCUBA requer uma série de equipamentos mais dispendiosos. Os dados que aqui apresentamos ressaltam o fato de que existe uma diversidade de organismos desconhecidos na zona de infralitoral (conforme já sugerido por Horta 2000 e Horta *et al.* 2001). Estes resultados para as espécies incrustantes de Lithophylloideae também podem ser extrapolados para as demais formas englobadas em Corallinophycideae ou mesmo de Florideophycideae em geral.

Figura III.21. Distribuição das espécies encontradas, de acordo com a profundidade do ponto onde as amostras foram coletadas. Também estão discriminados os dois grupos moleculares de *Lithophyllum* sp. 1 e os dados pretéritos para *L. margaritae*, retirados do Genbank, já que incluímos todos os dados disponíveis que tiveram confirmação molecular.

3.2. Distribuição Geográfica

Esta sessão se baseia na distribuição conforme o que era anteriormente conhecido para as espécies incrustantes de Lithophylloideae na costa brasileira (**Figura III.22**) e na distribuição baseada nos dados produzidos nesta Tese (**Figura III.23**), produzido tanto com material recentemente coletado para este capítulo da Tese, quanto de material sequenciado para o Brasil previamente depositados no Genbank, do qual pudemos confirmar a identidade e a individualidade de cada espécie através dos marcadores moleculares.

Para o último cenário (baseado em dados moleculares atuais (**Figura III.23**)) sugere que:

- . o Espírito Santo comporta a maior diversidade, com 6 espécies;
- . *L. atlanticum* é a espécie melhor representada ao longo da costa (AL a RS);
- . existe uma tendência da diminuição de diversidade de espécies em direção ao Sul do país;
- . *Lithophyllum* sp. 3 e *T. prototypum* têm distribuição pontual, respectivamente em AL e para a I. da Trindade;
- . *L. stictaeforme* não foi referido para a costa brasileira (conforme explicado em sessões anteriores deste capítulo). Apesar disto, as espécies que encontramos que se encaixam na amplitude de variação das características consideradas válidas para *L. stictaeforme*, sejam *L. atlanticum*, *Lithophyllum* sp. 3 e *Lithophyllum* sp. 4, têm em conjunto a mesma distribuição que era conhecida para *L. stictaeforme*. Este fato salienta o fato de que “*L. stictaeforme*”, conforme previamente citada para o país em outros trabalhos, na verdade se trata de um conjunto de espécies com características morfológicas e anatômicas bastante similares, muitas vezes difíceis de serem distintas sem o uso da ferramenta molecular.

Alguns padrões que observamos se encaixam com o que foi proposto para a caracterização da distribuição das macroalgas marinhas brasileiras baseando-se nos padrões de composição da flora marinha bentônica brasileira, da temperatura da água e também pelos estudos da deriva continental e da interferência dos rios na salinidade e turbidez das águas costeiras (Horta *et al.* 2001; **Figura III.24**). São eles:

- . *L. depressum*: se distribui do limite Sul da Zona Tropical (BA) e à zona de transição (ES);
- . *L. corallinae* segue um padrão parecido ao de *L. depressum*, mas neste caso tem maior amplitude latitudinal de ocorrência, de AL ao RJ;
- . *L. margaritae* respeita a Zona Temperada Quente;
- . *Lithophyllum* sp. 1 corresponde à Zona Tropical mais à área de transição (ES), neste caso, superando a barreira de manguezais que existe nos arredores de SE.

Adicionalmente, a distribuição geral de todas as espécies encontradas na costa brasileira, de PE ao Sul do país, sugere a relevância de um outro fator de influência na distribuição das algas marinhas na costa: o padrão de circulação de águas superficiais ao longo da costa, principalmente pela bifurcação das águas quentes da Corrente Sul Equatorial, na porção extremo Leste do Nordeste, em uma corrente que migra para o Sul, a Corrente do Brasil, e em uma outra que corre em direção ao Norte, a Corrente das Guianas (**Figura III.24**). Não encontramos espécies de *Lithophyllum* ou de *Titanoderma* na porção da costa que é banhada pela Corrente das Guianas.

Esta direcionalidade na movimentação das águas superficiais exerce papel fundamental na dispersão de organismos com mobilidade reduzida, como é o caso das algas bentônicas, como as espécies incrustantes aqui estudadas, de forma que a comunicação entre as populações a Norte e a Sul desta zona divisora é extremamente dificultada.

O Estado do ES como Zona de Transição para a distribuição das macroalgas na costa brasileira se apoia na diversidade de ambientes (recifes, costões rochosos, bancos de rodolitos, manguezais e bancos de angiospermas marinhas), além da existência de pontos ressurgência (Horta *et al.* 2001). Neste sentido, é natural que consideremos a ampliação desta Zona de Transição até o Estado do RJ (conforme indicado por *L. corallinae*), onde também é conhecido o fenômeno do afloramento e a existência de costões rochosos, manguezais e bancos de angiospermas marinhas. Entretanto, não apresentando bancos de rodolitos importantes, nem formações recifais, a intensidade deste “cenário de transição” no RJ é mais sutil que o que vemos no ES.

Acreditamos que muito ainda há por ser descoberto com a inclusão de amostras oriundas de áreas não investigadas neste trabalho, principalmente no caso das espécies discretas e inconspícuas, dois requisitos que são cumpridos e bem ilustrados pela ampla distribuição para *T. pustulatum* baseada nos trabalhos anteriores a este (**Figura III.22**).

Figura III.22. Distribuição espacial das espécies de *Lithophyllum* e *Titanoderma* para o Brasil conforme previamente citados pela literatura, conjuntamente de suas regiões insulares e oceânicas. Estão pintadas em tons de cinza as espécies que não aparecem na **Figura III.23**. Fontes: Amado-Filho *et al.* (2007; 2010a; 2010b; 2012b), Bahia *et al.* (2010), Berchez *et al.* (2009), Costa *et al.* (2014); Horta (2000; 2002; 2008), Figueiredo & Steneck (2002), Figueiredo *et al.* (2004; 2008a; 2008b), Gherardi & Bosence (2001), Henriques *et al.* (2008; 2014), Mariath *et al.* (2008), Nunes & Guimarães (2002), Nunes *et al.* (2008), Oliveira (1977), Pascelli *et al.* (2013), Riul *et al.* (2009), Silva (2010), Tâmega & Figueiredo (2005; 2007), Vieira-Pinto *et al.* 2014; Villaça *et al.* (2006; 2010), Villas-Bôas *et al.* (2009; 2014).

Figura III.23. Distribuição espacial das espécies de *Lithophyllum* e *Titanoderma* para o Brasil segundo os dados moleculares apresentados neste trabalho, baseados em sua ocorrência por cada Estado da Federação e de suas regiões insulares e oceânicas incluídas nos pontos de coleta desse trabalho, além dos dados confirmados segundo comparação com as sequências depositadas no Genbank.

Figura III.24. Sobreposição da representação gráfica da distribuição das espécies de *Lithophyllum* e *Titanoderma* para a costa brasileira (segundo os dados moleculares apresentados neste trabalho), os padrões de circulação superficial oceânica da costa (setas à direita) e os padrões de distribuição das macroalgas marinhas na costa brasileira, de acordo com Horta *et al.* 2001 (adaptado da Fig. 5, pág. 256). Nesta imagem, os dados para as porções insulares foram mesclados com os das porções costeiras (para sua discriminação, consultar a **Figura III.22**). As faixas em laranja correspondem à Região Tropical, interrompida pela área de Domínio de Manguezais (em verde); A faixa roxa representa a Zona de Transição; e a faixa azul clara representa a Região Temperada Quente.

DISCUSSÃO

As espécies presentes na costa brasileira - diversidade e nomenclatura

Baseado em dados moleculares, encontramos , dez espécies de hábito incrustante para Lithophylloideae na costa brasileira: *L. atlanticum*, *L. corallinae*, *L. cf. depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *Lithophyllum cf. margaritae*, *T. pustulatum* e *T. prototypum*. Estas espécies estão representadas por 12 grupos moleculares distintos, 11 deles representados por espécimes trabalhados nesta Tese (e um grupo molecular distinto para *Lithophyllum cf. margaritae* disponível no Genbank, de Vieira-Pinto *et al.* 2014).

Dentre estas espécies quatro foram pouco frequentes, considerando a metodologia e os locais de coleta visitados nesse trabalho: *Lithophyllum* sp. 2 (uma amostra), *Lithophyllum* sp. 3 (duas amostras), *T. pustulatum* (uma amostra) e *T. prototypum* (uma amostra). Desta maneira não conhecemos ainda a variação morfológica e molecular para estas espécies.

Apenas uma espécie não pôde ser caracterizada quanto aos aspectos anatômicos, no que se refere ao conceptáculo tetrasporofítico, *T. prototypum*. Apesar disto, esta espécie é confirmada como entidade distinta das outras espécies incluídas na análise através dos marcadores moleculares.

Quatro espécies de *Lithophyllum* são novas para a costa brasileira, sendo que uma delas provavelmente é nova para a ciência, *Lithophyllum* sp. 1. As outras três espécies não identificadas têm anatomia bastante comum e podem ser semelhantes a diversas descrições de espécies já descritas ao redor do mundo, o que depende da comparação, principalmente molecular, com dados de material Tipo, que ainda não estão disponíveis.

Das espécies previamente descritas para o Brasil somente *L. johansenii* não foi coletada, de forma que sua caracterização molecular ainda depende de trabalhos adicionais – já que a caracterização anatômica pode ser vista em Villas-Bôas *et al.* (2009).

Outra espécie que não fizemos referência é *L. stictaeforme*, apesar de ser amplamente citada para o país, seja com este nome, seja como algum de seus sinônimos (Figueiredo & Steneck 2002; Horta 2008; Nunes *et al.* 2008; Villas-Bôas *et al.* 2009; Amado-Filho *et al.* 2010b; Costa *et al.* 2014; Henriques *et al.* 2014). A comparação da anatomia da espécie, conforme foi descrita por diversos trabalhos, foi apresentada por Villas-Bôas *et al.* (2009; Tabela 1, pág 224), incluindo a descrição do Tipo por Athanasiadis (1999). Por esta tabela é possível verificar que o epíteto “*L. stictaeforme*” é utilizado para uma grande variedade de formas pelo mundo, inclusive no Brasil. O mesmo poderia ser concluído no presente trabalho, pois as espécies *L. atlanticum*, *Lithophyllum* sp. 3 e *Lithophyllum* sp. 4 se enquadrariam no contexto que hoje é aceito para a *L. stictaeforme*. Apesar disto demonstramos que é clara uma diversidade molecular entre estes grupos, através dos diversos marcadores moleculares. Preferimos não relacionar a nomenclatura de *L. stictaeforme* a nenhuma das espécies brasileiras, até o momento que tenhamos disponíveis os marcadores moleculares do espécime Tipo, Isotipo ou ao menos de um Topotipo, acompanhado da caracterização anatômica.

A diferenciação das espécies em *Lithophyllum* ainda é dificultosa ou sujeita à subjetividade quando considerados os caracteres morfológicos e anatômicos. Soma-se a esta dificuldade a sobreposição dos valores e dimensões consideradas como caracteres taxonômicos em muitos casos. Em outros, a diferenciação foi possível considerando em conjunto todos os aspectos observados.

Para *Titanoderma* encontramos duas espécies com características morfológicas e moleculares bastante distintas. Apesar disto, ainda são poucos os trabalhos que incluem a descrição dos espécimes utilizando os caracteres modernos do grupo (principalmente quanto à anatomia dos conceptáculos), de forma que não pudemos realizar comparações neste sentido. Urgem novos trabalhos neste sentido, para todo o mundo.

Aplicação dos métodos de agrupamento na discriminação das espécies da costa brasileira e avaliação dos diferentes marcadores como *DNA Barcodes*

Os cinco métodos utilizados (Tx.Div., ABGD, SPN, MDS e PTP) agruparam as sequências amplificadas para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*-3P) de maneira similar. Além disso, encontramos valores elevados de suporte para as espécies através do método de NJ aliado às Taxas de Divergência. A sensibilidade dos marcadores para a distinção de espécies é, da maior para a menor: *rbcl*-3P > COI-5P > *psbA* > UPA, no que concerne aos valores de divergência intraespecífica; e *psbA*=*rbcl* > COI-5P > UPA, quanto aos valores de *barcoding gap* (Tabela III.3).

Devemos enfatizar a dificuldade encontrada na amplificação do COI-5P. Isto foi refletido na quantidade reduzida de dados finais para esse marcador e associado a um custo total muito mais elevado (não estimado em números) oriundo do maior uso de reagentes laboratoriais e de uma maior tempo de uso de equipamentos, desde a fase da busca pelos melhores pares de *primers* e ciclos de PCR, até chegar às sequências consenso. O uso deste marcador também foi caracterizado pela ausência de padronização para o sucesso da utilização dos distintos pares de *primers*, além de variadas necessidades de diluição do DNA, para obter sucesso na amplificação. A dificuldade na amplificação deste marcador já tinha sido documentada por Freshwater *et al.* (2010) e Milstein *et al.* (2011), mas nada havia sido publicado quanto ao seu uso em algas calcárias. Considerando a premissa de que a funcionalidade de um marcador para *barcoding* deve incluir também os aspectos práticos de trabalho, o COI-5P tem, em comparação com os outros marcadores testados, uma grande defasagem de ordem prática. Este fato, aliado ao resultado de um fluxo dificultado de produção de informação que possam suprir os bancos de dados, restringem a aplicabilidade desse marcador como *DNA Barcode*.

O UPA, como esperado, é o marcador mais conservado dentre todos os utilizados, o que se verifica pelos valores mais reduzidos para divergência interespecífica e de *barcoding gap* (Tabela III.3). A comparação deste marcador com o COI-5P como *DNA Barcode* é um ponto importante, já que estes são dois marcadores propostos para este fim junto às algas marinhas (Saunders 2005; Sherwood & Presting 2007). Já era conhecido que na comparação destes dois marcadores o UPA é o mais conservado (e.g. Sherwood *et al.*; 2010a; 2010b; Clarkston & Saunders 2010; Milstein *et al.* 2011) e que, portanto, a obtenção de sequências é facilitada com um único par de *primers* universais para o UPA (Sherwood *et al.* 2010a; Milstein *et al.* 2011). Sherwood *et al.* (2010b) em uma investigação com a flora de algas do Havaí, viram que, apesar de o UPA ser duas vezes mais conservado que o COI-5P, fornece uma topologia de árvore similar. O mesmo foi encontrado para Gelidiales por Freshwater *et al.* (2010), para *Porphyra* por Milstein *et al.* (2011) e agora também para as Lithophylloideae do Brasil. Houve casos em que não encontramos variação intraespecífica (para *L. atlanticum*). Apesar disto, a comparação que realizamos com os outros marcadores confirma que o UPA foi eficiente na distinção de espécies, identificando os mesmos ramos e apresentando valores de *barcoding gap* suficientes ((1,17)3,99-12,31), ainda que menores que os que encontramos com os demais marcadores. Desta forma, e concordando com os resultados encontrados para a mesma comparação previamente feita para outros grupos de algas, concluímos que mesmo tendo menor poder de distinção de diferentes populações em uma mesma espécie, é possível aplicar o UPA para a distinção e identificação de espécies - o que afinal é a ideia de um marcador para *DNA Barcoding*.

Na comparação do uso do COI-5P com o *rbcl*-3P como *DNA Barcode* para as Gelidiales, Freshwater *et al.* (2010) concluíram que divergência intraespecífica é maior com o COI-5P, com algumas exceções; os autores encontraram maiores valores também para o *barcoding gap* utilizando o COI-5P, porém o *rbcl* foi capaz de distinguir espécies intimamente relacionadas (com apenas uma exceção). Para o caso das incrustantes de Lithophylloideae utilizando estes mesmos marcadores, apesar de também termos encontrado valores de *barcoding gap* suficientes, o valor mínimo para o COI-5P (11) é menor que o para o *rbcl*-3P (20,2); enquanto isto, a divergência intraespecífica encontrada com o *rbcl*-3P (0-0,7%) foi um pouco menor que a do COI-5P (0-1,1%). Nesta comparação, igualmente para o que foi encontrado para Gelidiales (l.c.), o *rbcl*-3P poderia apresentar um poder de resolução de variação intraespecífica um pouco menor que o do COI-5P.

Na ocasião da proposta do uso do *psbA* como marcador para as algas calcárias no lugar do SSU rDNA (Broom *et al.* 2008), existia a expectativa de que este seria um bom candidato para a discriminação de espécies. A série de experimentos que fizemos confirma que é realmente possível usar o *psbA* para este fim – apesar de termos incluído apenas as Lithophylloideae nas comparações, acreditamos que um quadro parecido possa ser encontrado com outros grupos de algas calcárias. O valor de *barcoding gap* encontrado é suficiente (2,35-56,32) e o intervalo de divergência intraespecífica (0-0,3%) é igual ao que tem sido encontrado na bibliografia para outros grupos em Rhodophyta (Tabela III.3) – excetuando-se o caso comentado para *L. corallinae*. O uso do *psbA* para a

discriminação de espécies no grupo das Corallinophycideae começou a ser testado apenas nos últimos anos, de forma que até agora os únicos trabalhos são os de Sissini *et al.* (2014) para as Hapalidiaceae, e de Hernandez-Kantun *et al.* (2015), para espécies formadoras e não formadoras de rodolitos de terminais específicos de Corallinales. Aqui confirmamos, em um estudo comparativo, a informação de que o *psbA* apresenta divergência interespecífica menor que o *rbcl*(-3P), concordando com o que já tinha sido encontrado dentro de Wrangeliaceae (Ceramiales; Yang & Boo 2004). Uma observação importante é quanto ao tamanho empregado para este marcador (904 pb neste trabalho), o que pode exigir o uso de *primers* internos para o sequenciamento, o que não é interessante para um marcador do tipo *DNA Barcode*, que idealmente deve ser amplificado e sequenciado utilizando-se um único par de *primers*.

Para todos os marcadores utilizados encontramos valores de divergência interespecífica consistentes, apoiados por valores expressivos de *barcoding gap*. Mas vale a pena lembrar da exceção encontrada pelo trabalho de Gabrielson *et al.* (2011), onde se encontrou apenas 0,57% de divergência entre as sequências de duas espécies de *Calliarthron* (Corallinoideae), o que também foi apoiado por dados morfométricos e biogeográficos; este caso enfatiza a importância de se adotar uma abordagem holística no uso dos marcadores moleculares junto de outros caracteres para a delimitação de espécies.

Encontramos que todos os marcadores testados podem ser utilizados para a distinção de espécies, considerando-se os valores de divergência intra e interespecíficas para cada grupo, o que deve ser testado e “calibrado” para cada grupo de organismos. Considerando-se, entretanto, todos os fatores discutidos, consideramos que a porção 3’ do *rbcl* seria o marcador mais indicado, seguido do UPA e finalmente do *psbA*. Além de proporcionar sinal específico, o *rbcl*-3P tem a vantagem de também dar suporte à filogenia, conforme veremos no item a seguir.

Aspectos filogenéticos

Na comparação dos marcadores para o uso em análises filogenéticas, vemos que os resultados obtidos com o SSU rDNA continuam proporcionando os melhores suportes para os subgrupos de Lithophylloideae, quando comparado com o *psbA*. Isto corrobora a última comparação feita por Kato *et al.* (2011), que afirma que com o *psbA* não se encontra uma resolução apropriada entre gêneros e subfamílias em Corallinales. Contrariamente, estes dados vão de encontro com o que era esperado quando foi proposto o uso do *psbA* como marcador para as relações filogenéticas em Corallinales e Sporolithales (Broom *et al.* 2008). O *rbcl*-3P (cloroplastidial), mesmo representando um tipo de herança distinta do SSU rDNA (nuclear), exibiu parte das relações internas em Lithophylloideae de forma similar.

O aspecto geral das árvores geradas (**Figuras III.7-9**, com *psbA*, *rbcl*-3P e SSU rDNA) foi consistente com o que já era conhecido em linhas gerais para Corallinophycideae e para o monofiletismo de Lithophylloideae (Bailey 1999; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011; Kato *et al.* 2011; Richards *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015 ⁽⁵⁾). Ao mesmo tempo, podemos afirmar que a adição das sequências brasileiras ao conjunto de dados disponível proveu maiores esclarecimentos às relações internas desta subfamília – apresentadas, por exemplo, por Bailey (1999), Broom *et al.* (2008), Bittner *et al.* (2011), Richards *et al.* (2014) e Hernandez-Kantun *et al.* 2015 – seja para confirmar ou para derrubar cenários anteriormente propostos.

Encontramos a mesma organização em dois grandes grupos de Lithophylloideae com o uso de dois dos marcadores, *rbcl*-3P e SSU rDNA, que chamamos de **A** e **B**, sendo: um ramo contendo as formas incrustantes conhecidas como *Lithophyllum* (**B**); outro ramo com as formas incrustantes englobadas em *Titanoderma*, além das formas articuladas, *Amphiroa* e *Lithothrix* (**A**). No caso do *rbcl*-3P, se observa um ramo com duas sequências de *Lithophyllum* no ramo **A**, o que será discutido mais adiante. A configuração comum para os dois marcadores também inclui o posicionamento de *Paulsilvella* no ramo que divergiu mais precocemente (“ramo basal”) para a subfamília (apesar de não encontrarmos valores significativos de suporte).

Não encontramos este mesmo padrão com o marcador *psbA*, onde vemos dois ramos que dividem os “gêneros” de forma distinta: um que comporta a maioria dos *Lithophyllum*; enquanto que outro ramo comporta três ramos menores para *Lithophyllum*, três para *Titanoderma* e um para *Amphiroa*.

⁵ Bailey & Chapman (1998) já tinham indicado o monofiletismo do que hoje conhecemos como Lithophylloideae, apesar de que na época este era um grupo separado em duas subfamílias irmãs, sendo “Amphiroideae” *sensu* Johansen (1969) para os gêneros geniculados e “Lithophylloideae” *sensu* Woelkerling (1988) para os incrustantes.

Vemos que mesmo com o incremento significativo de sequências de *Amphiroa* nas matrizes, este gênero continua sendo monofilético e através dos três marcadores. Isto foi encontrado desde as primeiras inferências para o grupo e sempre com altos valores de suporte (Bailey 1999; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011; Richards *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015).

Lithothrix é representado por poucas sequências nos bancos de dados, mas é bastante provável que também seja monofilético, já que sua distribuição é bastante restrita – a costa do Pacífico do centro-norte da América, de Baja California até British Columbia (Guiry & Guiry 2015). Outro aspecto a ser anotado é o de que *Lithothrix* continua se agrupando com uma forma incrustante (*Titanoderma*), ao invés de agrupar-se com o outro gênero geniculado da mesma subfamília (*Amphiroa*), concordando com as inferências anteriormente realizadas, quando se dispunha de uma quantidade bem menor de sequências (Bailey 1999; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011; Kato *et al.* 2011; Richards *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015). Todos estes trabalhos acabam apoiando, por meio dos marcadores moleculares, a hipótese de que *Amphiroa* e *Lithothrix* não formam um grupo monofilético, mas sim estão relacionados a representantes incrustantes distintos (Cabioch 1972).

Para discutir a validade do gênero *Titanoderma* precisamos lembrar que nele agrupamos as formas incrustantes de Lithophylloideae com crescimento dímero e células do hipotalo alongadas verticalmente, adquirindo o aspecto de paliçada (Woelkerling *et al.* 1985). Campbell e Woelkerling (1990) examinaram exemplares Tipo e uma extensa coleção de outras amostras, encontrando estados intermediários para o formato das células do hipotalo dos talos dímeros, compondo-se tanto por células quadráticas quanto por células em paliçada, misturadas ou concentradas em áreas distintas dos mesmos talos. Este aspecto foi rediscutido por Chamberlain *et al.* (1991), que reviram a validade desta característica para a divisão destes dois gêneros, concluindo que o hipotalo em paliçada não é uma característica constante em uma espécie ou mesmo em um mesmo talo. Desta maneira, os autores emendaram a definição para *Titanoderma* e *Lithophyllum* (deixando de lado o aspecto em paliçada das células do hipotalo), de forma que *Titanoderma* continue sendo tratado como um gênero distinto, no qual existe obrigatoriamente uma margem biestratificada, o que não acontece em *Lithophyllum*. Isso significa que mesmo alguns talos espessados seriam posicionados em *Titanoderma* com a condição de apresentarem a condição biestratificada nas porções marginais.

Concordamos com estes autores de que a presença (ou não) de células em paliçada não é uma característica que sustente a divisão destes talos em dois gêneros distintos. É possível ainda que em parte dos casos observados tenha acontecido um viés de observação, ou seja, diferentes interpretações sobre o formato real das células do hipotalo: são comuns casos onde um hipotalo caracterizado por células curtas que se desenvolve sobre superfícies irregulares, acaba por alongar-se nos pontos de desnível (**Figura III.25.A e III.25.B**). Nestes casos, este artifício de forma provocado pela irregularidade do substrato costuma ser equiparado a um hipotalo que tipicamente apresenta as células em paliçada, ao longo de uma superfície lisa, o que não concordamos (**Figura III.25.D**). Propomos, portanto, que a observação do formato das células do hipotalo (em paliçada ou não) seja feito sempre em regiões do talo que se desenvolvem em porções lisas do substrato.

Esta distinção entre *Titanoderma* e *Lithophyllum* já havia sido confirmada em inferências moleculares anteriores desde Bailey (1999), que apontou uma grande divergência com o marcador SSU rDNA entre um talo de *Titanoderma* e um de *Lithophyllum*, numa magnitude típica de diversidade intergenérica. O mesmo foi enfatizado por Broom *et al.* (2008), Bailey (1999) e Bittner *et al.* (2011), apesar de que o conjunto amostral entre estes trabalhos não variou consideravelmente. Apesar disto, o monofiletismo de *Lithophyllum* vem sendo rediscutido em publicações mais atuais (Bittner *et al.* 2011; Richards *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015), dado que a adição consecutiva de novas sequências de *Lithophyllum* acaba por provocar politomias para as sequências geradas para este gênero. No presente trabalho incorporamos mais uma variedade de haplótipos às análises, que também passaram pela verificação anatômica da natureza biestratificada dos talos. Assim, temos no ramo **A**, junto de *Amphiroa* e *Lithothrix*, as sequências de *T. prototypum* e *T. pustulatum*, *Titanoderma* sp. 1 e *Titanoderma* sp. 2 no filograma de *rbcl*-3P (**Figura III.8**); e de *T. prototypum* e *T. pustulatum* no de SSU rDNA (**Figura III.9**). Todos os vouchers são caracterizados pelo talo exclusivamente biestratificado. A reconstrução utilizando o *psbA* (que não apresenta um bom sinal filogenético para relações mais amplas que as de gênero, conforme tratado anteriormente) não recuperou o ramo **A**, mas observamos a proximidade de *L. riosmenae*⁶ às sequências de *T. prototypum* e de *Amphiroa*.

⁶ Esta espécie foi descrita e incluída dentro de *Lithophyllum* pelo posicionamento dos autores quanto à não distinção de *Titanoderma*. Apesar disto, no trabalho é possível verificar o hipotalo em paliçada e a natureza bistratosa nos talos de *L. riosmenae*, características típicas para *Titanoderma*.

Observamos em nossas análises que *Titanoderma* é monofilético através da reconstrução gerada pelo *rbcL*-3P (**Figura 8**), mas polifilético com o *psbA* e o SSU rDNA (**Figuras III.7 e III.9**). É possível que esta diferença de cenários se deva a dois motivos: i. à escassez de sequências disponíveis para este gênero, principalmente para o *rbcL*-3P, já que *Titanoderma* está inserido em uma subfamília onde já se verificou uma grande diversidade molecular; ii. a identificações equivocadas dos representantes incrustantes do ramo **A**, o que é bastante comum, sem a observação se existe ou não a condição biestratificada da margem dos talos dos *vouchers*. Acreditamos que estes dois fatores coexistam, de forma que encontremos em um futuro próximo que *Titanoderma* é polifilético, conforme detalhamos a seguir.

É necessário que se faça a caracterização anatômica dos *vouchers* de *Lithophyllum* que se posicionam no ramo **A** das árvores a fim de se observar o formato das células do hipotalo junto às margens, sejam *L. impressum* para *rbcL* e *L. insipidum* para SSU rDNA. Com esta conferência, surgirão duas opções de rearranjo filogenético: no primeiro caso de que se observe o hipotalo biestratificado nas áreas marginais dos talos destes *vouchers*, teremos que todos os talos com engrossamento do peritalo se encontrarão em um único ramo (**B**), de forma que *Lithophyllum* é confirmado como um gênero monofilético, já que a espécie tipo se posiciona justamente neste ramo (*L. incrustans*, para SSU rDNA) – e neste caso apenas *Titanoderma* será polifilético pois possivelmente continuará intercalando-se com as sequências de *Lithothrix*, o que veremos apenas com a adição de mais sequências destes dois gêneros na análise; já no caso de não observarmos margens biestratificadas nestes *vouchers*, tanto as definições atuais para *Lithophyllum* quanto para *Titanoderma* não serão mais válidas, de forma que os dois gêneros serão polifiléticos. Neste caso a definição para *Lithophyllum* e *Titanoderma* deverá passar por uma reavaliação, incluindo mais sequências para as análises filogenéticas, além da revisão das características anatômicas dos *vouchers*.

Podemos dizer que a adição de sequências brasileiras às sequências já disponíveis no Genbank proporcionaram melhores argumentos na direção de se esclarecer a distinção entre os gêneros de Lithophylloideae. Isto inclui o monofiletismo de *Amphiroa* e a validação dos gêneros incrustantes, sendo que num futuro próximo teremos a adição de mais gêneros com hábito incrustante para esta subfamília com a partição de *Titanoderma* e, possivelmente, também de *Lithophyllum* - dependendo da análise anatômica dos *vouchers*.

A →

B →

C →

D →

Figura III.25.Imagens retiradas de Woelkerling & Campbell (1992) mostrando diferentes formatos das células do hipotalo, sendo respectivamente das figuras 25-E, 02-B, 19-B e 27-D. **A:** células em geral quadráticas. **B:** células irregularmente alongadas, provavelmente provocado pela superfície irregular do substrato, de forma que acreditamos que camufle um estado parecido com o de **A**, dando a falsa impressão de se tratar de um hipotalo em paliçada; a observação do restante da extensão do hipotalo, principalmente em porções onde a superfície do substrato é lisa, poderia tirar esta dúvida. **C:** hipotalo em paliçada, em um talo biestratificado (com mais camadas na altura do conceptáculo). **D:** hipotalo em paliçada, em um talo multiestratificado.

CONCLUSÕES

- É a primeira vez que a diversidade específica de *Lithophyllum* e *Titanoderma* para o Brasil é investigada de forma somatória e comparativa, quanto a uma variedade de aspectos que incluíram os morfológicos/anatômicos, ecológicos e moleculares (incluindo a própria avaliação das ferramentas moleculares), apresentados em diferentes sessões deste capítulo.
- Encontramos dez espécies de Lithophylloideae com hábito incrustante para a costa brasileira, sendo oito *Lithophyllum* e duas *Titanoderma*: *L. atlanticum*, *L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *Lithophyllum* cf. *margaritae*, *T. pustulatum* e *T. prototypum*.
- Dada a disponibilidade atual de dados moleculares, passamos *L. margaritae* do Brasil para *L. cf. margaritae*.
- Ao mesmo tempo, apesar de termos encontrado uma diversidade de espécies que se enquadram no que é tolerado para a descrição anatômica de *L. stictaeforme* (*L. atlanticum*, *Lithophyllum* sp. 3 e *Lithophyllum* sp. 4), nenhuma destas três recebeu o epíteto de *L. stictaeforme*, já que existe uma grande diversidade de formas por todo o mundo que recebem o mesmo nome e que com o uso dos marcadores moleculares se verifica que se tratam de entidades distintas. Até que a comparação com o material Tipo seja feita, não sabemos se algum destes será atribuído à espécie.
- Os quatro marcadores testados para a distinção de espécies, UPA, COI-5P, *psbA* e a porção 3' do *rbcl*, são confiáveis para a delimitação de espécies em Lithophylloideae, proporcionando ótimos valores de suporte para as espécies e valores significativos de *barcoding gap*.
- Os cinco métodos de agrupamento apresentam resultados similares para o grupo de amostras testado, porém devem-se interpretar com cautela as associações entre espécies intimamente relacionadas através do método de ABGD nos casos onde a diversidade intraespecífica de um dos pares é elevada.
- Propomos a distinção de dois ramos que sustentam, de acordo com os marcadores moleculares, a diversidade da subfamília.
- No contexto dos aspectos filogenéticos internos em Lithophylloideae, temos ainda que: *Amphiroa* é monofilético; encontramos indícios de que *Lithophyllum* seja polifilético através de três marcadores, porém uma constatação mais concreta exigiria a utilização dos marcadores inteiros e, preferencialmente, da soma destas evidências através de uma análise concatenada que reforçasse a inferência; também encontramos indícios que *Titanoderma* também possa ser polifilético, porém ainda há poucas sequências disponíveis e, além disso, a reconstrução mostrando o monofiletismo ou não do gênero foi controversa entre os marcadores utilizados, de modo que ainda precisamos de um maior esforço na produção de sequências deste grupo, além do uso de análises mais robustas (como a concatenada).
- Apresentamos uma nova proposta de distinção de *Titanoderma* (à parte de *Lithophyllum*): mantemos a proposta anterior da necessidade que exista um hipotato com células em paliçada; esta observação porém, só deve ser interpretada como uma “paliçada natural” caso se desenvolva sobre porções lisas do substrato. Desta forma, casos em que se observa a variação da altura das células do hipotato devido à rugosidade do substrato devem ser visto como um artifício (“paliçada artificial”), não sendo aceitos como discriminatórios para *Titanoderma*.
- *L. johansenii* não foi representado entre as espécies identificadas neste trabalho, de forma que ainda não existe a caracterização molecular dos representantes brasileiros da espécie.
- Existe uma diferença bastante representativa entre a diversidade de espécies encontradas nas zonas de meso e de infralitoral. Também existe diferença na composição de espécies quando consideramos as zonas que costumam ser submetidas a coletas utilizando as técnicas de mergulho livre e de SCUBA. Estes fatos ressaltam a necessidade de se incluir as diferentes técnicas de coleta nos trabalhos de diversidade em Florideophycidae, do contrário uma diversidade relevante pode ser negligenciada.

- Os padrões que observamos para a distribuição das espécies no gradiente latitudinal da costa brasileira obedecem ao que foi proposto para a caracterização da distribuição das macroalgas marinhas brasileiras baseando-se nos padrões observados por Horta *et al.* (2001). Adicionalmente, os dados aqui apresentados sugerem a relevância de um outro fator de influência na distribuição das algas marinhas na costa: o padrão de circulação de águas superficiais ao longo da costa, de forma que não encontramos amostras na porção da costa que é banhada pela Corrente das Guianas.

Capítulo 4

Amphiroa

Este capítulo teve a participação de **Bruno R. Ferreira**, através do trabalho de Iniciação Científica apresentado em 2013 para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas:

“Identificação de Amphiroa (Rhodophyta) de Ilhabela-SP”

Orientação: Mariana C. Oliveira

Colaboração: Beatriz N. Torrano da Silva

INTRODUÇÃO

A última revisão de *Amphiroa* para o Brasil (Moura e Guimarães 2005) identificou seis espécies: *Amphiroa anastomosans*, *A. cf. anceps*, *A. beauvoisii*, *A. fragilissima*, *A. rigida* e *A. vanbosseae*¹. O gênero é encontrado nas zonas entremarés e de infralitoral, do Ceará ao Rio Grande do Sul incluindo costões rochosos, recifes biogênicos e recifes de arenito. No **Capítulo 1** revimos com mais detalhes a distribuição e o histórico do estudo destes organismos.

Conforme tratado nos capítulos **1** e **3**, é comum que as algas calcárias incrustantes não sejam incluídas em investigações sobre a flora marinha no país, dada a peculiaridade das técnicas envolvidas, a dificuldade na observação dos caracteres taxonômicos – que também têm continuamente passado por diferentes interpretações ao longo do último século - e a acentuada plasticidade fenotípica, extremamente comum neste grupo de organismos. O mesmo não aconteceu com as formas geniculadas, que no Brasil além de *Amphiroa* incluem vários gêneros dentro de Corallinoideae (*Arthrocardia*, *Cheilosporum*, *Haliptilon* e *Jania*). Seus epítetos foram incluídos em muitos dos levantamentos de flora, quando são identificadas com base em características de observação mais simples, a maioria relacionada à morfologia externa do talo, como o padrão de ramificação do talo, o formato dos genículos e intergenículos e a disposição ou posicionamento das estruturas reprodutivas no talo ao longo do intergenículo. Desta forma utilizamos como rotina um grupo de características que é completamente distinto do que é utilizado para a identificação das formas incrustantes. Negligenciou-se até há pouco os detalhes anatômicos do conceptáculo, que para as formas incrustantes representam as características taxonômicas mais confiáveis para a distinção de espécie, vista a enorme plasticidade fenotípica no grupo.

Dada esta disparidade de métodos taxonômicos empregados para grupos tão intimamente relacionados, como *Amphiroa*, *Lithophyllum* e *Titanoderma*, existe um forte apelo para que se realizem com as formas articuladas novas investigações que somem as abordagens anatômicas utilizada nas formas incrustantes (e.g. Harvey *et al.* 2009). Considerando-se ainda a dificuldade de observação destes caracteres, a associação dos dados

¹ Conforme comentamos na Introdução desta Tese (**Capítulo 1**), *A. vanbosseae* foi referida como *A. tribulus* (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux para a região de Abrolhos (apenas em Figueiredo 2005).

anatômicos com os dados dos marcadores moleculares pode proporcionar não apenas a conferência da validade destes caracteres para a identificação das espécies geniculadas, mas também uma enorme facilitação na identificação destes organismos, seja por meios morfológicos ou moleculares. Neste capítulo, portanto, trataremos apenas de *Amphiroa*, o único gênero articulado deste grupo na costa brasileira.

Submetemos a variadas abordagens de investigação da diversidade específica, incluindo ferramentas morfológicas/anatômicas e moleculares, um amplo conjunto amostral recém-coletado ao longo da costa brasileira, entre o Ceará e Santa Catarina (incluindo diversas porções insulares). Não apenas as amostras, mas também os métodos, passaram por avaliação de sua validade e aplicabilidade para a identificação de espécies do grupo.

OBJETIVOS DESTE CAPÍTULO

- Apontar e caracterizar as espécies de *Amphiroa* com ocorrência no país com a aplicação conjunta de abordagens moleculares e morfológicas.
- Avaliar o uso de diferentes marcadores como ferramenta para a distinção de espécies (*DNA Barcodes*), incluindo COI-5P, UPA, *rbcL*-3P e *psbA*, sob distintas ferramentas de agrupamento (Tx.Div., ABGD, MDS, PTP e SPN), além dos aspectos de divergência intra e interespecífica e do *barcoding gap*.
- Comparar a diversidade encontrada no país com a que está incluída nos bancos de dados de sequências dos referidos marcadores moleculares para amostras oriundas de todo o mundo.
- Buscar novas relações filogenéticas dentro de *Amphiroa* – um escopo mais amplo para Lithophylloideae já foi tratado no **Capítulo 3**).

METODOLOGIA ESPECÍFICA

Abaixo revemos brevemente a metodologia utilizada, descrevendo os detalhes da análise do conjunto amostral específico para o **Capítulo 4**. Para o detalhamento de cada metodologia, consultar o **Capítulo 2** (Metodologia Geral). Basicamente, os detalhes metodológicos que são específicos para este conjunto amostral são reflexo da composição das matrizes de dados utilizadas. As amostras incluídas neste capítulo também estão listadas no **Anexo 1**.

Morfologia e caracterização das espécies

Todas as etapas utilizadas da caracterização morfológica e anatômica dos exemplares, bem como da comparação com a bibliografia especializada, encontram-se na sessão “**identificação de espécies - morfologia**”, do **Capítulo 2**.

Análises Moleculares

Análises de agrupamento para as espécies brasileiras

A produção das sequências consenso e a construção das matrizes seguem a sessão de “**inferências moleculares**” do **Capítulo 2**, assim como as características dos marcadores e métodos utilizados.

Especificamente para as análises de agrupamento, as matrizes foram compostas exclusivamente por sequências oriundas de material brasileiro, o que incluiu apenas as produzidas para esta Tese, já que não havia sequências brasileiras pretéritas disponíveis nos bancos de dados.

Utilizamos os marcadores UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*-3P (**matrizes 1, 2, 3 e 4; Tabela IV.1**). Para cada qual foi construída uma matriz de consensos, que foram submetidas a cinco métodos de agrupamento: Tx.Div., ABGD, MDS, PTP e SPN. A decisão final quanto à quantidade de espécies na costa brasileira levou em consideração a comparação dos resultados encontrados para todos os marcadores e para todos os métodos de análise (representando 20 pontos de vista distintos). Os casos conflitantes também foram observados sob os aspectos de valores de divergência e de verificação de *barcoding gap* suficiente.

A avaliação dos marcadores quanto a seu potencial como *DNA Barcodes* se deu pela capacidade de discriminação entre as espécies encontradas.

Comparação com dados do Genbank

Para esta etapa as matrizes incluíram apenas um representante de cada haplótipo (dentre a variedade encontrada para a costa brasileira), além das sequências de outros pontos do globo, acessíveis através do banco de dados do Genbank. A repetição de um mesmo haplótipo para duas ou mais sequências estrangeiras retiradas do Genbank se deu apenas nos casos de provirem de regiões geográficas distintas (por exemplo, França e Irlanda)².

Existem poucos dados para *Amphiroa* no Genbank: apenas oito sequências para UPA, cinco para COI-5P, duas para *psbA* e duas para *rbcl*. O conjunto de dados disponíveis para o SSU rDNA, que conforme comentado no **Capítulo 2** (Metodologia Geral) é o mais amplo, tem 12 sequências de *Amphiroa*.

Três marcadores são frequentemente utilizados para as análises filogenéticas: *rbcl*, SSU rDNA e *psbA*. Apesar disto, por ora pudemos produzir apenas sequências parciais do marcador SSU rDNA para uma parte das espécies brasileiras coletadas para este trabalho.

As matrizes que incorporaram dados do Genbank foram submetidas às seguintes análises:

² Outra exceção se deu na matriz para SSU rDNA, pois como não produzimos sequências completas, tivemos que realizar cortes na matriz, de modo que é possível que houvessem divergências apenas nas regiões de cortes. Assim, existem sequências idênticas para esta matriz, porém quando acessadas via GenBank estarão mais longas e divergentes entre si.

- NJ para os marcadores curtos, UPA e COI-5P (**matrizes 5 e 6; Tabela III.2**). Objetivo: busca por identidade de espécies.
- NJ, MV e IB para os marcadores mais longos, *psbA*, *rbcL*-3P, SSU rDNA (**matrizes 7, 8 e 9; Tabela IV.2**). Objetivo: inferências filogenéticas. Para estas matrizes foram incluídas também as sequências de outros grupos de Corallinophycideae, buscando o incremento do suporte dos ramos dentro de Lithophylloideae. Apesar disto, não tivemos a intenção de discutir as relações filogenéticas em categorias hierárquicas mais abrangentes (fora do *ingroup*), por exemplo no que confere à relação de Lithophylloideae com as demais subfamílias de Corallinaceae. Estes aspectos já foram amplamente abordados em trabalhos anteriores (e.g. Bailey 1999; Bailey *et al.* 2004; Kato *et al.* 2011).

Tabela V.1. Características das matrizes produzidas e as diferentes análises realizadas.

Número da matriz	Marcador	Comprimento da matriz	Número de sequências	Outgroup (Genbank)	Análises realizadas	Figura
1	UPA	355	83	<i>Spongites</i> sp. (HQ420978)*	Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	IV.2
2	COI-5P	450	30	<i>Spongites</i> sp. (HQ422715)*	Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	IV.3
3	<i>psbA</i>	816	52	<i>Spongites</i> sp. (JQ917419)*	Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	IV.4
4	<i>rbcL</i> -3P	597	29	<i>Calliarthron tuberculosum</i> (HQ322325)*	Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP	IV.5
5	UPA	350	24	-	Tx.Div.+NJ	IV.6
6	COI-5P	450	25	-	Tx.Div.+NJ	IV.7
7	<i>psbA</i>	815 pb	28	<i>Sporolithon durum</i> (DQ168023)	Tx.Div.+NJ, MV e IB	IV.8
8	<i>rbcL</i> -3P	597 pb	26	<i>Mesophyllum vancouveriense</i> (HQ322337)	Tx.Div.+NJ, MV e IB	IV.9
9	SSU rDNA	1036 pb	71	<i>Sporolithon ptychoides</i> (DQ629014)	Tx.Div.+NJ, MV e IB	IV.10

* Apenas para a análise PTP

RESULTADOS

1. FERRAMENTAS MOLECULARES

1.1. Espécies no Brasil

Encontramos quinze espécies de *Amphiroa* para a costa brasileira, que aqui estão apresentadas como seis espécies mais dois complexos de espécies: Complexo *Amphiroa beauvoisii* (com três espécies), Complexo *A. fragilissima* (com seis espécies), *A. rigida*, *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3 e *Amphiroa* sp. 4.

Os complexos de espécies foram propostos porque encontramos grupos de espécies intimamente relacionadas morfológica e anatomicamente (ausência de características morfológicas e anatômicas estáveis que distinguíssem cada espécie), aliado ao fato de formarem um grupo monofilético através das comparações moleculares. Assim, os complexos receberam uma descrição morfológica única. Apesar disso, as espécies que os constituem (seis para *A. fragilissima* e duas para *A. beauvoisii*) podem ser distintas na sessão de análises moleculares, onde receberam nomenclatura distinta, por exemplo *A. fragilissima* [1], *A. fragilissima* [2] e assim por diante até *A. fragilissima* [6].

Sua caracterização molecular e morfológica é apresentada nos itens a seguir.

Aplicação dos métodos de agrupamento, avaliação dos diferentes marcadores como DNA Barcodes e quantificação das espécies presentes

As sequências produzidas neste trabalho, incluindo as oito publicadas em Torrano-Silva *et al.* (2014), são as primeiras obtidas para espécimes de *Amphiroa* para a costa brasileira.

O êxito de amplificação por PCR variou bastante entre os marcadores. Desta maneira, não são todas as espécies que estão representadas por todos os marcadores, mas isto foi possível com o *psbA* e o *rbcl-3P* para as 15 espécies para *Amphiroa*. Não amplificamos *Amphiroa* sp. 4 para UPA e *A. fragilissima* [2] para COI-5P.

Na **Tabela IV.2** apresentamos os valores de divergência par-a-par para cada marcador, tanto intraespecífica quanto interespecífica, assim como os valores de *barcoding gaps*. Estes mesmo valores de divergência (intraespecífica e interespecífica) e de *barcoding gap* foram sumarizados e podem ser comparados com o quadro geral da bibliografia para Florideophycidae na **Tabela IV.3**.

Os resultados encontrados com os cinco métodos de agrupamento (Tx.Div, ABGD, MDS, PTP e SPN) estão sumarizados para os quatro marcadores através da **Figura IV.1**, incluindo a interpretação destes resultados como um todo quanto às espécies presentes (indicadas como “consenso”). As árvores de NJ para cada marcador, incluindo os valores de *bootstrap* para os ramos, estão ordenadas das **Figuras IV.2 a IV.5**.

Sustentação das espécies através dos diferentes marcadores

Qual a quantidade mínima de dados (sequências) para cada espécie, para se embasar corretamente a inferência do número de espécies presentes em um conjunto de dados, utilizando os quatro métodos propostos? Embora não haja um valor pré-estabelecido para o número mínimo de amostras que representem um grupo molecular, podemos considerar que esse número não deva ser inferior a 3 (F. Gurgel, *com. pess.*). Apesar disto, para muitos casos do conjunto de amostras envolvido isto não foi possível porque, apesar de incluirmos uma grande quantidade de amostras, algumas espécies foram menos frequentes³ considerando-se a totalidade dos pontos de coleta investigados, o que só pôde ser verificado na etapa de comparação das sequências: A.

³ O termo “espécies raras” não será utilizado. Consideramos que nos casos de espécies para as quais encontramos poucos representantes ainda exista a possibilidade que se distribuam [até mesmo em abundância] em áreas não incluídas neste trabalho, seja ao longo da extensa costa do país, seja crescendo a maiores profundidades.

fragilissima [2, 3 e 4], *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, 2, 3 e 4. Para a avaliação deste tipo de caso, algumas ponderações devem ser feitas:

- i. os valores de *barcoding gap* (par-a-par) que envolvem estes grupos devem ser observados com cautela, já que se baseiam em só espécime e, portanto, não existe valor de variação intraespecífica;
- ii. as espécies indicadas através dos métodos de agrupamento de ABGD, MDS e PTP tendem a ser sempre individualizadas quando compostas por uma só sequência, de modo que o critério de decisão deve basear-se nos outros métodos de agrupamento.

Uma parte considerável das espécies é confirmada através das 20 vertentes incluídas, pelos cinco métodos de agrupamento e para os quatro marcadores moleculares analisados: *A. fragilissima* [5 e 6], *A. vanbosseae*, *A. rigida* e *Amphiroa* sp. 1, 2 e 3.

Mesmo considerando todos estes aspectos, os dados indicam claramente que *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, 2, 3 e 4, apesar de serem representados por poucas sequências, se tratam de espécies distintas das demais, tanto pelos valores de distância interespecífica (**Tabela IV.1**) quanto através das taxas de divergência aliadas à topologia dos filogramas de NJ (**Figuras IV.2 a IV.5**).

Diferentemente, três das espécies do Complexo *A. fragilissima* [1, 5 e 6], além de *A. rigida* e todas as do Complexo *A. beauvoisii* [1, 2 e 3] são bem representadas dentro do conjunto de amostras (**Figuras IV.2 a IV.5**), indicando serem as mais abundantes nos pontos de coleta incluídos.

A seguir apresentaremos dois casos onde a distinção de espécies através dos métodos considerados é discutida: quatro espécies para o Complexo *A. fragilissima* [1 a 4] e todas do Complexo *A. beauvoisii* [1 a 3].

No primeiro caso, as quatro espécies do Complexo *A. fragilissima* [1 a 4] são separadas na maioria das análises, com exceção de: [1] se juntar com [2] através de três das análises (SPN utilizando UPA, SPN com *psbA* e ABGD com *psbA*), e [1], [2], [3] e [4] através de duas (Tx.Div.+NJ e ABGD utilizando *rbcL*-3P). Apesar disto, cada espécie é individualizada por 3/4 (15/20) das análises. Tendo como base para comparação os valores conhecidos para outras algas vermelhas (**Tabela IV.3**), a divergência encontrada entre estas quatro espécies é suficientemente alta para separá-las em grupos distintos através do COI-5P (7,3-12,7%; à exceção de [1] e [2], pois não amplificamos este marcador para [2]), do UPA (1,7-8,3%), e do *rbcL*-3P (2-13,6%). Com o *psbA* não é possível uma diferenciação tão clara quando considerado o valor mínimo (1,3-1,5% entre [1] e [2]), mas é suficientemente alto para o restante das comparações par-a-par (2,8-9,8%) (**Tabela IV.2**). Os valores de *barcoding gap* indicam a distinção destas quatro espécies, sendo 5,9-16,8 para o UPA, 18,7-20,7 para o COI-5P, 11,3-45,9 para o *psbA* e 10,8-41,4 para o *rbcL*-3P (**Tabela IV.3**).

No segundo caso, o Complexo *A. beauvoisii* [1 a 3] se une através de três das 20 vertentes (ABGD pelo *rbcL*-3P e SPN e PTP pelo UPA). Ou seja, cada espécie ainda é individualizada por 17/20 das análises. Além disso, a divergência entre estas três espécies é suficientemente alta para separá-las em grupos distintos através de todos os marcadores, quando comparados com os valores conhecidos para outras algas vermelhas (**Tabela IV.3**), sendo de 7,11-8,2% com o COI-5P, 1,7-2,3% (ou 6-8 pb) com o UPA, 2,8-4,7% com o *psbA* e 6,2-8,2% com o *rbcL*-3P (**Tabela IV.2**). Os valores de *barcoding gap* só puderam ser calculados para o COI-5P, sendo superiores que o mínimo que é o valor “um”: 8-18,2 (**Tabela IV.3**).

Tabela IV.2. Relação dos valores de diversidade intraespecífica (diagonal amarela), de distância interespecífica (abaixo da diagonal) e de *barcoding gap* (acima da diagonal) entre as espécies de Lithophylloideae incrustantes encontrados para a costa do Brasil. (-) indica grupos que não foram amplificados para o marcador; (na) indica os grupos representados por apenas uma sequência (valor de divergência intraespecífica “não aplicável”); (x) indica os valores de *barcoding gap* que não puderam ser calculados (pela ausência de diversidade intraespecífica em ambos os grupos).

UPA	A. frag [1]	A. frag [2]	A. frag [3]	A. frag [4]	A. frag [5]	A. frag [6]	A. vanb	A. rigida	A. sp. 1	A. sp. 2	A. sp. 3	A. beauv [1]	A. beauv [2]	A. beauv [3]	A. sp. 4
A. fragilissima [1]	0-0,3	5,9	16,8	14,8	26,6	20,7	24,6	27,6	24,6	24,6	23,7	24,6	24,6	25,6	-
A. fragilissima [2]	1,71-2	na	x	x	x	17,7	x	24,6	x	21,7	x	x	x	x	-
A. fragilissima [3]	4,9-5,1	4,0	na	x	x	16,8	x	20,7	x	18,7	x	x	x	x	-
A. fragilissima [4]	4,3-4,6	3,4	3,7	0,0	x	20,7	x	22,7	x	17,7	x	x	x	x	-
A. fragilissima [5]	7,7-8	7,1	7,1	8,3	0,0	11,8	x	25,6	x	24,6	x	x	x	x	-
A. fragilissima [6]	6-6,3	5,1-5,4	4,9-5,1	6,0	3,4-3,7	0-0,3	23,7	21,7	16,8	20,7	17,7	20,7	22,7	21,7	-
A. vanbosseae	7,1-7,4	6,9	7,4	6,9	8,0	6,9-7,1	0,0	20,7	x	17,7	x	x	x	x	-
A. rigida	8-8,6	7,19-7,49	6-6,3	6,6	7,4	6,3-6,6	6-6,3	0-0,3	10,8	10,8	13,8	12,8	14,8	13,8	-
Amphiroa sp. 1	7,1-7,4	6,9	5,7	6,9	6,0	4,9-5,1	6,6	3,1-3,4	na	15,8	x	x	x	x	-
Amphiroa sp. 2	7,1-7,7	6,3-6,6	5,4-5,7	5,1-5,4	7,1-7,4	6-6,6	5,1	3,1-3,7	4,6-4,9	0,3	11,8	11,8	13,8	12,8	-
Amphiroa sp. 3	6,9-7,1	6,6	5,7	5,7	6,3	5,1-5,4	4,9	4-4,3	4,6	3,4	na	x	x	x	-
A. beauvoisii [1]	7,1-7,4	6,9	6,0	5,1	6,6	6-6,3	5,1	3,7-4	4,0	3,4-3,7	2,9	0,0	x	x	-
A. beauvoisii [2]	7,1-7,4	6,9	6,9	5,7	6,9	6,6-6,9	5,1	4,3-4,6	5,1	4-4,3	3,7	1,7	0,0	x	-
A. beauvoisii [3]	7,4-7,7	6,6	6,6	4,9	6,9	6,3	4,6	4-4,3	4,9	3,7-4	3,1	2,3	2,3	0,0	-
Amphiroa sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COI-5P	A. frag [1]	A. frag [2]	A. frag [3]	A. frag [4]	A. frag [5]	A. frag [6]	A. vanb	A. rigida	A. sp. 1	A. sp. 2	A. sp. 3	A. beauv [1]	A. beauv [2]	A. beauv [3]	A. sp. 4
A. fragilissima [1]	0-0,4	-	18,7	20,7	25,7	27,3	25,2	29,3	25,2	12,1	23,2	11,7	25,2	24,8	26,4
A. fragilissima [2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. fragilissima [3]	8,2-8,7	-	na	x	x	x	x	70,9	x	12,1	x	14,5	x	29,3	x
A. fragilissima [4]	9,1-9,6	-	7,3	na	x	x	x	67,7	x	13,4	x	14,5	x	27,7	x
A. fragilissima [5]	11,3-11,8	-	12,0	12,0	na	x	x	63,6	x	12,4	x	13,7	x	26,4	x
A. fragilissima [6]	12-12,4	-	12,7	13,1	12,7	na	x	64,5	x	14,4	x	13,9	x	30,2	x
A. vanbosseae	11,1-11,6	-	11,6	10,9	11,8	12,7	na	60,5	x	12,9	x	14,7	x	26,8	x
A. rigida	12,9-13,6	-	15,6-15,8	14,9-15,1	14-14,2	14,2-14,4	13,3-13,6	0-0,2	54,5	11,5	48,6	13,0	55,5	27,3	54,5
Amphiroa sp. 1	11,1-11,6	-	12,2	14,0	11,6	13,6	12,2	12-12,2	na	13,1	x	13,0	x	23,2	x
Amphiroa sp. 2	13,3-14	-	13,3	14,7-14,9	13,6	15,8	14,2-14,4	12,7-13,3	14,4	1,1	3,5	12,2	9,7	9,5	9,9
Amphiroa sp. 3	10,2-10,7	-	12,0	11,8	10,9	11,1	10,4	10,7-10,9	9,8	10,4-10,9	na	10,5	x	20,7	x
A. beauvoisii [1]	10,4-11,6	-	12,9-13,1	12,9-13,1	12,2-12,7	12,4-13,1	13,1-13,8	11,6-12,4	11,6-12,2	10,9-11,6	9,33-10,2	0-0,9	8,0	8,5	12,0
A. beauvoisii [2]	11,1-11,6	-	12,7	12,4	11,1	12,4	12,7	12,2-12,4	10,4	10,7-10,9	7,8	7,11-7,78	0,0	18,2	x
A. beauvoisii [3]	10,9-11,6	-	12,9-13,1	12,2-12,4	11,6-11,8	13,3-13,6	11,8-12	12-12,2	10,2-10,4	10,4-11,3	9,11-9,33	7,56-8	8-8,22	0-0,4	23,2
Amphiroa sp. 4	11,6-12	-	11,3	11,6	10,0	11,8	10,9	12-12,2	11,6	10,9-11,3	9,8	10,7-10,9	9,6	10,2-10,4	na

Tabela IV.2. (Continuação).

psbA	<i>A. frag</i> [1]	<i>A. frag</i> [2]	<i>A. frag</i> [3]	<i>A. frag</i> [4]	<i>A. frag</i> [5]	<i>A. frag</i> [6]	<i>A. vanb</i>	<i>A. rigida</i>	<i>A. sp. 1</i>	<i>A. sp. 2</i>	<i>A. sp. 3</i>	<i>A. beauv</i> [1]	<i>A. beauv</i> [2]	<i>A. beauv</i> [3]	<i>A. sp. 4</i>
<i>A. fragilissima</i> [1]	0-0,1	11,3	50,0	45,9	68,4	23,8	73,5	73,5	78,7	19,0	72,5	66,4	54,2	70,5	72,5
<i>A. fragilissima</i> [2]	1,3-1,5	na	x	x	x	24,8	x	x	x	17,8	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [3]	6-6,1	5,6	na	x	x	25,8	x	x	x	20,0	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [4]	5,5-5,6	5,2	3,4	na	x	25,5	x	x	x	18,0	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [5]	8,2-8,5	9,1	9,8	9,6	0,0	16,6	x	x	x	19,5	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [6]	8,8-9	9,2-9,3	9,6-9,8	9,4-9,7	6,1-6,4	0-0,4	26,5	28,5	24,5	27,5	28,2	27,5	25,8	26,5	22,2
<i>A. vanbosseae</i>	8,8-8,9	9,2	9,6	9,0	9,2	9,8-9,9	0,0	x	x	19,4	x	x	x	x	x
<i>A. rigida</i>	8,8-8,9	8,9	9,6	8,7	10,1	10,5-10,8	9,7	0,0	x	16,2	x	x	x	x	x
<i>Amphiroa sp. 1</i>	9,4-9,6	9,7	9,7	9,3	9,7	9-9,2	8,1	7,7	na	16,4	x	x	x	x	x
<i>Amphiroa sp. 2</i>	9,3-9,6	8,7-8,9	9,8-10	8,8	9,6-9,4	10,2-10,4	9,7-9,8	8,1	8,2	0,5	15,2	13,8	14,8	15,6	16,2
<i>Amphiroa sp. 3</i>	8,7-8,9	8,6	8,8	7,0	10,7	10,4-10,6	9,1	6,9	7,0	7,6	na	x	x	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [1]	8-8,2	8,1	8,6	7,5	9,4	10,2-9,9	9,2	7,8	6,3	6,9	5,4	0,0	x	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [2]	6,5-6,7	7,0	7,7	7,0	9,6	9,6-9,8	8,6	7,4	6,0	7,4	5,8	2,8	0,0	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [3]	8,5-8,7	8,7	8,8	8,1	9,6	9,8-10	9,9	7,4	7,2	7,8	5,4	4,7	3,8	0,0	x
<i>Amphiroa sp. 4</i>	8,7-8,9	8,6	9,1	9,2	8,6	8,2-8,5	8,8	8,7	8,6	8,1	7,5	7,5	7,2-8	8,0	na

rbcL-3P	<i>A. frag</i> [1]	<i>A. frag</i> [2]	<i>A. frag</i> [3]	<i>A. frag</i> [4]	<i>A. frag</i> [5]	<i>A. frag</i> [6]	<i>A. vanb</i>	<i>A. rigida</i>	<i>A. sp. 1</i>	<i>A. sp. 2</i>	<i>A. sp. 3</i>	<i>A. beauv</i> [1]	<i>A. beauv</i> [2]	<i>A. beauv</i> [3]	<i>A. sp. 4</i>
<i>A. fragilissima</i> [1]	0-0,17	10,8	41,4	20,2	64,1	70,9	71,9	75,9	70,9	41,4	81,8	69,0	70,9	76,9	69,0
<i>A. fragilissima</i> [2]	1,8-2	na	x	20,7	64,1	x	72,9	76,9	x	x	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [3]	7-7,2	7,2	na	18,7	71,9	x	73,9	78,8	x	39,9	x	x	x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [4]	6,9-7,2	7-7,4	6,4-6,7	0,3	35,0	37,4	38,9	36,5	34,0	39,4	41,9	36,5	35,5	36,9	36,9
<i>A. fragilissima</i> [5]	10,9-11,2	10,9-11,1	12,2-12,4	11,9-12,4	0,2	44,4	82,8	79,8	82,8	42,9	82,8	82,8	84,8	86,7	74,9
<i>A. fragilissima</i> [6]	12-12,2	12,4	13,6	12,7-13,1	7,5-7,7	0,0	84,8	79,8	x	44,8	x	x	x	x	x
<i>A. vanbosseae</i>	12,2-12,6	12,4-12,6	12,6-12,7	13,2-13,4	14,1-14,4	14,4-14,6	0,2	69,0	76,9	34,5	76,9	78,8	76,9	78,8	63,1
<i>A. rigida</i>	12,9-13,2	13,1-13,2	13,4-13,6	12,4-12,6	13,6-13,9	13,6-13,7	11,7-12,1	0-0,17	67,0	22,2	52,2	64,1	57,0	64,1	75,9
<i>Amphiroa sp. 1</i>	12-12,2	12,1	12,9	11,6-11,2	14,1-14,2	13,6	13,1-13,2	11,4-11,6	na	33,4	x	x	x	x	x
<i>Amphiroa sp. 2</i>	14,1-14,2	14,4	13,6	13,4-13,1	14,6-15,1	15,2-15,6	11,7-12,2	7,5-7,7	11,1	0,3	24,5	32,5	31,0	29,1	228,1
<i>Amphiroa sp. 3</i>	13,9-14,1	14,4	14,6	14,2-13,9	14,1-14,2	13,4	13,1-12,9	8,9-9	11,1	8,4-8,7	na	x	x	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [1]	11,7-11,9	12,1	13,4	12,4-12,1	14,1-14,2	14,4	13,4-13,6	10,9-11,1	11,1	11,1	9,9	na	x	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [2]	12-12,2	12,2	13,4	12,1-11,7	14,4-14,6	14,7	13,1-13,2	9,7-9,9	9,9	10,6	10,4	6,2	0,0	x	x
<i>A. beauvoisii</i> [3]	13,1-13,2	13,1	12,7	12,6-12,2	14,7-14,9	16,1	13,4-13,6	10,9-11,1	10,9	9,9	11,6	8,2	7,0	0,0	x
<i>Amphiroa sp. 4</i>	11,7-11,9	12,1	11,9	12,6-12,2	12,7	13,9	10,7-10,9	12,9-13,1	12,2	77,6	13,9	11,9	12,7	13,1	na

Figura V.1. Análises de agrupamento para as espécies de *Amphiroa* encontradas. O filograma apresentado como referência (à esquerda) é o mesmo do agrupamento por NJ utilizando *rbcL*-3P (**Figura IV.5**). Cada coluna em cinza indica uma hipótese de espécie, resultado de cada um dos cinco métodos utilizados (Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP). Com base no resultado dos cinco métodos, através dos quatro marcadores, UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL* (além dos valores de divergência e de *barcoding gap*), obtivemos uma interpretação do que consideramos como “consenso” para a delimitação das espécies, indicadas por barras laranja (à direita).

UPA

Figura V.2. Árvore de agrupamento (NJ) com o marcador **UPA** para as espécies de *Amphiroa* encontradas. O valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas, sendo que apenas os valores $\geq 70\%$ são exibidos.

Abreviaturas: IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); IBela, Ilha Bela (SP); RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); IR, Ilha da Rapada (SP); Aalc, Arquipélago de Alcatrazes (SP)

COI-5P

Figura V.3. Árvore de agrupamento (NJ) com o marcador **COI-5P** para as espécies de *Amphiroa* encontradas. O valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas, sendo que apenas os valores $\geq 70\%$ são exibidos.

Abreviaturas: IR, Ilha da Rapada (SP); IXa, Ilha do Xavier (SC); IPal, Ilha das Palmas (SP); RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); ICab, Ilha das Cabras (SP).

Figura V.4. Árvore de agrupamento (NJ) com o marcador **psbA** para as espécies de *Amphiroa* encontradas. O valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas, sendo que apenas os valores $\geq 70\%$ são exibidos.

Abreviaturas: IRap, Ilha da Rapada (SP); AAlc, IXa, Ilha do Xavier (SC); RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); IGde, Ilha Grande (RJ); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); PML, Parcel Manoel Luís (MA); ICab, Ilha das Cabras (SP).

rbcL-3P

Figura V.5. Árvore de agrupamento (NJ) com o marcador *rbcL-3P* para as espécies de *Amphiroa* encontradas. O valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas, sendo que apenas os valores $\geq 70\%$ são exibidos.

Abreviaturas: IR, Ilha da Rapada (SP); IXa, Ilha do Xavier (SC); RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); IGde, Ilha Grande (RJ); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); PML, Parcel Manoel Luís (MA); Bind, Banco do Índio (ES).

Comparação do desempenho dos marcadores como *DNA Barcodes*

Diferente do que obtivemos para as espécies incrustantes (**Capítulo 3**), para *Amphiroa* o êxito foi durante a amplificação dos quatro marcadores, para as 15 espécies encontradas; apenas as sequências de *Amphiroa* sp. 4 para o UPA e de *A. fragilissima* [2] para o COI-5P não são apresentadas.

Os cinco métodos utilizados (Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP) agruparam as sequências amplificadas para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*-3P) de maneira muito similar (**Figuras IV.2 a IV.5**).

Os quatro marcadores utilizados apresentaram um alto valor de suporte através do método de NJ para as espécies encontradas, sendo sempre de 99% com o UPA e com o *psbA*, sempre 100% com o COI-5P, e 99-100% com o *rbcl*-3P.

Tabela IV.3. Valores de divergência INTRAespecífica e INTERespecífica (%) para aos marcadores encontrados, pareados aos valores encontrados para Florideophycideae na bibliografia disponível. Incluímos: Saunders 2005, Cassano 2009, Clarkston & Saunders 2010, Freshwater *et al.* 2010; Gabrielson *et al.* 2011; Milstein *et al.* 2011; Hind & Saunders 2013, Iha 2014, Nauer 2014, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014⁴. Os dados para *rbcl* foram computados a partir de matrizes com tamanhos bastante distintos entre os trabalhos publicados, passando de 293 pb (Sissini *et al.* 2014) a 1401 pb (Gabrielson *et al.* 2011), o que pode envolver taxas distintas de evolução.

Marcador	Divergência INTRAespecífica	Divergência INTERespecífica	Barcoding gap	Bibliografia: divergência INTRAespecífica	Bibliografia: divergência INTERespecífica
COI-5P	0-0,9%	7,8-15,8% (^{obs} A.f.: 7,3-12,7%; A.b.: 7,1-8,2%)	3,5-70,9% (^{obs} A.f.: 18,7-27,3%; A.b.: 8-20,7%)	0-2,6%	3,3-18,2%
UPA	0-0,3%	2,9-8,3% (^{obs} A.f.: 1,7-8,3%; A.b.: 1,7-2,3%)	10,8-27,6% (^{obs} A.f.: 5,9-26,6%; A.b.: n.a.)	0-0,8%	0,6-8,4%
<i>psbA</i>	0-0,5%	5,4-10,8% (^{obs} A.f.: 1,3-9,8%; A.b.: 2,8-4,7%)	15,2-78,7% (^{obs} A.f.: 11,3-18,4%; A.b.: n.a.)	0-0,3%	2,5-13,1%
<i>rbcl</i>	0-0,3%	7,7-15,7% (^{obs} A.f.: 2-13,6%; A.b.: 6,4-8,4%)	24,5-228,1% (^{obs} A.f.: 10,8-71,9%; A.b.: n.a.)	0-0,7%	(0,57) 0,9-12; (qualquer valor >2 é suficiente para Freshwater <i>et al.</i> 2010)

^{obs} Os valores entre parênteses estão relacionados às espécies dos complexos *A. fragilissima* [1 a 6] e *A. beauvoisii* [1 a 3].

⁴ Muitos outros trabalhos utilizaram estes marcadores para a distinção de espécies, mas não avaliaram o valor ou intervalo encontrado para estes parâmetros.

Divergência INTRAespecífica

COI-5P, UPA e *rbcl*-3P apresentaram valores de divergência intraespecífica semelhantes aos que são conhecidos para as algas vermelhas em geral, enquanto que o valor máximo para o *psbA* é apenas um pouco maior (**Tabela IV.3**).

Existe divergência intraespecífica através de alguns dos marcadores, e de maneira distinta entre si (**Tabela IV.2; Figuras IV.2 a IV.5**) - descontando-se o fato de em parte dos casos este valor não pôde ser estimado (pela existência de apenas uma sequência). Temos que: para *A. fragilissima* [6] encontramos divergência com o UPA e o com *psbA*, mas não com o *rbcl*-3P; para *A. beauvoisii* [1] e [3], a divergência intraespecífica foi acusada com o COI-5P, mas não com o UPA ou com o *psbA* (e com o *rbcl*-3P com a espécie [3]). Para *A. fragilissima* [4] e [5], a divergência interna foi encontrada com o uso do *rbcl*-3P, mas não com o UPA (e com o *psbA* para a espécie [5]).

Em comparação com os resultados encontrados para outras algas coralináceas (Hind & Saunders 2013, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014), temos que os valores aqui apresentados são iguais com o COI-5P e apenas um pouco maiores com o *psbA*; porém é pela primeira vez que observamos valores maiores que zero para algas calcárias utilizando o UPA e o *rbcl*.

Divergência INTERespecífica

Os valores de divergência interespecífica para os quatro marcadores foram bastante representativos, partindo de valores mínimos mais elevados do que é comum se encontrar na bibliografia, com exceção de *psbA* para *A. fragilissima* [1] × *A. fragilissima* [2] (1,3-1,5%, **Tabela IV.3**).

Apresentamos a parte os valores de divergência interespecífica entre os dois conjuntos de espécies *A. fragilissima* [1 a 4] e *A. beauvoisii* [1 a 3] (**Tabela IV.3**). Estes valores são menores que os que foram encontrados entre as demais espécies de *Amphiroa* e indicam que estes dois conjuntos são representados por espécies mais proximamente relacionadas.

Comparando com os resultados documentados para outras algas coralinas (Hind & Saunders 2013, Sissini *et al.* 2014 e Vieira-Pinto *et al.* 2014) os valores que encontramos são maiores com o COI-5P e com o *psbA* (com exceção de *A. fragilissima* [1] × *A. fragilissima* [2]) e menores com o UPA.

Barcoding gap

Considerando-se que o valor mínimo para *barcoding gap* deve ser 1 (Freshwater *et al.* 2010), os valores que encontramos para os marcadores COI-5P (3,5-70,9), UPA (5,9-27,6), *psbA* (11,3-78,7) e *rbcl*-3P (10,8-228,1) indicam claramente a existência de quinze espécies de *Amphiroa*.

Não encontramos valores de *barcoding gap* para comparação na bibliografia disponível para algas coralináceas, com os quais pudéssemos comparar os que encontramos para *Amphiroa*. Desta forma, esta é a primeira vez que estes valores são apresentados.

Comparação com dados do Genbank

Comparamos as espécies coletadas no Brasil com as sequências produzidas a partir de amostras coletadas fora do país (retiradas do Genbank) através da análise de Tx.Div. e NJ (para UPA e COI-5P, **Figuras IV.6-7**) ou de [Tx.Div.+NJ]+MV+IB (para *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA, **Figuras IV.8-10**). Os detalhes para cada matriz foram previamente apresentados na **Tabela IV.1**, enquanto que a súmula da comparação entre os grupos-irmãos encontrados está na **Tabela IV.4** e são discutidos a seguir, para cada marcador.

As matrizes feitas a partir dos marcadores *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA também foram utilizadas para a observação de novas inferências filogenéticas em Lithophylloideae, conforme veremos no item seguinte (**1.2 - Aspectos filogenéticos**).

UPA (Figura IV.6)

- Entre *A. fragilissima* [3] e *A. valonioides* do Havaí (*voucher* ARS00801): a divergência encontrada é de 0,6%. Este valor é maior que o máximo que encontramos como divergência intraespecífica para as espécies brasileiras (0-0,3%), mas seria aceitável considerando o que é conhecido na bibliografia (0-0,8%). É possível que se trate de uma mesma espécie no caso de a morfologia/anatomia ser muito similares, de forma que o incremento do valor de divergência tenha sido incrementado pela distância geográfica (e, portanto, por um longo período de isolamento entre as populações). Uma segunda comparação foi feita com o marcador COI-5P.
- Entre *A. beauvoisii* [2] e *A. beauvoisii* do Atlântico norte-americano (*voucher* NCweed1184): são sequências idênticas, indicando uma mesma espécie. Foi possível uma segunda comparação através do COI-5P.

COI-5P (Figura IV.7)

- Entre *A. fragilissima* [3] e *A. valonioides* do Havaí (*voucher* ARS00802): assim como o que encontramos para o UPA, a divergência através do COI-5P, de 2,4%, também coloca em dúvida a semelhança dos espécimes por estar dentro do intervalo conhecido na bibliografia. Deve-se observar que, apesar de terem feito parte de um mesmo esforço de investigação (mesmo trabalho) os *vouchers* utilizados são diferentes, dificultando o pareamento do resultado encontrado. A comparação anatômica dos *vouchers* traria mais luz a esta comparação.
- Entre *A. beauvoisii* [2] e *A. beauvoisii* do Atlântico norte-americano (*voucher* NCweed1184): a divergência de 0,7% está dentro do que é aceito para as algas vermelhas na bibliografia, bem como do intervalo que encontramos para as espécies brasileiras. O *voucher* norte-americano é o mesmo do qual foi amplificado o UPA (l.c.) com o qual encontramos 100% de identidade com os exemplares brasileiros. Sendo assim, somam-se as evidências de que *A. beauvoisii* [2] e *A. beauvoisii* da Carolina do Norte (EUA) pertencem a uma mesma espécie.

PsbA (Figura IV.8)

Nenhuma afinidade foi encontrada com as espécies depositadas no banco.

RbcL-3P (Figura IV.9)

- Entre *A. fragilissima* [6] e *A. fragilissima* do Atlântico dos EUA (*voucher* "taxon:35168"): a divergência de 0,2-0,3% está dentro do que é aceito para uma mesma espécie, segundo este marcador. Uma segunda comparação foi feita com o marcador SSU rDNA.
- Entre *A. rigida* do Brasil e *A. rigida* do Atlântico mexicano (*voucher* GALW15768): o valor de 0,1% de divergência é baixo para este marcador, sugerindo tratar-se de uma única espécie. Do mesmo *voucher* foi amplificado o marcador *psbA*, porém neste caso a divergência com o espécime brasileiro é demasiado elevada para uma única espécie (5%). Para resolver este impasse seria importante reamplificar as referidas sequências e comparar a anatomia dos espécimes.

SSU rDNA (Figura IV.10)

- Entre *A. fragilissima* [6] e *A. fragilissima* do Atlântico dos EUA (voucher "taxon:35168"): a divergência de 0,3% poderia ser considerada uma evidência de identidade específica quando comparada ao intervalo que encontramos dentro do escopo das espécies brasileiras (0-0,3%). A comparação feita com o *rbcL*-3P através do mesmo voucher reforça a identidade de espécie entre estes dois grupos. Deve-se observar que o voucher norte-americano foi coletado em local próximo ao do Tipo para a espécie (Jamaica), o que reforça a identidade dos indivíduos de *A. fragilissima* [6] com o epíteto *A. fragilissima*. Esta é a primeira confirmação molecular de uma espécie de *Amphiroa* para o Brasil, o que já apresentamos como artigo (Torrano-Silva *et al.* 2014 - **Capítulo 5**).
- Entre *Amphiroa* sp. 4 e *A. hancockii* (Honduras; voucher "taxon:231748"): o baixo valor de divergência (0,1%) indica a possibilidade de pertencerem a uma mesma espécie. Este resultado, apesar de ser uma evidência da identidade entre as espécies, não pode ser tomado como absoluto já que o SSU rDNA é um marcador bastante conservado, necessitando de argumentos extras com base em marcadores moleculares adicionais. Como nota, vale colocar que, apesar da proximidade entre Honduras e o local Tipo (Panamá), as duas amostras cresceram em oceanos diferentes, sendo o Pacífico para o local Tipo de *A. hancockii* ("Southeast Caledonia Harbor, near Islas Piedra and San Augustin") e o Atlântico para Honduras (Roatán).

Tabela IV.4. Comparação entre as amostras que coletamos para a costa brasileira e as sequências disponíveis (Genbank) mais similares. Os números de *voucher* permitem o cruzamento dos dados de comparação encontrados com diferentes marcadores, no caso de a amplificação ter sido feita a partir dos mesmos espécimes.

Espécie	Grupo afim (identificação)	Local de coleta dos <i>vouchers</i>	Marcadores	Número de <i>voucher</i>	Valores de divergência (par a par)	Interpretação (parcial)
<i>A. fragilissima</i> [3]	<i>A. valonioides</i>	Havaí	UPA	ARS00801	0,6 %	?
	<i>A. valonioides</i>	Havaí	COI-5P	ARS00802	2,4 %	?
<i>A. fragilissima</i> [6]	<i>A. fragilissima</i>	EUA (Flórida)	<i>rbcL</i> -3P	"taxon:35168"	0,2-0,3 %	mesma espécie
	<i>A. fragilissima</i>	EUA (Flórida)	SSU rDNA	"taxon:35168"	0,3 %	?
<i>A. rigida</i>	<i>A. rigida</i>	México (Quintana Roo)	<i>psbA</i>	GALW15768	5 %	diferentes
	<i>A. rigida</i>	México (Quintana Roo)	<i>rbcL</i> -3P	GALW15768	0,1 %	mesma espécie
<i>A. beauvoisii</i> [2]	<i>A. beauvoisii</i>	EUA (N. Carolina)	UPA	NCweed1184	0	mesma espécie
	<i>A. beauvoisii</i>	EUA (N. Carolina)	COI-5P	NCweed1184	0,7 %	mesma espécie
<i>Amphiroa</i> sp. 4	<i>A. hancockii</i>	Honduras (Roatan)	SSU rDNA	"taxon:231748"	0,1 %	mesma espécie

Figura IV.6. Filograma de agrupamento com o marcador **UPA** gerado por NJ, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. A distância entre os terminais foi calculada através do número de substituições; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas (apenas valores ≥ 70 são mostrados). A análise foi feita através da matriz de dados número 5, cujas características foram discriminadas na **Tabela IV.1**.

Abreviaturas: RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); IGde, Ilha Grande (RJ); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP); PML, Parcel Manoel Luíz (MA).

COI-5P

Figura IV.7. Filograma de agrupamento com o marcador **COI-5P** gerado por NJ, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. A distância entre os terminais foi calculada através do número de substituições; o valor de suporte para os ramos foi calculado por *bootstrap*, 2000 réplicas (apenas valores ≥ 70 são mostrados). A análise foi feita através da matriz de dados número 6, cujas características foram discriminadas na **Tabela IV.1**.

Abreviaturas: RSG, Recife Sebastião Gomes (BA); ICab, Ilha das Cabras (SP); IQG, Ilha da Queimada Grande (SP).

Figura IV.8. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador **psbA**, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma sequência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ/MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 7, cujas características estão discriminadas na **Tabela IV.1**.

Figura IV.9. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador *rbcL-3P*, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de seqüências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As seqüências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma seqüência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ/MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 8, cujas características estão discriminadas na Tabela IV.1.

Figura IV.10. Filograma para inferência filogenética gerado através do marcador **SSU rDNA**, pelos métodos de NJ, MV e IB, incluindo os haplótipos encontrados no Brasil e de sequências obtidas no Genbank (indicadas pelo n de acesso). As sequências produzidas neste trabalho estão em negrito; destas, as coloridas se referem às amostras coletadas no Brasil. Apenas uma sequência de cada haplótipo foi utilizada, com exceção de exemplares oriundos de regiões geográficas muito distintas (França e Irlanda; Ilha da Queimada Grande e Ilha do Arvoredo). Os ramos espessados indicam suporte > 95 para a IB. Os valores de *bootstrap* para NJ/MV (2000/500 réplicas) são exibidos para cada nó quando maiores que 70. A análise foi feita através da matriz de dados número 9, cujas características estão discriminadas na **Tabela IV.1**.

1.2. Aspectos filogenéticos

Conforme comentado, apresentaremos aqui os resultados relacionados a *Amphiroa*, já que a relação entre os demais gêneros da subfamília já foi discutida no **Capítulo 3** (“Espécies incrustantes”).

Os filogramas e o suporte para os ramos, através dos métodos de NJ, MV e IB, nos quais baseamos as relações que vamos discutir adiante estão nas figuras **IV.8**, **IV.9** e **IV.10**, para *psbA*, *rbcl*-3P e SSU rDNA respectivamente.

Todas as sequências disponíveis para *Amphiroa* agrupam-se em um único ramo para todos os marcadores, indicando o monofiletismo do gênero. Os valores de suporte são significativos com o *psbA* através da IB (**Figura IV.8**) e com o SSU rDNA através do NJ e da MV (**Figura IV.10**).

Com a inclusão das espécies amplificadas neste trabalho de Tese nas matrizes de consensos, foi possível fazer a comparação da formação de subgrupos dentro de *Amphiroa* para os distintos marcadores. Como resultado, não observamos um padrão que se repetiu para os três marcadores, de forma que não podemos aceitar algum deles como o que pode ser o mais plausível. Estas variações são discutidas a seguir.

A divisão de *Amphiroa* em dois ramos principais está clara com o *rbcl*-3P, onde vemos um grupo formado pelas espécies que apresentam concomitantemente o espessamento do genículo e a anastomose entre os ramos, (*A. fragilissima* [1 a 6], ou seja, o Complexo *A. fragilissima*), com valor de suporte para a IB. Este subgrupo também inclui *A. fragilissima* dos EUA, *A. tribulus* do México e *A. valonioides* do Havá (sequências do Genbank) – **ramo C** (**Figura IV.9**). Num segundo ramo temos o restante das espécies brasileiras (*A. vanbosseae*, *A. rigida*, *Amphiroa* sp. 1 a 4 e o Complexo *A. beauvoisii*), além de *A. anceps* da Nova Zelândia, *A. beauvoisii* dos EUA, *A. foliacea* do Havá, *A. hancockii*, *A. rigida* do México e *A. zonata* do Japão – **ramo D**.

Como nota, devemos notar que além dos talos do Complexo *A. fragilissima* (**ramo C**), encontramos anastomose em alguns dos indivíduos de *A. vanbosseae* (**ramo D**). Os espécimes examinados para as demais espécies do **ramo D** não apresentaram esta característica. Isso significa que a presença de anastomose não é uma condição sinapomórfica nos talos de *A. vanbosseae* e do Complexo *A. fragilissima*, pois não pode ser utilizada para definir um grupo monofilético.

Com o uso do *psbA* mantém-se o **ramo D** (mesmo que sem suporte), enquanto que o **ramo C** é parafilético (**Figura IV.8**). Observa-se que, apesar de não terem sido produzidos para a inferência filogenética, os agrupamentos vistos com o uso do UPA e do COI-5P (**Figuras IV.6 e IV.7**) também separam as sequências de *Amphiroa* nestes dois grandes ramos, **C e D**.

A organização em subgrupos das sequências de *Amphiroa* muda drasticamente quando utilizamos o SSU rDNA (**Figura V.10**), onde os ramos **C** e **D** não existem. Adicionalmente, vemos que as duas sequências de *A. beauvoisii* [2] não se agrupam - é necessária uma revisão destas sequências. Também se deve notar que, diferentemente de *psbA* e *rbcl*-3P, que contém ao menos um representante de cada uma das espécies brasileiras, apenas seis foram representadas pelo SSU rDNA, o que dificulta a comparação. A futura amplificação de sequências deste marcador para as demais espécies brasileiras poderá modificar ou mesmo reforçar as relações que observamos até o momento.

2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DAS ESPÉCIES

2.1. Chave dicotômica

1a. Genículos nitidamente inchados a olho nú, mesmo que em pouca quantidade e restritos às porções mais basais dos ramos.	Complexo A. fragilissima
1b. Talos sem o intumescimento dos genículos.	2
2a. Genículo sempre com apenas duas fileiras de células, sendo que a zona de contato entre elas é imbricada (“zig-zague”) (corte longitudinal).	A. rigida
2b. Genículos com duas ou mais fileiras de células, porém a zona de contato entre elas é reta ou [mais raramente] irregular.	3
3a. Genículos longos, com 8-12 fileiras de células e intergenículos longos (1-4 cm) (corte longitudinal).	A. vanbosseae
3b. Genículos com menos de 8 fileiras de células; ou, quando apresentam 7-8 fileiras, os intergenículos são curtos (menores que 0,5 cm).	4
4a. Genículos com 7-8 fileiras de células e apenas uma fileira de células longas para cada fileira de células na medula dos intergenículos (corte longitudinal).	Amphiroa sp.2
4b. Genículos com até quatro fileiras de células e intergenículos onde se vê, no mínimo, duas fileiras de células longas para cada fileira de células curtas.	5
5a. “Células bloco” bordeiam o canal do poro nos conceptáculos tetrasporangiais (corte transversal à superfície do talo).	Complexo A. beauvoisii
5b. As células que bordeiam o canal do poro nos conceptáculos tetrasporangiais não são inchadas ou têm um inchaço mais sutil.	6
6a. Observam-se septos nas células da região mais central nos genículos maduros (requer corte longitudinal pela porção central do intergenículo).	Amphiroa sp. 1
6b. Ausência de septos nas células centrais dos genículos maduros.	7
7a. Genículos com 2 a 3 fileiras de células (corte longitudinal).	Amphiroa sp.3
7b. Genículos com 7 a 8 fileiras de células	Amphiroa sp. 4

2.2. As principais características para a distinção das espécies

Uma grande quantidade de características foi observada na busca das que pudessem ser informativas na distinção de espécies. Listaremos estas características seguindo quatro categorias:

- (i) as que são demasiado subjetivas, sujeitas a uma grande margem de diferença de interpretação dependendo do observador;
- (ii) as que puderam ser observadas em todas as espécies, mas que não foram informativas;
- (iii) as que não puderam ser observadas em todas as espécies, o que se deu principalmente nos casos das que foram representadas por poucos indivíduos;
- (iv) as que não foram observadas, para os casos de não encontrarmos determinadas estruturas para observação, ou ainda por opção após a ponderação de alguns fatores;
- (e v) as características que são informativas, mesmo que somente em conjunto com outras.

i. Características demasiado subjetivas, sujeitas a uma grande margem de diferença de interpretação dependendo do observador

. Diferença de comprimento entre as fileiras de células que formam o genículo. Esta característica é inconstante durante o desenvolvimento do genículo e deve ser observada com bastante cautela, de forma que nossa opinião é a de que esta é uma característica demasiado subjetiva, sujeita a uma grande margem de diferença de interpretação dependendo do observador. Como nota, exemplificamos: i. para *A. vanbosseae*, além dos complexos *A. beauvoisii* e *A. fragilissima*, pode acontecer que o padrão de comprimento das fileiras de células do genículo siga a ordem do padrão das células da medula do intergenículo, incluindo mesmo uma ou mais fileiras de células curtas; ii. para *A. rigida* podem ser observados alguns genículos onde uma das duas fileiras de células é menor que a outra, o que deve ser interpretado como estágios distintos de desenvolvimento, já que cortes de genículos de outras porções do talo mostram duas fileiras de igual tamanho – o desenvolvimento do genículo nesta espécie é bastante característico e culmina na existência de duas camadas de igual tamanho, mais longas que as fileiras que encontramos na medula do intergenículo.

. Presença de células periféricas (córtex) na região de genículo. Seguimos o mesmo raciocínio utilizado para o item anterior. Apesar de existirem espécies onde a ausência de córtex no genículo é notável (*A. rigida* e *A. vanbosseae*), ou ainda em que engrossam sobremaneira (para o Complexo *A. fragilissima*), para outras esta característica é inconstante durante o desenvolvimento do genículo e deve ser observada com bastante cautela, de forma que nossa opinião é a de que esta é uma característica demasiado subjetiva, sujeita a uma grande margem de diferença de interpretação dependendo do observador. É o caso das espécies das espécies de *A. beauvoisii*, onde observamos a tendência da perda do córtex na região do genículo de porções mais basais do talo.

ii. Características observadas e não informativas

. Aparência do feixe de paráfises centrais, sendo delicado, relativamente mais “robusto” ou ainda relativamente mais largo (conforme o que encontramos para as espécies incrustantes, no **Capítulo 3**). Para *Amphiroa*, este feixe foi sempre delicado.

. Presença ou ausência da concentração das paráfises na porção central do conceptáculo tetra/bisporofítico. Todos os indivíduos apresentaram esta característica. É importante ressaltar que cortes sequenciais dos conceptáculos sejam feitos, do contrário se pode ter uma observação enviesada no caso em que o feixe de paráfises é ainda mais sutil, como em *A. rigida* e *Amphiroa* sp. 2. Caso semelhante se deu durante a descrição de *L. depressum*, conforme tratado e no **Capítulo 3**.

. Local de formação dos genículos, seja numa região de genículo, seja no meio de um intergenículo. Observamos ambas as situações para as espécies encontradas.

. Formato das células epiteliais (arredondadas ou achatadas). É comum a variação do formato das células epiteliais, inclusive em um mesmo corte do talo, apesar de termos observado que a forma arredondada é mais comum.

. Espessura do intergenículo. Observamos uma grande oscilação deste fator, dependendo do estágio de fertilidade dos talos, já que em talos férteis existe um notável espessamento do córtex, o que pode dobrar esta medida, como observamos para o Complexo *A. beauvoisii*.

. Profundidade na coluna d'água. Apesar de termos encontrado muitas espécies exclusivas para a zona de mesolitoral (ver sessão **3. Distribuição no país - Distribuição na coluna d'água**), consideramos premeditado que esta seja uma característica tomada como informativa para a distinção de espécies. Nosso posicionamento é o de que novos esforços de coleta e de identificação através de dados moleculares deverão trazer novos dados quanto à profundidade de ocorrência destas mesmas espécies, o que não deverá ser levado como um dado contraditório, mas sim complementar ao que apresentamos. Deve-se considerar ainda que a diversidade de espécies de *Amphiroa* de infralitoral é ainda pouco conhecida, pois, ao contrário do que acontece para as espécies incrustantes (que costumam ser coletadas como rodólitos na porção de infralitoral), é raro que se realizem coletas de *Amphiroa* em infralitoral, onde os talos são menos abundantes e, quando presentes, são bastante inconspícuos, sem a formação de tufos.

. Coloração do talo. Esta característica variou bastante e no caso do Complexo *A. beauvoisii*, se mostrou dependente de fatores ambientais: os coletados em mesolitoral foram mais claros, avermelhados ou ainda amarelados, enquanto que os que se desenvolvem em infralitoral são mais escuros, por vezes tendendo ao roxo.

iii. Características observadas, porém inconclusivas

. Tipo de esporos produzidos nos conceptáculos tetra/biesporofíticos (tetrásporos ou bisporos). Não pudemos fazer esta observação para todas as espécies, já que apenas conceptáculos masculinos foram observados em *Amphiroa* sp. 1 e carposporofíticos para *Amphiroa* sp. 4. Como nota, registramos que a geração tetra/bisporofítica de todas as demais espécies produziu exclusivamente tetrásporos.

. Presença ou ausência de mucilagem no processo de liberação dos tetra/bisporos. Conforme exposto no item anterior, não pudemos fazer esta observação para todas as espécies. Apesar disto, como nota registramos que não havia mucilagem neste tipo de conceptáculo, para todos os indivíduos observados.

. Células oblíquas, direcionadas para cima, ao longo do canal do conceptáculo (presentes ou ausentes). Cabe a mesma observação dos dois itens anteriores: falta a caracterização dos conceptáculos tetrasporofíticos para duas espécies. Ao mesmo tempo, este aspecto ainda não é conclusivo para *Amphiroa* sp. 2 e *Amphiroa* sp. 3, sendo que para as demais estas células oblíquas estão sempre presentes (*A. rigida*, *A. vanbosseae*, Complexo *A. beauvoisii* e Complexo *A. fragilissima*).

. Espessamento cortical em ramos férteis (presente ou ausente). Conforme exposto no primeiro item, não pudemos fazer esta observação para todas as espécies. Apesar disto, como nota registramos que para apenas para o Complexo *A. fragilissima* e para *Amphiroa* sp. 3 não observamos este espessamento cortical nos ramos férteis, de modo que os conceptáculos ficam expostos e adquirem aspecto saliente, distintamente arredondado. Desta forma, “a presença de espessamento cortical nos ramos férteis” e “o posicionamento dos conceptáculos em relação à superfície do talo” são características intimamente relacionadas, em que a segunda é resultado do estado da primeira.

. Não concluímos a observação do tipo de desenvolvimento/crescimento da porção basal do talo, fosse monômero ou dímero (**Figura II.2-G**, do **Capítulo 2**). Por ora, os resultados são apenas parciais apontam que: é monômera para *A. vanbosseae* e *Amphiroa* sp. 4; é dímera para *A. fragilissima* [1] e *A. beauvoisii* [3]; é inconstante para *A. rigida*, variando entre dímera ou monômera.

. Da mesma maneira, não concluímos a observação da presença ou não de células alongadas no hipotalo (ou seja, células em paliçada). Apesar disto, deixamos como nota que não existia este alongamento em todas as espécies que pudemos observar a região basal (*A. beauvoisii* [3], *A. fragilissima* [1], *Amphiroa* sp. 4, *A. rigida* e *A. vanbosseae*).

. Arranjo dos filamentos espermatangiais (simples ou dendróides) / número de células suporte destes filamentos. Não dispusemos de indivíduos masculinos férteis de todas as espécies. Como nota, temos que até o momento, o tipo dendróide foi encontrado apenas para o Complexo *A. fragilissima*, e mesmo assim apenas para *A. fragilissima* [5], já que não encontramos conceptáculos masculinos para as outras cinco espécies deste complexo. Não observamos conceptáculos masculinos também para *Amphiroa* sp. 3 e *Amphiroa* sp. 4. O filamento foi simples o

Complexo *A. beauvoisii*, além de *A. rigida*, *Amphiroa* sp. 1 e *Amphiroa* sp. 2. Apesar de ser uma característica de observação inconclusiva até o momento, acreditamos que seja espécie-específica, de modo que os resultados parciais que encontramos aparecem na tabela de características distintivas para as espécies (**Tabela IV.5**).

. Quantidade de células suporte para os ramos espermatangiais. Encontramos sempre uma única célula suporte para os espermatângios de *A. rigida* e *A. vanbosseae* e para o Complexo *A. fragilissima*, enquanto que este número variou de 1 a três para o Complexo *A. beauvoisii*. Apesar disto, como não observamos conceptáculos masculinos para todas as espécies (*Amphiroa* sp. 3 e *Amphiroa* sp. 4), esta segue como uma característica de conhecimento ainda inconclusivo. Por ora, mesmo encontrando esta diferença para o Complexo *A. beauvoisii*, o fato de podermos encontrar apenas uma célula suporte para todas as espécies em que pudemos observar esta característica faz com que não seja possível a distinção de espécies no caso de se encontrar apenas uma célula suporte, o que nos levou a optar por não incluir esta característica na **Tabela IV.5**.

iv. Características não observadas

. Tipo de tricocito produzido, seguindo Townsend & Adey (1990), conforme o que foi utilizado para a caracterização de *Lithophyllum* (no **Capítulo 3**). Diferente do que acontece para os gêneros incrustantes, os talos de *Amphiroa* não se caracterizam na existência de um peritalo e de um hipotalo, mas sim em medula e córtex nas porções eretas. O peritalo e o hipotalo até existem nas porções basais dos talos de *Amphiroa*, mas ainda assim esta região é demasiado reduzida e muitas vezes enterrada no peritalo de um hospedeiro de hábito incrustante, de forma que não encontramos pudemos realizar a observação dos tricocitos também nestas porções. Não existe ainda a caracterização dos tricocitos para as porções eretas de *Amphiroa*. Observamos algumas células de maiores dimensões na camada subepitelial de algumas espécies, porém não temos certeza se isto é apenas o reflexo de um arranjo estrutural frente às formas arredondadas do contorno das fileiras medulares do intergenículo. Em outras palavras, estas células mais inchadas se localizam sempre na direção da junção entre duas fileiras consecutivas da medula do intergenículo. São ainda necessárias investigações específicas quanto à existência ou não, da aparência e da relação destas células inchadas em relação às fileiras de células da medula, antes que se possa ter certeza que se tratam ou não de tricocitos.

. Distribuição dos filamentos gonimoblásticos, em relação à célula de fusão nos conceptáculos carposporofíticos (sejam por toda a superfície, dorsais ou apenas nas porções de borda, ou seja, periféricos). A geração carposporofítica foi encontrada apenas nos talo de *Amphiroa* sp. 4 e mesmo assim, a observação da distribuição dos filamentos gonimoblásticos não foi inconclusiva.

. Da mesma maneira que optamos para as espécies incrustantes (**Capítulo 3**), as dimensões celulares não foram estimadas para *Amphiroa*. Woelkerling e Campbell (1992) também chegaram à conclusão de que este quesito não deveria ser utilizado para a distinção de espécies, após realizarem extensiva pesquisa bibliográfica e também da observação das amostras em seu trabalho. Apesar de que por motivos distintos, nós também optamos por não incluir a tomada de medidas celulares (inclusive de tetrasporângios) no conjunto de características investigadas para a discriminação de espécies. Não existem estudos publicados que comprovem a estabilidade das dimensões celulares em algas calcárias frente a diferentes condições de crescimento dos espécimes, como temperatura e pH da água e profundidade na coluna d'água - além das taxas de crescimento associadas a estes mesmos fatores.

v. Características informativas

A **Tabela IV.5** sumariza as principais características que distinguem ou caracterizam cada uma das espécies ou complexos de espécies. Listamos e numeramos a seguir as características incluídas nesta tabela. As que têm interpretação difícil ou subjetiva foram ilustradas na sessão de metodologia geral (**Capítulo 2**).

• DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

1. Estado ou região geográfica onde cada espécie foi encontrada - considerando-se apenas os talos coletados para esta Tese. Mesmo que a distribuição das espécies encontradas não seja conclusiva, a distribuição das espécies na costa brasileira é apresentada na **Tabela IV.5** por fins ilustrativos. Para a discussão quanto à distribuição das espécies na costa brasileira, consultar a sessão “**3 – Distribuição no país – distribuição geográfica**”.

• CARACTERÍSTICAS VEGETATIVAS

2. Anastomose entre os ramos: **P** presente ou **A** ausente.
3. Intergenículo: quantidade de fileiras de células longas para cada fileira de células curtas, na porção medular⁵.
4. Intergenículo: contorno dos ramos em sua porção distal, sendo **C** cilíndricos, **Sc** subcilíndricos ou **A** achatados.
5. Formato dos ápices dos ramos: **A** agudo, **R** rombudo, **C** comprimido ou **K** “*knife-like*” (bastante comprimidos, chegam a ficar delgados).
6. Genículo: **P** presença ou **A** ausência de intumescimento do córtex.
7. Genículo: número de fileiras de células.
8. Génículo: aspecto da zona de contato entre as fileiras de células do genículo, sendo **R** reta, **Z** imbricada (ou “zig-zague”) ou **I** irregular.
9. Genículo: **P** presença ou **A** ausência de septos nas células mais centrais⁶.

• CARACTERÍSTICAS DO CONCEPTÁCULO TETRA/BISPOROFÍTICO

10. Disposição dos conceptáculos, em relação à superfície do talo: **R** raso; **PS** pouco saliente; **MS** saliente de maneira mediana, intermediária a PS e BS; **BS** bastante saliente (**Figura II.2I**, do **Capítulo 2**).

(os itens 8 a 19 seguem a **Figura II.2J**, do **Capítulo 2**).

11. Cavidade: altura (μm)⁷.
12. Cavidade: diâmetro (μm).

⁵ Células com tamanho intermediário às curtas e longas, ou seja, as de “tamanho médio”, também foram contadas como células curtas, já que estas são apenas um estágio anterior do crescimento das células longas.

⁶ A interpretação da presença de septos nas células do genículo é revista nesta Tese. Até trabalhos anteriores (Moura e Guimarães 2005), a característica se dividia na presença ou na ausência de septos. No entanto, a observação das amostras deste trabalho mostrou que o septo existe nas células do genículo em muitas das espécies, porém em poucas ele é persistente nas porções mais centrais o genículo. Nas demais, existe uma gradação da presença para a ausência dos septos em direção à porção mais central do eixo longitudinal do ramo. Assim, a observação desta característica deve ser feita em cortes que passem pela porção que seria referente ao eixo central (longitudinal) do ramo.

⁷ Diferente do que utilizamos para as espécies incrustantes (Capítulo 3), para *Amphiroa* é inviável fazer a caracterização do conceptáculo quanto ao que se refere à altura e ao diâmetro da cavidade em número de camadas de células. Para muitas das espécies, além de os conceptáculos serem bastante salientes, o córtex é delgado, com poucas camadas, de forma que não existem camadas suficientes como referência para se ter como referência para a contagem da altura em quantidade de camadas de células correspondentes. Ao mesmo tempo, em alguns casos o conceptáculo se desenvolve diretamente sobre as fileiras de células medulares, que têm outro padrão de organização, o que também impossibilita a contagem do diâmetro do conceptáculo em número de células. Igualmente mesmo se aplica para a inferência da altura total do conceptáculo (ou seja, do piso do conceptáculo à célula epitelial), em número de camadas de células.

13. Columela: (elevação central do piso do conceptáculo) **P** presente; **A** ausente / **número de camadas** de células da columela (quando presentes).
14. Espessura do teto (número de camadas de células).
15. **P** presença ou **A** ausência do alongamento das células da camada subepitelial do teto do conceptáculo.
16. Células inchadas circundando o poro: **G** grandes; **B** grandes em formato de bloco; **P** pequenas; **A** ausentes, ou seja, estas células não se diferenciam em aspecto geral das demais células epiteliais/subepiteliais.

Tabela IV.5. Distinção das espécies através das principais características, que foram acima enumeradas (em “v. Características informativas”). (no) indica características não observadas. Abreviaturas para a característica 1 (locais de ocorrência): PML Parcel Manoel Luis (MA), IGde Ilga Grande (RJ), Blnd Banco do Índio (ES), AAlc Arquipélago de Alcatrazes (SP), IBela Ilha Bela (SP), IPal Ilha de Palmas (SP), IQG Ilha da Queimada Grande (SP), IRa Ilha Rapada (SP), IXa Ilha do Xavier (SC).

Características (detalhes na página anterior)																
Espécie ou Complexo de espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Complexo <i>A. beauvoisii</i>	ES, RJ, SP, SC, incluindo Blnd, AAlc, IBela, IPal, IRa, IXa	A	2 a 5	Sc/A	K(C)	A	2 a 4	R/I	P	R/PS/MS/BS	(67)70-150(180)	(120/140)170-255(375)	P(1-3)	3 a 4	P	B
Complexo <i>A. fragilissima</i>	MA, CE, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, SC, incluindo PML, IGde, IBela, IPal, IQG, IXa	P	2 a 5(6/7/9/10)	C(Sc)	R	P	2 a 4(5/7)	R	A	BS	80-135(175)	(100)180-295	A	3 a 4(5)	P	G/B
<i>A. rigida</i>	BA, ES	A	1 a 2	Sc	A	A	2	Z	P	R/PS/MS	62-75(140)	170-250	P(2-3)	3 a 6	P	G/B
<i>A. vanbosseae</i>	BA, incluindo RSG	A/P	1 a 3	C/Sc(A)	A	A	8 a 12	R	A	R/PS/MS	85-105	187-300	P(1-2)	6(7)	A	G/B
<i>Amphiroa</i> sp. 1*	CE	A	5 a 6	C/Sc(A)	B/A	A	2 a 3	I/R	P	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)
<i>Amphiroa</i> sp. 2	BA	A	1	Sc/A	C	A	5	R	P	PS/MS	60-70	175-200	A	3 a 4(5)	A	G
<i>Amphiroa</i> sp. 3	RJ	A	3 a 4	C	B	A	2 a 3	R	A	BS	135	225	P(no)	3 a 4	P	G
<i>Amphiroa</i> sp. 4*	BA	A	3 a 4	A	K(A)	7 a 8	R	A	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)	(no)

* Apenas conceptáculos femininos foram observados em *Amphiroa* sp. 1 e carposporofíticos para *Amphiroa* sp. 4.

2.3. Descrição morfológica das espécies

Complexo *A. beauvoisii* (Fig. IV.11-12)

Descrição original para *A. beauvoisii*: Lamouroux J.V.F. 1816. Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes. pp. [i]-lxxxiv, chart, [1]-560, [560, err], Caen: De l'imprimerie de F. Poisson.

Localidade tipo para *A. beauvoisii*: Portugal (Harvey, Woelkerling & Millar 2009: 268).

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL*-3P; SSU rDNA.

Distribuição geográfica: *A. beauvoisii* é uma espécie de ampla distribuição no globo, incluindo mares tropicais, subtropicais e subantárticos. Para uma distribuição detalhada, por países e ilhas, consultar Guiry & Guiry (2015).

Distribuição no Brasil: PB, PE, BA, ES, RJ, SP, PR, SC, RS, incluindo Arquipélago Fernando de Noronha (PE), Ilhabela (SP), Arquipélago dos Alcatrazes (SP), Ilha das Palmas (SP), Ilha Rapada (SP), e Ilha do Xavier (SC).

Material examinado

Espécie [1] - ES: IBC1218 Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, entremarés, 08.V.2012, 20°38'06.83"S 40°26'13.25"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1226 Enseada Azul, Meaípe, entremarés, 09.V.2017, 20°43'47.63"S 40°31'25.61"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha coll.; IBC1178 Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.; IBC1181 Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.; IBC1182, Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.; IBC1183 Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.. **RJ:** IBC1058 Pr. do Forno, Armação de Búzios, entremarés, 25.IX.2011, 22°45'42.56"S 41°52'29.11"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1095 Prainha, Arraial do Cabo, entremarés, 29.IX.2011, 22°57'22.06"S 42°01'36.30"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1124 Laje Grande, Saco do Mamanguá, Parati, 0,2-1,0m prof., 09.XII.2011, 23°16'20.52"S 44°37'50.39"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1198 Banco do Índio, Anchieta, 16m prof., 11.IV.2012, 4 K 336118 768848, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.; **SP:** IBC1273 Pr. do Julião, Ilhabela, entremarés, 04.VIII.2012, 23°51'12.76"S 45°24'44.53"W, B. Torrano-Silva; Vieira, B.R.; Vieira-Pinto, T. & Azevedo, C.A.A. coll.; IBC1274 Pr. do Julião, Ilhabela, entremarés, 04.VIII.2012, 23°51'12.76"S 45°24'44.53"W, B. Torrano-Silva, Vieira, B.R., Vieira-Pinto, T. & Azevedo, C.A.A. coll.. **SC:** IBC1003 Pr. de Pta. das Canas, Florianópolis, entremarés, 26.II.2012, 27°24.89'S 48°26.78'W, B. Torrano-Silva & P.A. Horta coll..

Espécie [2] - RJ: IBC1046 Pr. da Ferradura, Armação de Búzios, entremarés, 25.IX.2011, 22°46'09.62"S 41°52'59.81"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1077 Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, 1,5m prof., 27.IX.2011, 22°44'27.27"S 41°52'25.81"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.. **SP:** IBC1107 Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, 6-12m prof., 26.X.2011, 24°06'14.7"S 045°42'10.3"W, B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira coll.; IBC1136 Ilha Rapada, 12m prof., 12.I.2012, 23°25'34.07"S 44°54'12.83"W, P.A. Horta coll.; IBC1263 Porto Frades, Ilhabela, entremarés, 04.VIII.2012, 23°55'42.1"S 45°26'38.1"W, B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues, T. Vieira-Pinto & C.A. Azevedo coll.; IBC1266, Porto Frades, Ilhabela, entremarés, 04.VIII.2012, 23°55'42.1"S 45°26'38.1"W, B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues, T. Vieira-Pinto & C.A. Azevedo coll.; IBC1008, Pr. da Fortaleza, Ubatuba, 2m prof., 19.IX.2010, 23°31'55.4"S 45°09'43.6"W, H. Verbruggen, M.B. Barros-Barreto, M.C. Oliveira & B. Torrano-Silva coll.; IBC1238 Pr. de Cibratel, Itanhaém, entremarés, 20.VII.2012, 24°13'18.72"S 46°51'05.11"W, B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues & W. Oliveira coll.. **SC:** IBC1144 Ilha do Xavier, Florianópolis, 12m prof., 24.II.2012, 27°36.34'S 48°23.13'W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1164 Ganchos de Fora, Governador Celso Ramos, entremarés, 27.II.2012, 27°18'21.82"S 48°32'49.83"W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo coll..

Espécie [3] - ES: IBC1227 Enseada Azul, Meaípe, entremarés, 09.V.2017, 20°43'47.63"S 40°31'25.61"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha coll.; IBC1179 Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.; IBC1184 Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.20112, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll.. **RJ:** IBC1087 Pr. da Ilha do Farol, Arraial do Cabo, entremarés, 28.IX.2011, 23°00'05.63"S 42°00'16.38"W, B. Torrano-Silva, F. Nauer & C. Iha

coll.; IBC1129 Pr. Grande, Pouso da Cajaíba, Parati, entremarés, 12.XII.2011, 23°15'49.31"S 44°35'04.43"W, B. Torrano-Silva, F. Nauer & C. Iha coll.. **SP:** IBC1023 Ilha das Palmas, Ubatuba, 5m prof., 29.VIII.2011, 23°32'50.00"S 45°01'50.19"W, B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1113, Ilha do Farol, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, 12m prof., 27.X.2011, 24°05'47.7"S 045°42'09.6"W, M.C. Oliveira & B. Torrano-Silva coll.; IBC1041 Pr. do Éden, Guarujá, entremarés, 12.IX.2011, 23°59'05.10"S 46°11'11.64"W, Medeiros A., C. Iha & F. Nauer coll.. **SC:** IBC1152 Pr. de Pta. das Canas, Florianópolis, entremarés, 26.II.2012, 27°24.89'S 48°26.78'W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso, do entremarés aos 16 m de profundidade.

Características vegetativas

Talos passando desde o desenvolvimento como tufo baixos e intrincados, tufo frouxos com ramos bastante comprimidos a tufo frouxos com ramos levemente flexionados – neste último caso em infralitoral, acima dos 5m de profundidade. Ramos geralmente achatados e mais raramente cilíndricos, com ápices sempre comprimidos lateralmente, variando entre bastante comprimidos (“*knife-like*”) a pouco comprimidos (ou como uma manifestação mais tênue do tipo “*knife-like*”). Não se observam anastomoses entre os ramos, tampouco o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 3-5 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 2-4 fileiras de células com septos internos e zona de contato reta ou irregular (mais raro).

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos pouco a muito salientes em relação à superfície do talo, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 67-180 µm de altura por 120-375 µm de diâmetro. Teto com 3-4 células de espessura, sendo evidente o alongamento da camada subepitelial. Elevação central (columela) insipiente, ausente ou com 1 camada de células, chegando a 3 camadas apenas nos talos de *A. beauvoisii* [1]. Cone de paráfises centrais sempre presente. Observa-se a neoformação do canal do poro, além de células distintamente inchadas em forma de “bloco” circundando o poro, chegando por vezes a projetar-se. Conceptáculos masculinos rasos ou pouco salientes; cavidade com 45-55 µm de altura e 200-225 µm de diâmetro; os espermatângios são simples (não ramificados), cada qual apresentando uma a três células suporte, cobrindo todo o piso do conceptáculo; ausência de columela ou paráfises centrais; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade.

Observações

O complexo é representado por três espécies distintas, todas com a característica célula em forma de bloco delineando o poro do conceptáculo tetrasporangial. Apesar disto, observamos “células bloco” também em outras espécies encontradas (*A. rigida*, *A. vanbosseae* e no Complexo *A. fragilissima*), apesar de que nelas a diferença de tamanho comparado às células vizinhas não é tão grande quanto o que encontramos para o Complexo *A. beauvoisii* (estimativas visuais não mensuradas). De fato, analisando as características que distinguem as espécies de *Amphiroa* com base no conjunto amostral aqui investigado (na chave dicotômica e na **Tabela IV.5**), vemos que este complexo não tem uma característica distintiva única, mas pode ser separado das demais espécies através da observação de inúmeros caracteres conjuntamente, excluindo-se as características que são diagnóstico para as demais espécies. A anatomia dos espécimes concorda também com a revisão baseada em caracteres modernos de Harvey (2009), incluindo o material Tipo da espécie. É um grupo onde a variabilidade morfológica é grande, não apenas no Brasil, e que passará por mais revisões muito em breve.

Complexo *A. fragilissima* (Fig. IV.13-14)

Descrição original para *A. fragilissima*: Lamouroux J.V.F. 1816. Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes. pp. [i]-lxxxiv, chart, [1]-560, [560, err], Caen: De l'imprimerie de F. Poisson.

Localidade tipo para *A. fragilissima*: Jamaica (Yoshida 1998: 533).

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA.

Distribuição geográfica: *A. fragilissima* é uma espécie de ampla distribuição no globo, por mares tropicais e subtropicais, incluindo o Caribe, as ilhas do centro-Atlântico e a costa brasileira. Para uma distribuição detalhada, por países e ilhas, consultar Guiry & Guiry (2015).

Distribuição no Brasil: RN, CE, PE, PA, AL, BA, ES, RJ, SP, SC, incluindo o Parcel Manoel Luíz (MA), Ilha do Francês (ES), Ilha Grande (RJ), Ilhabela (SP), Ilha Anchieta (SP), Ilha de Búzios (SP), Ilha da Queimada Grande (SP), Ilha do Arvoredo (SC) e Ilha do Xavier (SC).

Material examinado

Espécie 1 - AL: IBC1314, Pr. de Pta. do Peba, Piaçabuçu, 0,5m prof., 11.III.2013, 10°21'23.1"S 36°17'45.1"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1335 São Miguel dos Milagres, entremarés, 14.III.2013, 9°16'00.2"S 35°21'55.8"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; **BA:** IBC1403 Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1396 Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1399 Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1400, Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1402, Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1403 Pr. de Jauá, Camaçari, 0,5m prof., 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1412 Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 0,5m prof., 24.V.2013, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1451 Pr. de Guarajuba, Camaçari, entremarés, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1453 Pr. de Guarajuba, Camaçari, entremarés, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1455 Pr. de Guarajuba, Camaçari, entremarés, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1456 Pr. de Guarajuba, Camaçari, entremarés, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1457 Pr. de Guarajuba, Camaçari, entremarés, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; **ES:** IBC1199 Pr. dos Castelhanos, Anchieta, entremarés, 05.V.2012, 20°50'04.18"S 40°37'21.57"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1200 Pr. dos Castelhanos, Anchieta, entremarés, 05.V.2012, 20°50'04.18"S 40°37'21.57"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1225 Enseada Azul, Meaípe, entremarés, 09.V.2017, 20°43'47.63"S 40°31'25.61"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.; **RJ:** IBC1481 Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof., 09.VII.2013, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W; B. Torrano-Silva & F. Nauer coll.; SPF57697/IBC1484 Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof., 09.VII.2013, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, B. Torrano-Silva & F. Nauer coll.; IBC1481 Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof., 09.VII.2013, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, B. Torrano-Silva & F. Nauer coll.; SPF57697/IBC1484 Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof., 09.VII.2013, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, B. Torrano-Silva & F. Nauer coll.; **SP:** IBC1254, Pr. do Viana, Ilhabela, entremarés, 03.VIII.2012, 23°45'31.5"S 45°21'03.2"W, Vieira, B.R. & B. Torrano-Silva coll.; IBC1033 Ilha das Palmas, Ubatuba, entremarés, 30.VIII.2011, 23°32'50.00"S 45°01'50.19"W, B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1040 Ilha das Palmas, Ubatuba, 6-10m prof., 30.VIII.2011, 23°32'50.00"S 45°01'50.19"W; B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1017 Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, 15m prof., 19.IV.2010, 23°59'12"S 46°11'15"W, B. Torrano-Silva & M. Sissini coll..

Espécie [2] - MA: IBC1489 Parcel Manuel Luís, 15m prof., 12.IV.2012, 00°52'S 44°16'W, P.A. Horta coll..

Espécie [3] - SP: IBC1018, Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, 10m prof., 19.IV.2010, 23°59'12"S 46°11'15"W, B. Torrano-Silva & M. Sissini coll..

Espécie [4] - **CE:** IBC1343 Pedra Rachada, Paracuru, entremarés, 24.IV.2013m 3°24'21.4"S 39°01'46.7"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.. **BA:** IBC2591 Pr. do Tororão, Prado, entremarés, 14.V.2014, 17°14'21.8"S 039°12'48.3"W, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos coll..

Espécie [5] - **ES:** IBC1219 Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, entremarés, 08.V.2012, 20°38'06.83"S 40°26'13.25"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.. **RJ:** IBC1057 Pr. do Forno, Armação de Búzios, entremarés, 25.IX.2011, 22°45'42.56"S 41°52'29.11"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1048 Pr. da Ferradura, Armação de Búzios, entremarés, 25.IX.2011, 22°46'09.62"S 41°52'59.81"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1096F Prainha, Arraial do Cabo, entremarés, 29.IX.2011, 22°57'22.06"S 42°01'36.30"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll.. **SC:** IBC1143 Ilha do Xavier, Florianópolis, 12m prof., 24.II.2012, 27°36.34'S 48°23.13'W, B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo coll..

Espécie [6] - **AL:** IBC1304 Pr. de Pta. do Peba, Piaçabuçu, 0,5m prof., 11.III.2013, 10°21'23.1"S 36°17'45.1"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.. **BA:** IBC1454 Pr. de Guarajuba, Camaçari, 0,5m prof., 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1458 Pr. de Guarajuba, Camaçari, 0,5m prof., 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1468, Pr. de Guarajuba, Camaçari, 0,5m prof., 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC1414 Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 24.V.2013, 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC2534F Pta. do Corumbau, Prado, 0,5m prof., 13.V.2014, 16°53'52.0"S 039°06'34.7"W, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos coll.; IBC2534G, Pta. do Corumbau, Prado, 0,5m prof., 13.V.2014, 16°53'52.0"S 039°06'34.7"W, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos coll.. **RJ:** SPF57694/IBC1480 Pr. Vermelha, Ilha Grande, 5m prof., 09.VII.2013, 23°09'34.7"S 044°21'01.3"W, B. Torrano-Silva & F. Nauer coll.; IBC1120 Pr. do Carro, Saco do Mamanguá, Parati, 0,5m prof., 09.XII.2011, 23°14'21.95"S 44°37'06.85"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso, recifes de praia e em banco de rodolitos (Ilha do Xavier, SC), do entremarés aos 15 m de profundidade.

Características vegetativas

Talos passando desde o desenvolvimento como tufos geralmente arredondados, variando entre intrincados (raros) a bastante maleáveis (mais comuns), na maioria dos casos caracterizados por ramos retilíneos. Ramos com formato cilíndrico, ao final dos quais se observam ápices com o mesmo contorno. Sempre se observam anastomoses entre os ramos e o intumescimento dos genículos, porém estas duas características se manifestam em graus variados de indivíduo para indivíduo - nos casos em que o intumescimento não é observado, indica-se observar nas porções mais basais dos tufos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 2-5(6-9) fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 2-4(7) fileiras de células (onde não se observam septos internos), com zona de contato reta.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos mediana ou bastante salientes em relação à superfície, com contorno arredondado, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 80-135(175) µm de altura por 100-295 µm de diâmetro. Teto com 3-4(5) células de espessura. Elevação central (columela) ausente, raramente com 1 camada de células (em *A. fragilissima* [1]). Cone de paráfises centrais sempre presente. Observa-se a neoformação do canal do poro, além de células inchadas que contornam o poro. Conceptáculos masculinos bastante salientes; cavidade com 55-70 µm de altura e 115-205 µm de diâmetro; os espermatângios são dendróides (ramificados), cada qual apresentando uma única célula suporte, restringindo-se à porção mais central do piso do conceptáculo; ausência de columela ou paráfises centrais; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade.

Observações

O complexo é representado por seis espécies distintas, todas com as características que tipicamente caracterizam *A. anastomosans* e *A. fragilissima* na costa brasileira, sendo respectivamente a presença de anastomoses entre os ramos e o intumescimento de parte dos genículos. São necessários mais estudos para identificar a real diversidade e a identidade deste complexo de espécies, que provisoriamente recebe o nome de "Complexo *A. fragilissima*" pelo fato de que *A. fragilissima* é um epíteto mais antigo que *A. anastomosans*.

***A. rigida* Kützing (Fig. IV.15)**

Lamouroux, J.V.F. (1816: 297). Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes. pp. [i]-lxxxiv, chart, [1]-560, [560, err], Caen: De l'imprimerie de F. Poisson.

Localidade tipo: Mar Mediterrâneo (Silva, Basson & Moe 1996: 224).

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA.

Distribuição geográfica: *A. rigida* é uma espécie de ampla distribuição no globo, por mares tropicais e subtropicais, incluindo o Caribe, as ilhas do centro-Atlântico e a costa brasileira. Para uma distribuição detalhada, por países e ilhas, consultar Guiry & Guiry (2015).

Distribuição no Brasil: CE, RN, PE, BA e ES, incluindo o Arquipélago Fernando de Noronha (PE) e a Ilha do Francês (ES).

Material examinado

BA: IBC1450 Pr. de Guarajuba, Camaçari, 26.V.2013, 12°39'01.4"S 38°03'53.4"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.. **ES:** IBC1217 Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, entremarés, 08.V.2012, 20°38'06.83"S 40°26'13.25"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer coll.; IBC1223 Enseada Azul, Meaípe, entremarés, 09.V.2017, 20°43'47.63"S 40°31'25.61"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha coll.; IBC1224 Enseada Azul, Meaípe, entremarés, 09.V.2017, 20°43'47.63"S 40°31'25.61"W, B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha coll.; IBC1180 Pr. da Areia Preta, Anchieta, 0-2m prof., 05.IV.2011, 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W, B. Torrano-Silva & C.E. Amancio coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso e recifes de praia, do entremarés aos 2 m de profundidade.

Características vegetativas

Talos que nunca formam tufos, mas desenvolvem-se como indivíduos frouxamente ramificados, com ramos engrossados pelo super desenvolvimento do córtex - normalmente menos que no caso da espécie anterior, mas quando *A. vanbosseae* tem ramos mais estreitos estes são bastante longos, como palitos, enquanto que isto não acontece em *A. rigida*. Ramos subcilíndricos com ápices agudos. Não se observam anastomoses entre os ramos, tampouco o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 1-2 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; o genículo é bastante típico nesta espécie, apresentando sempre duas camadas de células longas, bastante conspícuas e de altura igual, com abundantes septos internos e zona de contato imbricada (em "zigueague").

Estruturas reprodutivas:

Conceptáculos tetrasporofíticos rasos, pouco a medianamente salientes em relação à superfície, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 62-75(140) µm de altura por 170-250 µm de diâmetro. Teto com 3-6 células de espessura. Elevação central (columela) por vezes pode parecer ausente, mas em cortes adicionais revela 2-3 camada de células. Cone de paráfises centrais presente. Se observa a neoformação do canal do poro, por vezes delineado por células oblíquas, orientadas para cima. No teto do conceptáculo se observam células papiliformes. O poro é delineado por células inchadas e um pouco projetadas.

Observações

A. rigida pode ser facilmente distinguida pela peculiaridade do arranjo das células do genículo, que é formado por duas fileiras nitidamente diferenciadas das células que compõem a medula do intergenículo. Estas duas fileiras são longas, com a zona de contato imbricada, sendo que todas as células têm parede bastante espessada e septos internos. Apesar disto, em alguns casos o aspecto geral do talo pode lembrar os de *A. vanbosseae* (comparar as Figuras IV.15-A e IV.16-B).

***A. vanbosseae* Me. Lemoine (Fig. IV.16)**

Lemoine M. 1929. Les Corallinacées de l'Archipel des Galapagos et du Golfe de Panama. Archives du Muséum National d'Histoire Naturelle sér. 6, 4: 37-88.

Localidade tipo: Galapagos Isl. (Lemoine 1929: 73).

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA.

Distribuição geográfica: *A. vanbosseae* ocorre no Oceano Atlântico incluindo Portugal, Espanha, Ilhas Galápagos, Mauritânia e amplamente no Atlântico Oeste, incluindo a costa brasileira. Para uma distribuição detalhada, por países e ilhas, consultar Guiry & Guiry (2015).

Distribuição no Brasil: BA e ES, incluindo Arquipélago de Abrolhos (BA), Recife Sebastião Gomes (BA), Recifes das Caramuanas (BA) e Ilha do Francês (ES).

Material examinado

BA: IBC1395 Pr. de Jauá, Camaçari, 23.V.2013, 12°49'51.0"S 38°13'44.1"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll.; IBC1007 Recife Sebastião Gomes, Caravelas, 0,5m prof., 25.I.2008, 17°55'22.62"S 39°07'54.48"W, B. Torrano-Silva & E.C. Oliveira coll.; IBC1432 Recifes das Caramuanas, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, 0,5m prof., 25.V.2013, 13°07'16.0"S 38°45'15.5"W, B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre recifes de praia e recifes costeiros, do entremarés a 0,5 m de profundidade.

Características vegetativas

Talos vistosos, dificilmente passando despercebidos, lembrando chifres de veado, nunca formando tufos, mas sim se desenvolvendo como indivíduos frouxamente ramificados, bastante engrossados pelo super desenvolvimento do córtex. Ramos cilíndricos a subcilíndricos, raramente achatados, com ápices afilados. Anastomoses entre os ramos são incomuns, porém foram observadas em um exemplar. Porém não se vê o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 1-3 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 8-12 fileiras de células (sem septos internos), com zona de contato reta entre elas.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporófitos rasos, pouco ou medianamente salientes em relação à superfície, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 85-105 µm de altura por 187-300 µm de diâmetro. Teto com 6(7) células de espessura. Elevação central (columela) discreta, com uma a duas camadas de células. Cone de paráfises presente. Se observa a neoformação do canal do poro, além de células inchadas que circulam o poro.

Observações

A. vanbosseae é distinta das demais espécies pelo aspecto geral do talo (robusto, com intergenículos longos e espessados), ao mesmo tempo em que apresenta a maior quantidade de fileiras de células no intergenículo. É a primeira vez que encontramos anastomose em *A. vanbosseae*, ao mesmo tempo em que esta é a primeira vez que esta característica é vista fora do que conhecíamos como "*A. anastomosans*" e "*A. fragilissima*" para os talos brasileiros.

Existe uma dualidade na nomeação da espécie representada por estes talos no Brasil, entre *A. vanbosseae* e *A. tribulus* (mais raro). Apesar disto, os dados moleculares que apresentamos nas sessões seguintes deste trabalho confirmam que se trata de uma única espécie.

Amphiroa sp. 1 (Fig. IV.17)

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P.

Distribuição no Brasil: CE.

Material examinado

CE: IBC1345 Pr. da Pedra Rachada, Paracuru, entremarés, 24.IV.2013, 3°24'21.4"S, 39°01'46.7"W, B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso, no entremarés.

Características vegetativas

Espécie rara, representada por apenas um talo, formando tufo frouxo e emaranhado. Ramos cilíndricos a subcilíndricos com ápices cilíndricos a um pouco afilados. Não se observam anastomoses entre os ramos, tampouco o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 5-6 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 2-3 fileiras de células com septos internos e zona de contato irregular, sendo reta nos genículos próximos à base.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetra/bisporofíticos, masculinos ou carposporofíticos não encontrados. Conceptáculos femininos rasos ou pouco salientes; cavidade com 45-80 µm de altura e 122-150 µm de diâmetro; ausência de columela ou paráfises centrais; canal do poro caracterizado por fileiras de células oblíquas, originadas do desenvolvimento de filamentos que surgem na região imediatamente periférica à cavidade.

Observações

Apesar de ser uma espécie representada por um talo único, e também de não termos tido a boa sorte de se tratar de um indivíduo tetrasporofítico para sua descrição, sua identidade como espécie distinta das demais é confirmada através de quatro marcadores. O achado futuro de novos indivíduos da espécie, preferencialmente confirmado através da amplificação de um destes quatro marcadores, deve incrementar a caracterização da espécie.

Amphiroa sp. 2 (Fig. IV.18)

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA*, *rbcL* e SSU rDNA.

Distribuição no Brasil: BA.

Material examinado

BA: IBC1475 Pr. de Subaúma, Entre Rios, mesolitoral, 27.V.2013, 12°14'15.9"S 37°46'11.5.8"W, B. Torrano-Silva, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto coll.; IBC2627 Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, 0,5m prof., 16.V.2014, 14°48'21.4"S 039°01'25.2"W, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso e em um recife de praia (poça de maré), do entremarés ao 0,5 m de profundidade.

Características vegetativas

Talos característicos por crescerem individualmente de alga calcária, com a primeira ramificação radial ou “em roseta”, quando partem inúmeros intergenículos do intergenículo basal, amplo e arredondado. São indivíduos pequenos e gregários, com hábito que tende ao decumbente, ramos curtos e espessados bastante característicos. Estes ramos são subcilíndricos a achatados com ápices comprimidos lateralmente. Não se observam anastomoses entre os ramos, tampouco o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observa apenas uma fileira de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 5 fileiras de células com septos internos e zona de contato reta.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos de pouco a medianamente salientes em relação à superfície, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 60-70 µm de altura por 175-200 µm de diâmetro. Teto com 3(4-5) células de espessura. Não se observa a elevação central do piso (columela), tampouco um cone central de paráfises. Nota-se a neoformação do canal do poro.

Observações

Esta é uma espécie completamente distinta de tudo que já foi previamente descrito para o país, apresentando características morfológicas, anatômicas e moleculares distintivas. As distinções morfoanatômicas incluem: primeira ramificação do talo “em roseta”; sempre cinco fileiras de células no genículo, com parede espessada e septos internos às células; apenas uma fileira de células longas para cada fileira de células curtas na porção medular dos intergenículos. É possível que se trate de espécie nova para a ciência.

Amphiroa sp. 3 (Fig. IV.19)

Marcadores amplificados: UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P.

Distribuição no Brasil: RJ.

Material examinado

RJ: IBC1096A Prainha, Arraial do Cabo, entremarés, 29.IX.2011, 22°57'22.06"S 42°01'36.30"W, B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre o costão rochoso, no entremarés.

Características vegetativas

Encontramos apenas um talo para esta espécie, desenvolvendo-se sob a forma de um tufo denso e redondo. Ramos cilíndricos, com ápices com o mesmo contorno. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 3-4 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 2-3 fileiras de células (sem septos internos) e zona de contato reta.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetrasporofíticos bastante salientes em relação à superfície do talo, apresentando contorno bastante arredondado e produzindo tetrasporângios. Cavidade com 135 µm de altura por 225 µm de diâmetro. Teto com 3-4 células de espessura. Cone de paráfises centrais presente. Observa-se o intumescimento das células que circulam o canal do poro.

Observações

Amphiroa sp. 3, apesar de ser uma espécie representada por um talo único, sua identidade como espécie distinta das demais é confirmada através de quatro marcadores (assim como *Amphiroa* sp. 1), o que é essencial principalmente para a distinção entre *Amphiroa* sp. 3 e as espécies do Complexo *A. fragilissima*, que compartilham as mesmas características. O achado futuro de novos indivíduos da espécie, preferencialmente confirmado através da amplificação de um destes quatro marcadores, deve incrementar a caracterização da espécie. A morfologia e anatomia lembram muito as espécies do Complexo *A. fragilissima*, porém os dados moleculares deixam claro que se trata de entidade distinta.

Amphiroa sp. 4 (Fig. IV.20)

Marcadores amplificados: COI-5P, *psbA*, *rbcL*-3P e SSU rDNA.

Distribuição no Brasil: BA.

Material examinado

BA: IBC2624 Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, 0,5m prof., 16.V.2014, 14°48'21.4"S 039°01'25.2"W, B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos coll..

Observações ecológicas

Encontrada sobre em um recife de praia (poça de maré), aos 0,5 m de profundidade.

Características vegetativas

Este é mais um caso de espécie caracterizada por apenas um grupo de talos coletados. Talos pequenos e gregários, com hábito quase decumbente. Ramos espessados, com intergenículos compressos e de contorno irregular. Não se observam anastomoses entre os ramos, tampouco o intumescimento dos genículos. Em corte longitudinal do intergenículo se observam 3-4 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas; genículo caracterizado por 7-8 fileiras de células (sem septos internos) e zona de contato reta.

Estruturas reprodutivas

Conceptáculos tetra/bisporofíticos não encontrados. Conceptáculos carposporofíticos de pouco a medianamente salientes em relação à superfície, produzindo tetrasporângios. Cavidade com 100 µm de altura por 259 µm de diâmetro. Teto com 4(5) células de espessura. Elevação central (columela) insipiente e cone de paráfises centrais também bastante discreto. Não observamos o aspecto do canal do poro. Conceptáculos gametofíticos não encontrados.

Observações

Infelizmente a caracterização dos conceptáculos tetrasporofíticos não foi possível para esta nova espécie para a costa, mas mesmo assim ela pode ser distinguida pelo aspecto geral do talo bastante peculiar (com ramos achatados e de contorno irregular). *Amphiroa* sp. 4, apesar de ser uma espécie representada por um único talo, é confirmada como espécie distinta das demais através de quatro marcadores moleculares (assim como para *Amphiroa* sp. 1 e *Amphiroa* sp. 3). O achado futuro de novos indivíduos da espécie, preferencialmente confirmado através da amplificação de um destes quatro marcadores, pode possibilitar a descrição dos conceptáculos tetrasporofíticos, incrementando a caracterização da espécie.

Figura IV.11 Complexo *A. beauvoisii*, variadas formas para os talos encontrados. A: tufo intrincado com ramos curtos e distintamente achatados. B: outro aspecto para um tufo com ramos densamente justapostos. C: ramos longos retirados de um tufo não intrincado, mostrado em D. E: tufo com aspecto “bagunçado”, de região de infralitoral e de águas túrbidas.

Figura IV.11. Aspectos anatômicos para Complexo *A. beauvoisii*. A. porção de intergenicúlo (abaixo) e genicúlo com duas camadas de células, com zona de contato irregular (porção escura acima), além de uma porção do intergenicúlo, onde a camada de células curtas é indicada por “c”. B: detalhe do intergenicúlo, mostrando três fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (indicadas por “c”). C. conceptáculo tetrasporofítico, mostrando células distintamente inchadas em forma de “bloco” (indicadas por “B”) no canal do poro, além do alongamento da camada subepitelial na região do teto do conceptáculo (seta branca); a seta preta aponta um tetrasporângio.

Figura IV.13. Complexo *A. fragilissima*. A e B: variação encontrada para o aspecto geral do talo, sendo um tufo mais frouxo em A (típico para "*A. fragilissima*") e um mais intrincado em B (típico para "*A. anastomosans*"). C: detalhe de uma anastomose (seta). D: detalhe do intumescimento dos genículos (setas).

Figura IV.14. Complexo *A. fragilissima*. A: detalhe da porção medular do intergenículo, com um caso raro de 9-10 fileiras de células longas para cada fileira de células curtas. B: Detalhe do genículo, que neste caso apresenta quatro fileiras de células, incluindo uma de células curtas ao centro. C: conceptáculo tetrasporófitico, sendo que a seta preta aponta um tetrasporângio, as pontas de setas brancas apontam o alongamento da camada subepitelial do teto e a ponta de seta preta aponta a neoformação do canal do poro. D: conceptáculo masculino, onde se observam os filamentos espermatangiais do tipo dendróide (ramificados; indicados pela seta), concentrados na região mais central do piso do conceptáculo.

Figura IV.15. *Amphiroa rigida*. A e B: diferentes aspectos para a morfologia geral do talo, sendo que em A temos ramos longos e espinhentos, enquanto que em B os ramos são comparativamente mais curtos e grossos. C: detalhe do genículo, mostrando duas fileiras de células bastante diferenciadas, sendo mais longas que as fileiras de células do intergeniculo, apresentando ainda zona de contato do tipo imbricada (ponta de seta). Nota-se o imbricamento também da zona de contato das fileiras de células mais próximas ao genículo (pontas de seta). D: região medular do intergeniculo, mostrando uma a duas fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (indicadas por "c"). E e F: conceptáculos tetrasporófitos, sendo que as setas pretas apontam os tetrasporângios, as setas brancas apontam a neoformação do canal do poro, a ponta de seta branca aponta o alongamento da camada subepitelial e "B" aponta uma célula bloco.

Figura IV.16. *Amphiroa vanbosseae*. A e B: variação encontrada para o aspecto geral do talo, mostrando ramos achatados em A e ramos subcilíndricos em B, sendo que em B se vê a associação com "*A. fragilissima*" (ramos mais finos). C: detalhe do genículo, com aproximadamente 12 camadas de células com paredes espessadas – sendo que este espessamento acontece de maneira irregular nas fileiras mais distais (acima, na imagem) e inclui também algumas fileiras de células curtas (indicadas por "c"). D: padrão de alternância de fileiras de células longas e curtas (indicadas por "c") no intergeniculo. E: conceptáculo tetrasporófito, sendo que a seta preta aponta um tetrasporângio.

Figura IV.17. *Amphiroa* sp. 1. A: aspecto geral do talo, mostrando ramos frouxamente intrincados. B: detalhe do genículo, com duas fileiras de células, com zona de contato reta. C: detalhe da porção medular do intergenículo, neste caso com seis fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (indicadas por "c"). D: conceptáculo feminino, sendo que as tricogines estão apontadas por "t".

Figura IV.18. *Amphiroa* sp. 2. A: aspecto geral do talo, sendo que a ponta de seta aponta uma ramificação em roseta. B: detalhe do genículo, aqui com cinco fileiras de células com zona de contato reta. C: detalhe da porção medular do intergenículo, neste caso com uma a duas fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (c). D e E: conceptáculo tetrasporófitico, onde se nota a ausência de columela; as setas pretas aponta um tetrasporângio e a seta branca aponta a neoformação do canal do poro. F: conceptáculo masculino, com filamentos simples (seta branca).

Figura IV.19. *Amphiroa* sp. 3. A: aspecto geral do talo. B: detalhe da porção medular do intergenículo, neste caso com quatro fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (indicadas por "c"). C: detalhe do genículo, com duas fileiras de células, com zona de contato reta. D: aspecto geral dos conceptáculos tetrasporófitos.

Figura IV.20. *Amphiroa* sp. 4. A: aspecto geral do talo, com o detalhe dos ramos com contorno irregular em B. C: detalhe do genículo, aqui com oito fileiras de células, incluindo uma fileira de células curtas (c), todas com zona de contato reta. D: detalhe da porção medular do intergeniculo, neste caso com quatro fileiras de células longas para cada fileira de células curtas (c). E: conceptáculo carposporofítico, sendo que nesta foto não é possível observar as características descritivas, como o número de camadas CE células no teto e o posicionamento dos filamentos gonimoblásticos em relação à célula de fusão.

3. DISTRIBUIÇÃO NO PAÍS

3.1. Distribuição na coluna d'água

Plotamos na **Figura IV.21** a distribuição das espécies encontradas, de acordo com a profundidade do ponto onde as amostras foram coletadas. Estão discriminadas, individualmente, as espécies dos complexos, *A. fragilissima* e *A. beauvoisii*.

A distribuição segundo sua profundidade de ocorrência foi categorizada em três áreas, de acordo com a metodologia empregada para a coleta dos exemplares:

- . mesolitoral;
- . infralitoral até os 6 m de profundidade;
- . infralitoral em profundidades superiores a 6 m.

Neste cenário, temos que:

- . quase toda a diversidade de *Amphiroa* pode ser encontrada na porção mesolitoral (13/15 das espécies);
- . existem oito espécies exclusivas para a porção mesolitoral e duas exclusivas para o infralitoral acima dos 6 m de profundidade - e, portanto, tipicamente só são acessíveis através da técnica de SCUBA.;
- . as três espécies do Complexo *A. beauvoisii* são as únicas que ocorrem nas três faixas de profundidade.

Estes dados sugerem que *Amphiroa* em geral é um gênero melhor adaptados para o ambiente de mesolitoral. É um dado oposto ao cenário que encontramos para as formas incrustantes, *Lithophyllum* e *Titanoderma* (**Capítulo 3**).

Neste sentido, podemos concluir que as espécies articuladas são mais tolerantes às condições de exposição às quais os talos são submetidos em ocasiões de baixa-maré na porção de mesolitoral do que as espécies incrustantes (com exceção das espécies [1] e [2] do Complexo *A. fragilissima*, exclusivas de infralitoral). Isto inclui as oscilações diárias de exposição ao ar, como consequente ressecamento do talo, aumento da temperatura do talo e da exposição à irradiância solar (incluindo diferentes faixas de espectro de luz, que são absorvidos pela água conforme aumenta a profundidade).

Os talos de *Amphiroa* de mesolitoral tendem a formar tufos ou almofadas, o que confere maior resistência ao embate das ondas no caso de ambientes expostos a esta condição, ao mesmo tempo em que confere maior resistência a dessecação (tanto no caso de ambientes expostos quanto aos protegidos das ondas). Isto já foi comentado em trabalhos anteriores, como no exemplo de Moura e Guimarães (2005) relacionam o hábito prostrado e agregado de *A. beauvoisii* a ambientes batidos, enquanto que o hábito ereto e frouxo da mesma espécie para ambientes calmos e protegidos. Acreditamos que também o acúmulo de epífitos (animais e plantas) nos tufos e almofadas de *Amphiroa* atuem de forma positiva na resistência à exposição à exposição ao ar dos talos de *Amphiroa*, caracterizando uma relação simbiótica entre estes organismos – já que os epífitos são favorecidos pela existência de um microambiente críptico entre os ramos de *Amphiroa*.

Podemos concluir também que a maior relação superfície/biomassa do talo atua de maneira oposta frente à exposição ao ambiente de mesolitoral entre as formas geniculadas e as formas incrustantes, favorecendo *Amphiroa*. Em *Amphiroa* o fato de esta razão ser bem maior está relacionado à existência dos genículos, que conferem flexibilidade do talo. Assim, o genículo é um dos fatores decisivos para a diversificação das espécies de *Amphiroa* em mesolitoral. O contrário é válido para as formas incrustantes, que tendem a ser mais “lisas” e apresentam menos projeções na faixa de mesolitoral (mais resistentes ao embate de ondas), enquanto que em infralitoral encontramos as categorias morfológicas mais delicadas, como a fruticosa, mas principalmente a foliosa, que é exclusiva de infralitoral, justamente por ser a mais delicada.

No **Capítulo 3** revimos o fato de que historicamente, a maior parte das atividades de coleta de algas marinhas na costa brasileira se dá na zona de mesolitoral. Este fator é decisivo para o desconhecimento da diversidade de espécies de *Lithophyllum* e *Titanoderma*, que é maior em infralitoral. Para *Amphiroa*, vemos que apesar de a maior diversidade ocorrer em mesolitoral, a diversidade real de espécies ainda era desconhecida. O fator responsável é justamente a existência de espécies crípticas em *Amphiroa*, o que comprovamos através da

vertente molecular deste trabalho, quando encontramos três espécies crípticas para *A. beauvoisii* e seis para *A. fragilissima* (incluindo o que era conhecido como *A. anastomosans*).

Figura IV.21. Distribuição das espécies encontradas, de acordo com a profundidade do ponto onde as amostras foram coletadas, incluindo as espécies crípticas do Complexo *A. beauvoisii* e do Complexo *A. fragilissima*.

3.2. Distribuição Geográfica

A última revisão de *Amphiroa* para o país (Moura & Guimarães 2005) havia identificado seis espécies para a costa, distribuídas entre o Ceará e o Rio Grande do Sul (**Figura IV.22**). Neste cenário, se observa que: a Bahia e o Espírito Santo comportam a maior diversidade, com cinco e seis espécies, respectivamente; *A. anastomosans*, *A. beauvoisii* e *A. fragilissima* são as espécies melhor representadas ao longo da costa, sendo que ao limite Norte do país encontramos *A. fragilissima* e *A. rigida*, enquanto que no limite Sul encontramos *A. anastomosans* e *A. beauvoisii*; *A. rigida* distribui-se nas zonas tropicais e subtropicais (do CE a SP), enquanto que *A. valonioides* apresenta-se da Bahia ao Espírito Santo; *Amphiroa* cf. *anceps*, uma espécie rara para todo o Atlântico americano, distribui-se de maneira ainda mais restrita, exclusivamente “no litoral sul do Espírito Santo, crescendo no infralitoral (28-40 m), sob fundo de cascalho e areia fina”.

As 15 espécies reveladas pela vertente molecular de nosso trabalho (incluindo os dois Complexos de com um total de nove espécies) traz um maior esclarecimento não apenas quanto à diversidade, mas também quanto aos padrões de sua distribuição na costa brasileira (**Figura IV.23**).

O Complexo *A. fragilissima* tem a distribuição mais ampla na costa, desde o MA (no Parcel Manoel Luís) até SC. Apesar disto, as espécies que compõem este complexo têm distribuição disjunta, sendo que *A. fragilissima* [1] é a mais comum ao longo da costa, presente desde PE até SP.

Observa-se que algumas espécies têm distribuição pontual:

- *A. fragilissima* [2] é restrita ao Parcel Manoel Luís (MA);
- *A. fragilissima* [3] para a Ilha da Queimada Grande (SP);
- *Amphiroa* sp. 1 em Paracurú (CE);
- *Amphiroa* sp. 2 à BA (a Sul Ilhéus e a Norte Entre Rios);
- *Amphiroa* sp. 3 em Arraial do Cabo (RJ);
- e *Amphiroa* sp. 4 a Ilhéus (BA).

Estes padrões de distribuição para as espécies de *Amphiroa* na costa correspondem ao que foi proposto por Horta *et al.* (2001) para a caracterização da distribuição das macroalgas baseando-se nos padrões de composição da flora marinha bentônica, da temperatura da água, no aporte de água doce pelos rios (influenciando na salinidade e na turbidez da água) e também pela deriva continental (**Figura IV.22**). As correlações que encontramos foram:

- *Amphiroa rigida* e *A. vanbosseae* se distribuem na faixa da Zona Tropical que vai do Norte da Bahia ao ES. Lembrando que o ES, sendo uma zona de transição, comporta espécies presentes a Norte e a Sul dali, portanto é natural que algumas espécies estejam presentes justamente na faixa que vai do Norte da Bahia até o ES (ou seja, a partir do sul da extensa zona de manguezais de SE até a faixa de transição entre as duas zonas, no ES).
- O Complexo *A. beauvoisii* respeita a Zona Temperada Quente, incluindo a Zona de Transição (ES).
- É possível que *A. fragilissima* [5] obedeça ao mesmo padrão descrito acima (e não ter sido coletado em SP pelo acaso), já que foi encontrada do ES a SC.
- *A. fragilissima* [4] corresponde à Zona Tropical como um todo, neste caso superando a barreira de manguezais que existe nos arredores de SE.

Adicionalmente, podemos propor uma relação entre a distribuição das espécies de *Amphiroa* e o padrão de circulação de águas superficiais ao longo da costa (**Figura IV.24**). A partir da bifurcação das águas quentes da Corrente Sul Equatorial na porção extremo Leste do Nordeste, existe uma corrente que migra para o Sul (a Corrente do Brasil) e outra que corre na direção Norte (a Corrente das Guianas⁸). São evidências:

- *A. fragilissima* [1] distribui-se amplamente, de PE a SP (superando a Zona de Transição do ES).

⁸ Dados apresentados sob a forma de pôster: Torrano-Silva B.N.; Riosmena-Rodríguez R. & Oliveira M.C. 2014. Una diversidad desconocida: el caso del género *Amphiroa* em Brazil, desvelado por Barcoding. 2014. X Congresso de Ficología de Latinoamérica y El Caribe, y VIII Reunión Iberoamericana de Ficología. Metepec, México. Na ocasião, o trabalho foi premiado como o melhor na categoria de Doutorado.

- *A. fragilissima* [6] foi encontrada na faixa que corresponde ao início da influência da Corrente do Brasil e a Zona de Transição (ES), ou seja, de AL ao RJ.
- Excetuando-se *A. fragilissima* [4], as espécies banhadas pela Corrente das Guianas (*A. fragilissima* [2] e *Amphiroa* sp. 1) são distintas dos que são banhados pela Corrente do Brasil.

Assim, as espécies banhadas pela das Guianas (*A. fragilissima* [2] e *Amphiroa* sp. 1), são distintas das que são banhadas pela corrente Corrente do Brasil - todas as demais espécies, excetuando-se *A. fragilissima* [4], que será discutida mais adiante.

A proposta da correlação da costa do ES à Zona de Transição para a distribuição das macroalgas na costa brasileira se apóia na diversidade de ambientes encontrados (recifes, costões rochosos, bancos de rodólitos, manguezais e bancos de angiospermas marinhas), além da existência de pontos ressurgência (Horta *et al.* 2001). Neste sentido, consideramos natural que se amplie esta Zona de Transição até o Estado do RJ (conforme indicado por *A. fragilissima* [6]), para onde também existem dados de pontos importantes de ressurgência, principalmente nos arredores de Cabo Frio (Valentin *et al.* 1987; Elias 2009). É relevante pontuarmos que Cabo Frio já foi referida como uma região que funciona como barreira geográfica para a flora de macroalgas brasileira, ao mesmo tempo que permite a existência de espécies com preferência por condições temperadas de temperatura da água (Yoneshigue 1985). Pode ser que este seja o caso de *Amphiroa* sp. 3.

Tendo em vista que este é um grupo de organismos bentônicos, dotados de gametas e esporos sem flagelos, a distribuição das algas marinhas bentônicas deve obedecer aos padrões da movimentação das águas costeiras. Ainda neste sentido, a comunicação entre as populações a Norte e a Sul desta zona divisora [da Corrente Sul Equatorial] se torna extremamente dificultada, o que no entanto pode ser eventualmente superada através de dispersores, naturais ou antropogênicos.

A dispersão natural de organismos bentônicos marinhos com mobilidade reduzida pode ser associada ao transporte de qualquer substrato flutuante ao longo das correntes costeiras ou ainda do Giro do Atlântico Sul, entre a América do Sul e o Oeste da África (**Figura IV.25**), de forma que existe a possibilidade de que espécies presentes na área da Corrente do Brasil acabem por se dirigir rumo Leste através da área mais central do Atlântico, depois partir em direção ao Equador pela Corrente de Benguela e por fim viajar de volta à costa brasileira através da Corrente Sul Equatorial. Deste ponto, as estruturas flutuantes poderiam ser transportadas novamente para a área da Corrente do Brasil ou então, diferentemente, para a área banhada a Norte pela Corrente das Guianas, chegando à costa e colonizando esta uma área disjunta da faixa original de ocorrência. Este padrão de circulação de estruturas flutuantes é bastante conhecido para as zonas de grandes giros do mundo todo, e se inicialmente acontecia o transporte de estruturas animais e vegetais, hoje vemos o acúmulo e o transporte de grandes quantidades de lixo (e.g. Galil & Zenetos 2002; Derraik 2002; Barnes & Miller 2005). Este pode ter sido o caso de *A. fragilissima* [4], que se distribui tanto a Norte quanto a Sul do ponto de divergência das duas correntes costeiras brasileiras.

As ferramentas de identificação molecular têm tido participação importante na detecção de padrões introduzidos na distribuição de espécies marinhas, como é o exemplo de Milstein *et al.* 2015. Acreditamos que os dados que apresentamos possam ser testados num futuro próximo, com a amplificação destes marcadores moleculares para *A. fragilissima* de outras porções banhadas pelo Oceano Atlântico, principalmente a costa africana e o Caribe. Acreditamos que muito mais detalhes quanto aos padrões de distribuição de algas calcárias na costa brasileira ainda poderão ser revelados com a inclusão de amostras oriundas de áreas que não puderam ser incluídas neste trabalho, como o litoral do MA, PI, RN, PE, PR, RS e outras porções insulares.

Figura IV.22. Distribuição espacial das espécies de *Amphiroa* para o Brasil conforme previamente citados pela lietratura, relacionadas a cada Estado da Federação (Moura & Guimarães 2005; Figueiredo 2005).

Figura IV.23. Distribuição espacial das espécies de *Amphiroa* para o Brasil segundo os dados moleculares apresentados neste trabalho, baseados em sua ocorrência por cada Estado da Federação e de suas regiões insulares e oceânicas incluídas nos pontos de coleta.

Figura IV.24. Sobreposição da representação gráfica da distribuição das espécies de *Amphiroa* para a costa brasileira (segundo os dados moleculares apresentados neste trabalho), os padrões de circulação superficial oceânica da costa (setas à direita) e os padrões de distribuição das macroalgas marinhas na costa brasileira, de acordo com Horta *et al.* 2001 (adaptado da Fig. 5, pág. 256). Nesta imagem, os dados para as porções insulares foram mesclados com os das porções costeiras (para sua discriminação, consultar a **Figura IV.22**). As faixas em laranja correspondem à Região Tropical, interrompida pela área de Domínio de Manguezais (em verde); A faixa roxa representa a Zona de Transição; e a faixa azul clara representa a Região Temperada Quente.

Figura IV.25. "O Giro do Atlântico Sul. Autor: Jrockley, Domínio Público via Wikimedia Commons.

DISCUSSÃO

As espécies presentes na costa brasileira - diversidade e nomenclatura

Estão representados por marcadores moleculares para o Brasil, até o momento, 15 espécies de *Amphiroa*. Esse número é maior que o dobro das espécies anteriormente verificadas na última ocasião da revisão das espécies para a costa brasileira onde foram listadas seis espécies (Moura & Guimarães 2005). Isto foi possível por meio da abordagem molecular utilizando quatro marcadores distintos: UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*-3P. Os resultados basearam-se em um consenso de cinco métodos de agrupamento (Tx.Div.+NJ, ABGD, MDS, PTP e SPN), além dos valores de divergência (intra e interespecífica) e de verificação do *barcoding gap*. Estas 15 espécies ainda devem passar por um aprofundamento investigativo, incluindo a comparação molecular e anatômica com exemplares oriundos de outras partes do globo: os grupos que ainda não puderam ser identificados (*Amphiroa* sp. 1 a 4) e os dois complexos de espécies, *A. fragilissima* e *A. beauvoisii*, com seis e três espécies, respectivamente. Estes dois complexos de espécies merecem atenção especial por apresentarem semelhanças morfológicas e anatômicas bastante marcadas, além de valores de divergência interespecífica reduzidos, quando comparados com os que encontramos entre as demais espécies. Além destes dois complexos, neste trabalho incluímos pela primeira vez a descrição morfológica/anatômica e molecular de outras seis espécies para a costa brasileira: *A. vanbosseae*, *A. rigida*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3 e *Amphiroa* sp. 4.

Dado que o banco de dados de *Amphiroa* no Genbank é muito reduzido, a adição destas informações nas análises não possibilitou a confirmação molecular da maioria das espécies, já que sequências de amostras oriundas das localidades Tipo, ou mesmo dos espécimes Tipo não estavam entre as disponíveis. O maior incremento, neste sentido, foi para *A. fragilissima* [6], que foi representada por uma sequência de *rbcl*-3P muito próxima a um exemplar coletado na Flórida (EUA), o que é relativamente mais próximo do local Tipo, a Jamaica. Outras afinidades incluem: *A. rigida* do Brasil e *A. rigida* do Caribe mexicano pelo *rbcl*-3P (sendo que o Tipo é originário do “Mar Mediterrâneo”, sem exatidão do ponto de coleta); *A. beauvoisii* [2] e *A. beauvoisii* da Carolina do Norte pelo UPA e o COI-5P (EUA, sendo que o Tipo é oriundo da costa de Portugal); *Amphiroa* sp. 4 e *A. hancockii* pelo SSU rDNA (sendo o local Tipo no Panamá); e por fim uma afinidade bastante sutil entre *A. fragilissima* [3] e *A. valonioides* do Havaí pelo UPA e pelo COI-5P (o local Tipo está no Japão) (Tabela V.4).

Desta forma, dois fortes argumentos ainda devem fomentar a investigação da diversidade específica de *Amphiroa*: a escassez de dados moleculares, quando comparado a outros grupos de algas marinhas, inclusive às outras algas calcárias; e o estado inicial de revisão das características taxonomicamente importantes, considerando-se os aspectos reprodutivos e do hipotato, que são via de regra descrito para todas as formas incrustantes de Corallinophycidae e que apenas agora começam a ser utilizadas em *Amphiroa*.

A escassez prévia de dados moleculares de *Amphiroa* nos bancos de dados reforça a importância dos resultados apresentado nesta Tese, que enriquecem de forma bastante significativa o conhecimento total que temos na atualidade para a variação molecular do gênero.

Aplicação dos métodos de agrupamento na discriminação das espécies da costa brasileira e avaliação dos diferentes marcadores como *DNA Barcodes*

Os cinco métodos utilizados (Tx.Div.+NJ, ABGD, SPN, MDS e PTP) em geral agruparam as sequências amplificadas para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcl*-3P) de maneira similar; as exceções são dos dois complexos de espécies, "*A. fragilissima*" e "*A. beauvoisii*", nos quais as espécies relacionados são unidas ou individualizados de acordo com os distintos métodos de agrupamento utilizados. Estas análises corroboram a interpretação de que as amostras que representam cada um destes dois complexos são muito similares quanto à morfologia e anatomia.

Para todas as espécies encontramos valores elevados de suporte de *Bootstrap* através do método de NJ, variando entre 99 e 100%. A sensibilidade dos marcadores para a distinção de espécies, baseando-se nos valores de *barcoding gap* é, da maior para a menor: *rbcl*-3P = COI-5P > *psbA* > UPA quanto aos valores de divergência interespecífica; e *rbcl*-3P > *psbA* > COI-5P = UPA, no que concerne aos valores de *barcoding gap* (Tabela V.3).

A dificuldade encontrada em amplificar o COI-5P foi bastante discutida no **Capítulo 3**, com os espécimes incrustantes. Com *Amphiroa* também encontramos uma dificuldade adicional de amplificação, quando comparado aos demais marcadores, incluindo a não padronização no sucesso da utilização dos distintos pares de *primers*, além de variadas necessidades de diluição do DNA, para obter sucesso na amplificação. Apesar disto, com os representantes geniculados esta diferença não foi tão marcada, de modo que conseguimos sequências de 14 das 15 espécies para este marcador. Considerando-se a dificuldade encontrada com as amostras incrustantes, seria mais recomendável o uso preferencial de outro marcador como *DNA Barcode* para as algas calcárias, de modo que se enriqueça consecutivamente o banco de dados de outro marcador, possibilitando um incremento na capacidade de identificação de amostras quando estes bancos de dados sejam utilizados.

O UPA, como esperado, é o marcador mais conservado dentre todos os utilizados, o que se verifica pelos valores mais reduzidos para divergência interespecífica e de *barcoding gap* (Tabela V.3). A comparação deste marcador com o COI-5P como *DNA Barcode* é um ponto importante, já que estes são dois marcadores propostos para este fim junto às algas marinhas (Saunders 2005; Sherwood & Presting 2007). Já era conhecido que o UPA é um marcador mais conservado em relação ao COI-5P (e.g. Sherwood *et al.*; 2010a; 2010b; Clarkston & Saunders 2010; Milstein *et al.* 2011) e que, portanto, a obtenção de sequências é facilitada com o UPA com o uso de *primers* universais (em relação ao COI-5P; Sherwood *et al.* 2010a; Milstein *et al.* 2011). Sherwood *et al.* (2010b) em uma investigação com a flora de algas do Havaí, viram que, apesar de o UPA ser duas vezes mais conservado que o COI-5P, fornece uma topologia de árvore similar. O mesmo foi encontrado para Gelidiales por Freshwater *et al.* (2010), para *Porphyra* por Milstein *et al.* (2011). Para as *Amphiroa*, a relação encontrada entre as espécies com estes dois marcadores não foi a mesma, apesar de termos obtido altos valores de suporte para cada espécie individualmente e também para cada um dos dois complexos (*A. fragilissima* e *A. beauvoisii*). De fato houve mesmo casos em que não encontramos variação intraespecífica (para *A. beauvoisii* [1] e *A. beauvoisii* [3]) com o UPA, diferente do que encontramos com o COI-5P. Apesar disto, a comparação que realizamos com os outros marcadores confirma que o UPA foi eficiente na distinção de espécies, identificando os mesmos ramos e apresentando valores de *barcoding gap* suficientes ((5,9)10,8-27,6), ainda que apresentando valores máximos inferiores aos que os encontramos para os demais marcadores. Desta forma, e concordando com os resultados encontrados para a mesma comparação previamente feita para outros grupos de algas, além do que encontramos para as formas incrustantes no **Capítulo 3**, concluímos que mesmo tendo menor poder de distinção de haplótipos em uma mesma espécie, o UPA tem poder de aplicação para a distinção e identificação de espécies - o que afinal é a ideia de um marcador para *DNA Barcoding*.

Na comparação do uso do COI-5P com o *rbcl*-3P como *DNA Barcode* para as Gelidiales, Freshwater *et al.* (2010) concluíram que com o primeiro se encontra uma divergência intraespecífica maior, com algumas exceções; os autores também encontraram maiores valores para *barcoding gap* com o COI-5P, porém o *rbcl* foi capaz de distinguir espécies intimamente relacionadas (com apenas uma exceção). Para o caso das *Amphiroa* observamos o contrário, já que os valores de *barcoding gap* para o COI-5P (3,5-70,9) são menores que para o *rbcl*-3P (24,5-228,1) (Tabela V.4). Para o caso dos dois complexos que trabalhamos confirmamos que o COI-5P propicia melhores valores de divergência interespecífica apenas para o Complexo *A. fragilissima* (2-13,6% com o *rbcl* e 7,3-12,7% com o COI-5P), enquanto que para o Complexo *A. beauvoisii* os valores são semelhantes (6,4-8,4% com o *rbcl*-3P e 7,1-8,2% com o COI-5P) (Tabela V.4). A divergência intraespecífica encontrada com o *rbcl*-3P (0-0,3%) foi menor que a do COI-5P (0-0,9%), de forma que, igualmente para o que foi encontrado para Gelidiales (l.c.) e

também para as formas incrustantes de Lithophylloideae (**Capítulo 3**), o *rbcl*-3P poderia apresentar um poder de resolução intraespecífica um pouco menor que o que encontramos com o COI-5P.

Na ocasião da proposta do uso do *psbA* como marcador para as algas calcárias no lugar do SSU rDNA (Broom *et al.* 2008), existia a expectativa de que este seria um bom candidato para a discriminação de espécies. A série de experimentos que fizemos, tanto com as formas incrustantes (**Capítulo 3**), quanto com *Amphiroa*, confirma que realmente é possível usar o *psbA* para este fim – apesar de termos incluído apenas as Lithophylloideae nas comparações, acreditamos que um quadro parecido possa ser encontrado com outros grupos de algas calcárias. O valor de *barcoding gap* encontrado é suficiente ((11,3)15,2-78,7 para *Amphiroa*, e 2,35-56,32 para as incrustantes) e o intervalo de divergência intraespecífica (0-0,3% tanto para as *Amphiroa* quanto para as incrustantes) é igual ao que tem sido encontrado na bibliografia para outros grupos em Rhodophyta (**Tabela IV.4**). O uso do *psbA* para a discriminação de espécies no grupo das Corallinophycideae começou a ser testado apenas nos últimos anos, de forma que até agora os únicos trabalhos são os de Sissini *et al.* (2014) para as Hapalidiaceae, e de Hernandez-Kantun *et al.* (2015), para espécies formadoras e não formadoras de rodólitos de terminais específicos de Corallinales. Aqui confirmamos, em um estudo comparativo, a informação de que o *psbA* apresenta divergência interespecífica menor que o *rbcl* (**Tabela IV.3**), concordando com o que já tinha sido encontrado dentro de Wrangeliaceae (Ceramiales; Yang & Boo 2004). Uma observação importante é quanto ao tamanho empregado para este marcador (904 pb neste trabalho), o que pode exigir o uso de *primers* internos para o sequenciamento, o que não é interessante para um marcador do tipo *DNA Barcode*, que idealmente deve ser amplificado e sequenciado utilizando-se um único par de *primers*.

Para todos os marcadores utilizados encontramos valores de divergência interespecífica consistentes, apoiados por valores expressivos de *barcoding gap*. Mas assim como o fizemos no **Capítulo 3**, vale a pena lembrar da exceção encontrada pelo trabalho de Gabrielson *et al.* (2011), onde se encontrou apenas 0,57% de divergência entre as sequências de duas espécies de *Calliarthron* (Corallinoideae), o que também foi apoiado por dados morfométricos e biogeográficos; este caso enfatiza a importância de se adotar uma abordagem holística no uso dos marcadores moleculares junto de outros caracteres para a delimitação de espécies.

Encontramos que todos os marcadores testados podem ser utilizados para a distinção de espécies, sejam *Amphiroa*, sejam incrustantes de Lithophylloideae, considerando-se os valores de divergência intra e interespecíficas para cada grupo. Da mesma forma que o fizemos, o desempenho destes marcadores deve ser testado e “calibrado” para cada grupo de organismos. Considerando-se, entretanto, a praticidade de obtenção de dados dos referidos marcadores (ou seja, a amplificação e produção de sequências de qualidade), devemos relembrar da dificuldade encontrada com o *cox1*, que pode restringir a aplicabilidade deste marcador como *DNA Barcode*. Por este e todos os outros fatores discutidos anteriormente, segundo os marcadores e o grupo amostral (*Amphiroa*), a porção 3' do *rbcl* seria o marcador mais indicado, seguido do *psbA* e finalmente do UPA; com as formas incrustantes, o segundo lugar ficou com o UPA e o terceiro com o *psbA*. Assim sendo, os resultados destes dois capítulos (**3** e **4**) indicam o *rbcl*-3P o marcador mais eficiente para Lithophylloideae, apresentando ainda a vantagem de também proporcionar suporte à filogenia.

Aspectos filogenéticos

Os aspectos relacionados a Lithophylloideae em geral, bem como entre os gêneros desta subfamília, já foram abordados no **Capítulo 3**. As discussões a seguir restringem-se a *Amphiroa* e baseiam-se nos resultados encontrados com o *psbA* (**Figura IV.16**), *rbcl*-3P (**Figura IV.17**) e SSU rDNA (**Figura IV.18**).

A comparação do desempenho destes três marcadores para a filogenia de *Amphiroa* deve ser feita com cautela pois, conforme comentado na sessão de Resultados, não encontramos as mesmas sub-relações através das três inferências (**Figuras IV.16 a IV.18**). Comparativamente, vemos que o *rbcl* possibilitou a maior proporção de ramos [internos em *Amphiroa*] com alto suporte para qualquer uma das análises realizadas (NJ, MV ou IB), sendo 16/21 para o *rbcl*-3P, 11/18 com o *psbA* e 3/6 com o SSU rDNA (**Figuras IV.16 a IV.18**).

Da mesma forma que o que encontramos para as formas incrustantes, a relação encontrada entre as espécies que encontramos para *Amphiroa* (e as relacionadas aos dados do Genbank) também não foi a mesma através do uso dos três marcadores – apesar de termos encontrado um consenso para *rbcl*-3P e SSU rDNA na subdivisão de Lithophylloideae em dois grandes ramos no **Capítulo 3**. Quanto a isto, deve-se considerar que os três resultados foram obtidos através de uma quantidade e qualidade distinta de dados (espécies) para os três marcadores, o que pode ser uma das causas da discrepância do cenário encontrado, principalmente no caso do SSU rDNA, representado por apenas 12 haplótipos de *Amphiroa*.

Com este trabalho incrementamos grandemente o banco de dados para os referidos marcadores para *Amphiroa*, passando de 2 para 54 sequências para o *psbA*, de 2 para 31 sequências com o *rbcl* e de 12 para 21 sequências com o SSU rDNA. As análises indicam a continuidade de *Amphiroa* como um gênero monofilético, conforme já havia sido mostrado em trabalhos anteriores (Bailey 1999; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011; Richards *et al.* 2014; Hernandez-Kantun *et al.* 2015).

CONCLUSÕES

- É a primeira vez que a diversidade específica de *Amphiroa* é investigada, de forma somatória e comparativa, quanto a uma variedade de aspectos que incluíram os morfológicos/anatômicos, moleculares e ecológicos, apresentados em diferentes sessões deste capítulo.
- É a primeira vez que se utiliza para as *Amphiroa* da costa brasileira uma grande quantidade de características que anteriormente só eram utilizadas para os gêneros incrustantes de Lithophylloideae.
- Encontramos quinze espécies de *Amphiroa* para a costa brasileira, que dividimos entre seis espécies distintas mais dois complexos de espécies proximamente relacionadas: *A. rigida*, *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3, *Amphiroa* sp. 4, o Complexo *A. fragilissima* (com seis espécies) e o Complexo *A. beauvoisii* (com três espécies).
- A ferramenta molecular possibilitou, pela primeira vez, a identificação de espécies crípticas para *Amphiroa*, o que levou à proposta de criação do Complexo *A. beauvoisii* (com três espécies) e do Complexo *A. fragilissima* (com seis espécies).
- Os quatro marcadores testados para a distinção de espécies, UPA, COI-5P, *psbA* e a porção 3' do *rbcl*, são confiáveis para a delimitação de espécies de *Amphiroa*, proporcionando ótimos valores de suporte para as espécies e valores significativos de *barcoding gap*.
- Os cinco métodos de agrupamento apresentam resultados similares para as seis espécies individuais encontradas, enquanto que dentro de cada um dos dois complexos de espécies a interpretação variou entre os métodos, o que enfatiza a proximidade das espécies envolvidas.
- *Amphiroa* continua sendo um gênero monofilético, considerando o espectro geográfico das sequências disponíveis: Brasil, Caribe mexicano, Flórida (EUA), Irlanda, Japão, Nova Zelândia e Sudeste australiano. Apesar disto, devemos considerar que este banco de dados ainda é bastante restrito, faltando informações oriundas de zonas geográficas distintas como o Oceano Índico, o Atlântico Leste, o Mediterrâneo e toda a costa Oeste das Américas.
- Com este trabalho multiplicamos grandemente o banco de dados para os referidos marcadores para *Amphiroa*, passando de 8 para 91 sequências de UPA, 5 para 35 sequências de COI-5P, 2 para 54 sequências para o *psbA*, de 2 para 31 sequências com o *rbcl* e de 12 para 21 sequências com o SSU rDNA.
- Este trabalho é pioneiro na comparação das características morfológicas e anatômicas de *Amphiroa* a dados moleculares. Isto permitiu a avaliação de uma grande quantidade de características anteriormente propostas para a distinção de espécies, ao mesmo tempo em que reinterpretamos algumas delas e propusemos outras novas.
- A distribuição das espécies de *Amphiroa* ao longo da costa brasileira possibilitou um incremento à discussão quanto à distribuição das macroalgas marinhas bentônicas na costa, adicionando ao cenário o papel das correntes costeiras e do Giro do Atlântico Sul. Também registramos que a zona de transição (entre a Região Tropical e a Região Temperada Quente), outrora apenas para o ES, passe a considerar também o RJ, conforme trabalhos pretéritos.
- Existe uma diferença bastante representativa entre a diversidade de espécies encontradas nas zonas de meso e de infralitoral, sendo que para *Amphiroa* a maior diversidade está no mesolitoral. Também encontramos espécies exclusivas de áreas que normalmente só são acessíveis através de mergulho equipado (SCUBA). Estes fatos sugerem a necessidade de se incluir diferentes técnicas de coleta nos trabalhos de diversidade em Florideophycidae, do contrário podemos negligenciar uma diversidade inexplorada.
- Os padrões que observamos para a distribuição das espécies no gradiente latitudinal da costa brasileira obedecem, em linhas gerais, ao que foi proposto para a caracterização da distribuição das macroalgas marinhas brasileiras baseando-se nos padrões observados por Horta *et al.* (2001). Adicionalmente, os dados que apresentamos sugerem a relevância de outro fator de influência na distribuição das algas marinhas na costa: o padrão de circulação de águas superficiais ao longo da costa.

Capítulo 5

Paulsilvella

APRESENTAÇÃO

O achado desta alga inconspícua e aparentemente rara, pela primeira vez fora do Oceano Índico, foi divulgado recentemente como artigo em revista internacional (1).

Além disto, o trabalho foi apresentado em congresso nacional da área (2), quando foi contemplado com o primeiro lugar do *Prêmio Joly*, categoria Pós Graduação.

(1) Torrano-Silva B.N.; Riosmena-Rodríguez R.; Oliveira M.C. 2014. Systematic position of *Paulsilvella* in the Lithophylloideae (Corallinaceae, Rhodophyta) confirmed by molecular data. *Phytotaxa* 190: 94-111.

(2) Torrano-Silva B.N.; Riosmena-Rodríguez R.; Oliveira M.C. 2014. *Paulsilvella*, Corallinaceae, a homenagem a Paul Silva em águas brasileiras. XV Congresso Brasileiro de Ficologia, Centro de Convenções do Hotel Guanabara, São Lourenço, 14 a 17 de Setembro.

Este capítulo será apresentado como o artigo publicado, que segue.

RESUMO EM PORTUGUÊS

Confirmação do posicionamento sistemático de *Paulsilvella* em Lithophylloideae (Corallinaceae, Rhodophyta) através de dados moleculares

Beatriz N. Torrano-Silva, Rafael Riosmena-Rodríguez & Mariana C. Oliveira

Resumo

Novos espécimes de *Paulsilvella huveorum* foram coletados no Brasil na Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, e em São Sebastião Gomes, Bahia. Esta nova coleção representa um importante incremento no que é conhecido para a distribuição geográfica e quanto aos hospedeiros deste grupo (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania cubensis*, Bryozoa e Hydrozoa não identificados), além de possibilitar a amplificação do DNA de *Paulsilvella* pela primeira vez. O posicionamento de *Paulsilvella* na subfamília Lithophylloideae é desta forma confirmado baseando-se nos marcadores SSU rDNA, *psbA* e *rbcl*. Os espécimes têm características morfológicas e anatômicas similares às da descrição original de *Paulsilvella*, caracterizada por uma porção basal incrustante e dímera de onde partem ramos eretos monoméricos. Apesar disto, a posição dos conceptáculos carposporangiais nos talos, que varia de rasa a saliente, indica que esta característica é variável em uma mesma espécie, o que sugere que *P. huveorum* e a espécie fóssil *P. antiqua* devem ser consideradas sinônimos. Contudo, não propomos esta alteração até que sejam incluídas na análise coleções de outras porções do globo. Nossos resultados enfatizam o fato de que urgem revisões para a delimitação dos gêneros em Lithophylloideae, baseando-se na análise mútua de dados moleculares e morfológicos, aliado ao fato de que a organização dímera do talo evoluiu diversas vezes no grupo.

Palavras chave: Brasil, morfologia, *Paulsilella*, *Amphiroa*, *psbA*, *rbcl* e SSU rDNA.

Systematic position of *Paulsilvella* in the Lithophylloideae (Corallinaceae, Rhodophyta) confirmed by molecular data

BEATRIZ N. TORRANO-SILVA^{1*}, RAFAEL RIOSMENA-RODRIGUEZ² & MARIANA C. OLIVEIRA¹

¹Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Rua do Matão, 277, Cidade Universitária, 05508-090 - São Paulo, SP - Brazil

²Programa de Investigación en Botánica Marina, Departamento de Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Apartado postal 19–B, 23080 La Paz, BCS, Mexico.

*Corresponding author. Phone: (5511) 3091-7630. Fax: (5511) 3091-7547. E-mail: biatorrano@gmail.com

Abstract

New specimens of *Paulsilvella huveorum* were collected in Brazil at Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, and Sebastião Gomes reef, Bahia. This new collections represent a relevant range extension and new hosts for the species (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania cubensis* and non-identified Hydrozoa and Bryozoa) and enabled the first DNA amplifications for *Paulsilvella*. The systematic position of *Paulsilvella* in the subfamily Lithophylloideae is confirmed based on SSU rDNA, *psbA* and *rbcL* molecular markers. Morphologically and anatomically the specimens are similar to the original description in where basal dimerous thalli with monomeric erect branches characterize the genus. But, the analyzed carposporangial conceptacles express the roof position varying from flush or above the thallus surface, the chambers always buried within tiers of columnar cells, suggesting that this feature is variable within the species and might also suggest that *P. huveorum* and the fossil *P. antiqua* should be considered as potential synonyms. We do not want to suggest this clump waiting for more collections from different geographical areas in where new data may support our idea. Our results strongly suggest that the subfamily Lithophylloideae urgently needs to be reviewed to delimit genera based on molecular and morphological analysis because monomeric and dimeric thalli organization have evolved several times in the group.

Key words: Brazil, morphology, *Paulsilvella*, *Amphiroa*, *psbA*, *rbcL*, and SSU rDNA

Introduction

The Lithophylloideae Setchell (1943: 134) current concept follows Cabioch 1972 and 1988, emended by Bailey 1999, in which secondary pit connections occur between neighbor cells, but fusions are not found – with the exception of two *Lithophyllum* Philippi (1837: 387) species with fused cells by Suneson 1943. This group includes six genera or genera complexes: *Amphiroa* J.V. Lamouroux (1812a: 185), *Ezo* Adey, Masaki & Akioka (1974: 331), *Lithophyllum/Titanoderma* Nägeli in Nägeli & Cramer (1858: 532), *Lithothrix* J.E. Gray (1867: 33), *Paulsilvella* Woelkerling, Sartoni & Boddi (2002: 359) and *Tenarea* Bory de Saint-Vincent, 1832: 207, in which *Amphiroa* and *Lithothrix* are geniculated, *Lithophyllum/Titanoderma* and *Tenarea* are completely crustose and *Paulsilvella* has a very unusual morphology among all other coralline algae: an encrusting inconspicuous base associated with erect branches presenting a monomeric form of growth (Woelkerling *et al.* 2002).

Paulsilvella was described as a new genus based on vegetative and reproductive anatomical data (Woelkerling *et al.* 2002). As a result of that work, *Paulsilvella* was positioned in the subfamily Lithophylloideae since there are undoubted secondary pit connections and cell fusions are absent. Moreover, one living species *Paulsilvella huveorum* Woelkerling, Sartoni & Boddi (2002: 359), was described and one fossil species *Paulsilvella antiqua* Woelkerling, Sartoni & Boddi (2002: 367) (from late Pleistocene, i.e., 126,000 to 11,500 years ago) was transferred to the genus. Living and fossil species were differentiated in possessing carposporangial and tetrasporangial conceptacles and roofs respectively flush or protruding, the former presenting the chambers buried within tiers of columnar cells. The modern species occurs as an epiphyte on the geniculate corallines *Amphiroa*, *Cheilosporum* (Decne.) Zanardini (1844: 187) and *Jania* J.V. Lamouroux (1812a: 186). *Amphiroa fragilissima* (Linn.) J.V. Lamouroux (1816: 298) was the commonest host (Woelkerling *et al.* op. cit.).

Species of *Paulsilvella* presented morphological features that positioned the new genus within Lithophylloideae in Corallinales P.C. Silva & H.W. Johansen (1986: 250), but modern systematic approaches should encompass both morphological and molecular approaches (Saunders 2008). The Lithophylloideae have long been proved monophyletic by molecular investigation (Bailey & Chapman 1996; Bailey & Chapman 1998; Vidal *et al.* 2003; Harvey *et al.* 2003; Broom *et al.* 2008; Bittner *et al.* 2011). The first phylogenetic studies on Corallinales which have included sufficient samples of Lithophylloideae to infer the internal relationships among genera were done by Bailey & Chapman (1998), which have shown that the geniculated taxa (*Amphiroa* and *Lithothrix*) formed a monophyletic group and *Lithophyllum* was basal to that clade. A subsequent approach by Bailey 1999 included one *Titanoderma* sequence, which surprisingly grouped with *Amphiroa* rather than with *Lithophyllum* specimens; and *Lithophyllum* was more closely related to *Lithothrix* samples than it was to *Titanoderma*. This has changed the hypothesis about the genicula emergence on the Lithophylloideae, suggesting that this morphological feature arose twice, supported by ontogenetical differences on *Amphiroa* and *Lithothrix* genicular cells. Two relevant inferences were made at 2003 by Harvey *et al.* and by Vidal *et al.*, in which *Amphiroa*, *Titanoderma* (and now also *Lithothrix*) kept on grouping together, prior to a separate *Lithophyllum* sister branch. Although complementary sequences on these datasets varied, the Lithophylloideae was always positioned as a sister clade to *Metagoniolithon* Weber-van Bosse, (1904: 86, 101), from the Metagoniolithoideae H.W. Johansen (1969: 47) subgroup, in Corallinaceae J.V. Lamouroux (1812b: 185). Bittner *et al.* (2011) have added many more samples to the matrix, resulting on the Lithophylloideae closer connexion to different groups from the “Mastophoroideae” Setchell (1943: 134)—the Mastophoroideae subgroup has shown to be non-monophyletic (Kato *et al.* 2011), but, since this group will be sparingly referred to in this work, and aiming to facilitate discussing, we will use the old acronym. In conclusion, all referred papers have shown Lithophylloideae monophyletic, but its relation to the Metagoniolithoideae and “Mastophoroideae” subgroups is unstable, varying according to: the number and molecular variability of samples included, as well as to the molecular markers used. At the present research we focused on the positioning of *Paulsilvella* in the Lithophylloideae. Therefore, the relationships among the subfamilies of the Corallinaceae are not prioritized.

Recent collections of *Paulsilvella* have been made at Baía de Ilha Grande (Rio de Janeiro) and Sebastião Gomes reef (Bahia), Brazil. This led us the opportunity to evaluate the systematic position of the genus using three molecular markers, including its position in the Lithophylloideae and inferring its evolutionary relation to other genera, and also to review the morphological and anatomical features of the collected material to add information to the species level.

Materials and methods

Collection

Samples from Ilha Grande island (Fig. 1) were obtained at 5–7 m depth by SCUBA diving. Algae turfs were preserved at a 70% ethanol solution to allow both DNA preservation and individuals subsampling. Samples from Sebastião Gomes reef (Fig. 1) were collected on tide pools from reef plateau area (0–0.5 m depth) at low tide, and preserved in 4% formalin in seawater. Representatives were deposited at the Phycological Herbarium of University of São Paulo (SPF; *Index Herbariorum* <http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>).

Morphological approach

Morphological identification of articulated coralline species follows Moura & Guimarães (2005) and *Paulsilvella* individuals follow Woelkerling *et al.* (2002). Anatomical concepts follow Harvey *et al.* (2005) and growth forms follow Woelkerling *et al.* (1993). Metacrilatoglicol (Leica®) resin embedded sample fragments were cut to 5–7 µm sections (Moura *et al.* 1997). For morphological final excerpt, each variable was measured 10 times.

Molecular procedures

We have elected a group of molecular markers to infer positioning of *Paulsilvella* in the Lithophylloideae based on previous published evidences on molecular relationships on the Corallinaceae. The *psbA* is the preferred marker used by Bittner *et al.* 2011, being also short and informative, in agreement with Broom *et al.* 2008; the SSU rDNA has a long history of usage on phylogeny inferences including the Corallinophycidae L. Le Gall & G.W.

Saunders (2007: 1129), therefore *Paulsilvella* SSU rDNA sequences will be very relevant to help on future complete datasets on Lithophylloideae; *rbcL* has traditionally been used for phylogeny inferences in Florideophyceae (Freshwater *et al.* 1994; 1999; Yoon *et al.* 2006; Le Gall & Saunders, 2010), but has never been tried on an exclusively Corallinophycidae investigation except with the Corallinoideae (Gabrielson *et al.* 2011; Martone *et al.* 2012). The host species *Jania rubens*, *Amphiroa* sp. and *A. fragilissima* were also sequenced to rule out possible cross contaminations with *P. huveorum*. The Universal Plastid Amplicon (UPA), a short and easy to obtain marker, was also sequenced as it has been proposed as universal DNA barcode for photosynthetic organisms (Presting 2006).

FIGURE 1. Sampling stations for *Paulsilvella* and its hosts in Brazil. Crossed white circles indicate collecting spots. Sebastião Gomes is a biogenic reef which is totally submerged during high tidal levels, while Ilha Grande is an island with subtidal rocky shores.

DNA extraction used a Chelex protocol (Goff & Moon 1993) and PCR was applied to obtain plastid (*psbA*, *rbcL* and UPA) and nuclear (SSU rDNA) markers. Primers were combined such as follows: for *psbA*, amplification used *psbAF1* × *psbAR2*, while sequencing used these and also 500F (Yoon *et al.* 2002) and the newly designed 550R (TTRTGTTTCRGCTGRAATAC); for *rbcL*, amplification used F57 × 897cR (CGTGAATATGTWGARTTACCDGC), 577F or 753F × *rbcS*-start and sequencing used these and 1150aR (Freshwater & Rueness 1994); for SSU rDNA, amplification used 18S5' × 1055R and 1055F × 18S3' and sequencing used these and also 530F and 536R (Milstein & Oliveira 2005); for UPA both amplifying and sequencing used p23SrV f1 × p23SrV r1 (Presting 2006). PCR cycles follow Saunders & Moore (2013; *psbA* and *rbcL*), Presting (2006, UPA) and Milstein & Oliveira (2005; SSU rDNA). PCR fragments were purified using illustra™ GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) following the manufacturer's recommendations for direct sequencing. Sequencing reactions were performed with BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and samples were loaded in an ABI 3730 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Consensus sequences were built by hand using BioEdit (Hall 1999), and chromatograms were checked to confirm the validity of ambiguous nucleotides. Datasets used for phylogeny inferences are: one with *psbA* and SSU rDNA combined, and another with *rbcL*. Additional individual analyses for *psbA* and SSU rDNA were also performed (see supplementary information). Matrices were aligned using Clustal W in BioEdit. Ambiguous regions on the nSSU matrices were removed to avoid inappropriate inferred relationships. Additional sequences were obtained in GenBank (Benson *et al.* 2013) to enrich the analysis. These sequences from GenBank were chosen concerning to the closest subfamilies to the Lithophylloideae (based on previous molecular data, *op. cit.*) and the groups where *Paulsilvella*'s hosts belong. For the *psbA* and SSU rDNA combined analysis we have selected only sequences which have used the same samples to amplify both molecular markers from the

Lithophylloideae, Corallinoideae, Mastophoroideae (including representatives from all subdivisions, as indicated in Kato *et al.* 2011) and Metagoniolithoideae subfamilies (Table 1). *RbcL* is represented by a much more limited number Corallinophycidae sequences available in GenBank, so that this dataset have failed to contain any Metagoniolithoideae or “Mastophoroideae” representatives (Table 2). Outgroups were *Mesophyllum engelhartii* (Foslie) W.H. Adey 1970: 23(JQ896243) for *psbA*, *M. engelhartii* (JQ896270) for SSU rDNA and *Mesophyllum vancouveriense* (HQ322337) for *rbcL*.

TABLE 1. List of new (in bold, including SPF herbarium number) and additional sequences for *psbA* and SSU rDNA datasets. Previously published sequences are referenced as follows: Bailey & Chapman 1998⁽¹⁾, Bailey 1999⁽²⁾, Harvey *et al.* 2003⁽³⁾, Vidal *et al.* 2003⁽⁴⁾, Bailey *et al.* 2004⁽⁵⁾, Broom *et al.* 2008⁽⁶⁾, Aguirre *et al.* 2010⁽⁷⁾, Bittner *et al.* 2011⁽⁸⁾, Kato *et al.* 2011⁽⁹⁾ and Hernandez-Kantun⁽¹⁰⁾ submitted.

Taxa	<i>psbA</i>	SSU rDNA
	GenBank accession no.	GenBank accession no.
CORALLINALES		
Corallinaceae		
Corallinoideae		
<i>Arthrocardia</i> sp.	EF628246 ^{6,9,10}	EF628230 ^{6,8,9,10}
<i>Cheilosporum sagittatum</i>	DQ167881 ^{6,9,10}	EF628226 ^{6,8,9,10}
<i>Corallina officinalis</i>	DQ168010 ^{6,9,10}	EF628232 ^{6,8,9,10}
<i>Haliptilon roseum</i>	EF628245 ^{6,9}	EF628229 ^{6,8,9}
<i>Jania</i> sp.	DQ167886 ^{6,9} / DQ167885 ^{6,9,10}	EF628227 ^{6,9,10} / EF628225 ^{6,9,10}
<i>Jania rubens</i> SPF57696 (host)	KM044019	KM044029
Lithophylloideae		
<i>Amphiroa</i> sp. SPF57697 (host)	KM044020	KM044030
<i>Amphiroa fragilissima</i>	GQ917498 ⁸	U60744 ^{1,2,3,4,6,7,8,10}
<i>Amphiroa fragilissima</i> SPF57694 (host)	KM044017	KM044027
<i>Amphiroa rigida</i>	JQ896250 ¹⁰	JQ896277 ¹⁰
<i>Amphiroa</i> sp.	GQ917472 ⁸	GQ917416 ^{8,10}
<i>Amphiroa</i> sp.	GQ917435 ⁸	GQ917380 ^{8,10}
<i>Amphiroa</i> sp.	GQ917491 ⁸	GQ917428 ⁸
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>bamleri</i>	GQ917462 ^{8,10}	GQ917406 ^{8,10}
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>bamleri</i>	GQ917473 ^{8,10}	GQ917417 ^{8,10}
<i>Lithophyllum byssoides</i>	JQ896251 ¹⁰	JQ896278 ¹⁰
<i>Lithophyllum dentatum</i>	JQ896255 ¹⁰	JQ896282 ¹⁰
<i>Lithophyllum dentatum</i>	JQ896237 ¹⁰	JQ896264 ¹⁰
<i>Lithophyllum incrustans</i>	JQ896236 ¹⁰	JQ896263 ¹⁰
<i>Lithophyllum kotschyannum</i>	AB576031 ^{9,10}	AB576011 ^{9,10}
<i>Lithophyllum kotschyannum</i>	AB576030 ^{9,10}	AB576010 ^{9,10}
<i>Lithophyllum kotschyannum</i>	AB576029 ⁹	AB576008 ⁹
<i>Lithophyllum margaritae</i>	Q896235 ¹⁰	JQ896262 ¹⁰
<i>Lithophyllum margaritae</i>	JQ896253 ¹⁰	JQ896280 ¹⁰
<i>Lithophyllum pustulatum</i>	DQ167872 ^{6,10}	EF628240 ^{6,8,10}
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>pygmaeum</i>	GQ917459 ^{8,10}	GQ917403 ^{8,10}
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	DQ167970 ^{6,9,10}	EF628241 ^{6,8,9,10}
<i>Lithophyllum</i> sp.	JQ896239 ¹⁰	JQ896266 ¹⁰
<i>Lithophyllum</i> sp.	GQ917452 ⁸	GQ917397 ⁸

..... continued on the next page

TABLE 1 (continued)

Taxa	<i>psbA</i>	SSU rDNA
	GenBank accession no.	GenBank accession no.
<i>Lithophyllum</i> sp.	GQ917470 ⁸	GQ917413 ⁸
<i>Lithophyllum</i> sp.	GQ917474 ^{8,10}	GQ917418 ^{8,10}
<i>Paulsilvella huveorum</i> SPF57695	KM044018	KM044028
<i>Paulsilvella huveorum</i> SPF57698	KM044021	KM044031
<i>Titanoderma</i> sp.	GQ917477 ^{8,10}	GQ917421 ^{8,10}
Mastophoroideae		
<i>Hydrolithon</i> cf. <i>boergesenii</i>	GQ917447 ^{8,10}	GQ917378 ^{8,10}
<i>Hydrolithon onkodes</i>	GQ917483 ⁸	GQ917373 ⁸
<i>Hydrolithon reinboldii</i>	GQ917485 ^{8,10}	GQ917376 ^{8,10}
<i>Metagoniolithon radiatum</i>	GQ917496 ^{8,10}	GQ917432 ^{8,10}
<i>Metagoniolithon stelliferum</i>	GQ917497 ^{8,10}	GQ917433 ^{8,10}
<i>Pneophyllum conicum</i>	AB576040 ^{9,10}	AB576023 ^{9,10}
<i>Pneophyllum conicum</i>	GQ917471 ^{8,10}	GQ917414 ^{8,10}
<i>Spongites yendoii</i>	DQ16790 ^{6,9}	EF628234 ^{6,8,9}
Hapalidiaceae		
Melobesioideae		
<i>Mesophyllum engelhartii</i>	JQ896243 ¹⁰	JQ896270 ¹⁰

Sequence evolution models were determined in ModelGenerator (Keane *et al.* 2006) for each marker separately under the Akaike Information Criterion. The following parameters were obtained for *psbA*: GTR +I+G with gamma distribution = 1.716, proportion of invariable sites = 0.631, base frequencies A = 0.222, C = 0.222, G = 0.206, T = 0.350 and rate among sites [A-C] = 1.103, [A-G] = 17.562, [A-T] = 6.045, [C-G] = 0.619, [C-T] = 27.952, [G-T] = 1.000; for SSU: GTR +I+G with gamma distribution = 0.556, proportion of invariable sites = 0.617, base frequencies A = 0.253, C = 0.207, G = 0.285, T = 0.256 and rate among sites [A-C] = 0.814, [A-G] = 2.403, [A-T] = 1.586, [C-G] = 0.386, [C-T] = 2.926, [G-T] = 1.0000; and for *rbcL*: GTR +I+G with gamma distribution = 1.9122, proportion of invariable sites = 0.5827, base frequencies A = 0.3277, C = 0.1381, G = 0.2072, T = 0.3270 and rate among sites [A-C] = 3.5389, [A-G] = 9.5372, [A-T] = 5.0634, [C-G] = 2.0067, [C-T] = 37.8126, [G-T] = 1.0000. Neighbor joining (NJ) reconstructions were performed in MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). Maximum likelihood (ML) analyses were inferred with PhyML algorithm (Guindon & Gascuel 2003) in Topali 2.5 (Milne *et al.* 2004). Bootstrap tests were performed for 500 (ML) or 2000 (NJ) replicates.

For the Bayesian analysis(BI), two independent runs of four chains of the Markov Chain Monte Carlo were performed using MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001); one tree was sampled every 100 generations for 4,000,000 generations starting with a random tree. The first 400,000 generations were discarded as burnin after visually checking of the plateau in excel dispersion graphic and a 50% consensus tree was computed with the remaining data.

The *psbA* + SSU rDNA combined analysis was performed after inference on the best evolution model for each marker separately with MrModeltest 2.2.(Nylander 2004) and checking their mutual inconsistency using the Incongruence-Length Difference Test (ILD) on PAUP. Since both sequences requested the same evolution model (GTR+G+I; nst=6; rates=gamma) and the ILD pointed favorable to combining the data (P value = 0.02), we have followed on analyzing this final matrix without the need of prior partitioning and independent optimized parameters.

TABLE 2. List of new (in bold, including SPF herbarium number) and sequences obtained from GenBank included in *rbcL* dataset. Previously published sequences are referenced as follows: Gavio *et al.* 2005⁽¹⁾, Gabrielson *et al.* 2011⁽²⁾, Martone *et al.* 2012⁽³⁾, Freshwater *et al.* 2013⁽⁴⁾, Scott *et al.* 2013⁽⁵⁾.

Taxa	<i>rbcL</i>
	GenBank accession no.
CORALLINALES	
Corallinaceae	
Corallinoideae	
<i>Alatocladia yessoensis</i>	HQ322277 ⁽²⁾
<i>Arthrocardia corymbosa</i>	JN701475 ⁽³⁾
<i>Bossiella orbigniana</i>	HQ322279 ⁽²⁾
<i>Calliarthron cheilosporioides</i>	HQ322284 ⁽²⁾
<i>Calliarthron tuberosum</i>	HQ322316 ⁽²⁾
<i>Chiharaea bodegensis</i>	HQ322332 ⁽²⁾
<i>Chiharaea silvae</i>	JN701473 ⁽³⁾
<i>Corallina officinalis</i>	KC134323 ⁽⁵⁾
<i>Corallina pilulifera</i>	DQ787558
<i>Corallina pinnatifolia</i>	HQ322333 ⁽²⁾
<i>Corallina vancouveriensis</i>	HQ322334 ⁽²⁾
<i>Jania natalensis</i>	EU349111
<i>Jania rubens</i> SPF57696 (host)	KMO44024
<i>Jania sagittata</i>	KC134331 ⁽⁵⁾
<i>Serraticardia macmillanii</i>	HQ322338 ⁽²⁾
<i>Yamadaea melobesioides</i>	JN701477 ⁽³⁾
Lithophylloideae	
<i>Amphiroa</i> sp SPF57697 (host)	KM044025
<i>Amphiroa fragilissima</i>	U04039 ⁽⁴⁾
<i>Amphiroa fragilissima</i> SPF57694 (host)	KM044022
<i>Amphiroa zonata</i>	JN701462 ⁽³⁾
<i>Lithophyllum grumosum</i>	JX393106 / JX393121
<i>Lithophyllum impressum</i>	HQ322335 ⁽²⁾ / JX393128
<i>Lithothrix aspergillum</i>	HQ322336 ⁽²⁾
<i>Paulsilvella huveorum</i> SPF57695	KM044023
<i>Paulsilvella huveorum</i> SPF57698	KM044026
<i>Pseudolithophyllum muricatum</i>	AY294373 ⁽¹⁾
Hapalidiaceae	
Melobesioideae	
<i>Clathromorphum reclinatum</i>	KC134324 ⁽⁵⁾
<i>Mastophoropsis canaliculata</i>	KC134335 ⁽⁵⁾
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	KC134326 ⁽⁵⁾ / HQ322337 ⁽²⁾
<i>Synarthrophyton patena</i>	KC134328 ⁽⁵⁾

Results

Molecular analysis

Sequences were obtained for two specimens of *Paulsilvella huveorum* for each plastid marker (*psbA*, *rbcL*, and

UPA); for nuclear SSU rDNA one full sequence and a partial one were obtained; identity among the two samples were 100% for UPA, *psbA* and SSU rDNA (for the overlapping region) and 99% for *rbcL* (1 divergent nucleotide). Sequences for each marker were also obtained for the host species *Jania rubens* (Linn.) J.V. Lamouroux (1816: 272), *Amphiroa* sp. and *A. fragilissima*. The combined *psbA*+SSU matrix included 43 sequences with 2,028 nucleotides (Fig. 2), while the *rbcL* dataset used 34 sequences, 1,273 nucleotides (Fig. 3).

FIGURE 2. Molecular positioning of *Pausilvella* on the Lithophylloideae based on a combined *psbA* and SSU rDNA dataset. In the Bayesian inferred filogram posterior probabilities (when > 95 %) are shown as thicker branches. Bootstrap supports for NJ/ML (2,000/500 replicates) are shown at the nodes when higher than 70. Asterisks indicate 100 % bootstrap support for both NJ and ML. Sequences generated in this work are in bold; *Pausilvella* hosts included on this analysis are indicated by an arrow.

FIGURE 3. Molecular positioning of *Pausilvella* on the Lithophylloideae using *rbcL*. In the Bayesian inferred filogram posterior probabilities (when > 95 %) are shown as thicker branches. Bootstrap supports for NJ/ML (2,000/500 replicates) are shown at the nodes when higher than 70. Asterisks indicate 100 % bootstrap support for both NJ and ML. Sequences generated in this work are in bold; *Pausilvella* hosts included on this analysis are indicated by an arrow.

No phylogeny was performed for UPA, due to the low number of identified Corallinales sequences in the data banks; nonetheless, *P. huveorum* UPA sequences (KM044013 and KM044016) are consistent with the results obtained for the other markers, since these differ from host sequences (KM044012, KM044014 and KM044015) and are most similar to other Lithophylloideae from Genbank using Blast tool (Altschul *et al.* 1990).

The Lithophylloideae, including *P. huveorum*, formed a monophyletic grouping with high support on all analyses performed (NJ/ML/BI as follows: 100/100/100 for *psbA*+SSU, Fig. 2, and 100/100/100 for *rbcL*, Fig. 3).

The use of the combined *psbA*+SSU dataset (Fig. 2) increased resolution at basal nodes, when compared to analyzing *psbA* and SSU rDNA separately (data not shown). In these combined analyses *P. huveorum* is nested within the Lithophylloideae, but its grouping to a specific internal branch is poorly supported. For the *rbcL* analyses (Fig. 3) *P. huveorum* is positioned at the base of the available Lithophylloideae sequences, but this placement is probably an artifact due to the small number of *rbcL* sequences available. *Amphiroa* species formed a monophyletic clade with high support in all analysis (NJ/ML/BI as follows: 88/100/100 for *psbA*+SSU and 96/96/100 for *rbcL*). The genus *Lithophyllum* is paraphyletic in all phylogenies. As there are few samples in the databases for which sequences were obtained for both *psbA*+SSU markers, individual analyses for those markers were produced using a higher number of available sequences from Genbank, which are presented as a supplementary material 1 and 2. In these datasets more representatives for the Lithophylloideae and for the “Mastophoroideae” were included, and also representatives for the Hapalidiaceae, Sporolithales and Rhodogorgonales in order to eliminate the possibility of biased relationships driven by the absence of representatives of more distantly related clades on the analysis. Details are shown on supplementary material section, but it is relevant to mention that: i. *P. huveorum* remains nested within the Lithophylloideae; ii. despite including more sequences, the basal relationships get little support and inner relationships of the Lithophylloideae are not resolved.

The host species *Jania rubens*, *Amphiroa* sp. and *A. fragilissima*, in both phylogenetic analyses indicate their close relation to other species in their respective genera—emphasizing the lack of cross contamination with the epiphyte *P. huveorum* during sequences production. For *A. fragilissima* there were available Genbank sequences for *rbcL* and SSU rDNA, the former from Key Largo, Florida, USA—close to the type location, in Jamaica; this would be the first molecular evidence confirming the morphological identification of this taxon for the Brazilian coast.

Morphological analysis

Paulsilvella huveorum Woelkerling, Sartoni & Boddi 2002: 358 (Figs. 4–20; Table 3)

Holotype:—F.T. Sartoni 11/010a (Woelkerling, Sartoni & Boddi 2002: 362). Notes: The holotype preparation includes male, female, carposporangial and tetrasporangial individuals. Isotype LTB 18056.

Type locality:—Gandersha, Somalia (Woelkerling, Sartoni & Boddi 2002: 362). Holotype: G. Sartoni; 27 January 1982; on *A. fragilissima* growing on the inshore side of the reef.

Description:—Plants nongeniculate, entirely attached ventrally to living substrate by cell adhesion; discrete encrusting base allied to monomeric non-articulated branches (Fig. 4). Encrusting portions, 21(33)56 mm across; protuberances ascending and becoming dichotomous branched. Branches cylindrical, up to 5 mm long and 0.5 mm in diameter, simple or irregularly branched. Plants pseudoparenchymatous; internal organization dimerous in crustose portions (Fig. 5) and monomerous/radial in protuberances. Crustose portions mostly consisting of one palisade cell layer followed by one compressed epithelial layer. Branches arise where a second palisade layer emerges and elongates to the columnar portion of the first monomeric segment, which will also bring forward two layers of smaller cells. The second layer of smaller cells gives rise to the next monomeric segment. Basal palisade cells 16(17)20 µm length and 9(11)13 µm diameter; columnar cells 110(231)310 µm long, 7(10)13 µm diameter proximally and 22(29)51 µm diameter distally; first tier of shorter cells 20(27)35 µm length and 15(27)35 µm diameter; second tier of shorter cells 10(15)21 µm length and 10(12)15 µm diameter. Cells of adjacent filaments linked by secondary pit-connections (Fig. 6), what is more evident on the palisade basal layer or among cells from the first and second smaller layers on protuberant branches.

Tetrasporangial conceptacles (Figs. 7–9) uniporate, flush and confined to a branch sector; conceptacle roofs 3(4) cells thick; pore canals surrounded by elongated block cells. Conceptacle chambers 83(144)201 µm diameter and 169(199)230 µm tall, usually without a central columella; tetrasporangia initials originated from cells from the second tier of shorter cells from the previous monomerous sector; each mature sporangium presents 71(93)109 µm long and 20(35)49 µm in diameter, containing four zonately arranged tetraspores.

FIGURES 4-9. *Paulsilvella*'s vegetative and tetrasporophytic details. **4.** Erect axis growing on *Amphiroa fragilissima*. **5.** Detail on basal cell arrangement, on which is evident a dimerous growing pattern. **6.** Secondary pit connections are particularly evident on the first and second tiers of shorter cells (arrows). **7.** General habit of two tetrasporophytic thalli. **8.** Tetrasporangial conceptacle; block cells line the pore of canal. **9.** Tetrasporangial conceptacle; detail on a mature tetrasporangium and formation of block cells which would line the pore canal at final stages of development.

FIGURES 10–16. *Paulsilvella*'s carposporophytic and male reproductive details. **10.** General habit of a reproductive carposporophytic thalli. Observe both protruding (below) and flushed (above) positioning of conceptacles. **11.** Carposporangial conceptacles on the two final sectors of a thalli. **12.** General habit of a reproductive male thalli. Observe the protruding positioning of conceptacle. **13.** Mature carposporangial conceptacle on the moment of mucilage liberation. **14.** Male conceptacle with spout and Initial stage of mucilage liberation. Observe the simple arrangement of spermatia. **15.** Mature male conceptacle with moving mucilage on spout canal. **16.** Male conceptacle with final spout and initial degeneration of chamber and spermatia.

Gametangial plants dioecious. Mature carposporangial conceptacles (Figs. 10, 11 and 13) flush to a branch sector or protruding from it; conceptacle roofs 3(4) cells thick. Conceptacle chambers 134(161)190 μm in diameter and 137(194)234 μm tall; supporting cells of carpogonial branches originate from cells from the second tier of shorter cells from the previous monomerous sector; carposporophytes developing within female conceptacles after presumed karyogamy, each comprising a central more or less flattened fusion cell and several celled gonimoblast filaments arising from the whole surface of the fusion cell and bearing terminal carposporangia; carposporangia liberation is presumed by mucilage extravasation (Fig. 13).

Male conceptacles (Figs. 12 and 14–16) always protruding from branches surface; conceptacle chambers 130(168)206 μm in diameter and 52(61)73 μm tall, disposing simple spermatangia which spread all over the floor; spermatangia liberation seem to involve mucilage extravasation (Figs. 14–16) and to be guided by a spout.

FIGURES 17–20. *Paulsilvella*'s observed habit details viewed on stereomicroscope. **17.** Growing on *Amphiroa fragilissima*. **18.** Growing on *Amphiroa beauvoisii* arrows indicate protruding conceptacles; **19.** Growing on *Jania rubens*. **20.** Growing on a bryozoan.

Ecological observations:—In the original description the host plants were collected from tide pools, lower intertidal and upper subtidal levels. In our study collections were obtained both at tidal pools at reef plateau (at

Sebastião Gomes reef) and attached to subtidal rocks at 5–7 m depth (at Ilha Grande). It is also important to stress that *Paulsilvella* has shown to thrive on distant latitudinal spots (from tropical, Bahia, to subtropical areas, Rio de Janeiro), which implies a broader ecological range considering light intensity, water movement and temperature.

TABLE 3. Comparative morphological measurements (µm) of *Paulsilvella* species.

		<i>P. huveorum</i> (Western Atlantic) this work	<i>P. huveorum</i> (Western Indic) Woelkerling <i>et al.</i> 2002	<i>P. antiqua</i> (Western Indic) Woelkerling <i>et al.</i> 2002
Encrusting phase				
	palisade cell height	16(17)20	18 to 2 (?)	(no data)
	palisade cell diameter	9(11)13	6 to 13	(no data)
Protuberant branches				
	diameter of branches	303(389)532	165–1450	270–501
	length of branch sectors	212(283)354	112–525	116–331
	columnar cell length	110(231)310	203–318	(33–)136–268
	columnar cell diameter (distal)	22(29)51	15–40	17–35
	columnar cell diameter (proximal)	7(10)13	6–15	8–17
	1 st tier of shorter cells - cell length	20(27)35	12–21	18–45
	1 st tier of shorter cells - cell diameter	15(27)35	9–27	16–31
	2 nd tier of shorter cells - cell length	10(15)21	9–21	15–30
	2 nd tier of shorter cells - cell diameter	10(12)15	7–15	15–17
Conceptacles				
male	conceptacle position	lateral, protruding	lateral, protruding	(no data)
	conceptacle chamber - height	52(61)73	62–124	(no data)
	conceptacle chamber - diameter	130(168)206	165–350	(no data)
	conceptacle roof - number of cells	3(4)	3–4	(no data)
carposporangial	conceptacle position	flush or protruding	flush	protruding? ^{*2}
	conceptacle chamber - height	134(161)190	124–268	245–250
	conceptacle chamber - diameter	137(194)234	185–268	180–185
	conceptacle roof - number of cells	3(4)	3–4	–
tetrasporangial	conceptacle position	flush	flush	protruding? ^{*2}
	conceptacle chamber - height	169(199)230	124–247	(no data)
	conceptacle chamber - diameter	83(144)201	165–247	(no data)
	conceptacle chamber - number of cells	3(4)	3(4) (* ¹)	(no data)
	tetrasporangia length	71(93)109	60–80	(no data)
	tetrasporangia diameter	20(35)49	(no data)	(no data)

*¹ obtained from photo 28 from Woelkerling *et al.* 2002 (p. 368).

*² there is an uncertainty if the only conceptacle found could be tetrasporangial or carposporangial, since it was empty (Woelkerling *et al.* 2002, p. 370)

New hosts are now referred for the genera: *A. beauvoisii*, *Jania cubensis* ex Kützinger (1849: 709) and non-identified hydrozoa and bryozoans. Apart from that, the previously registered host *A. fragilissima* was observed as the most common substrate.

Geographical distribution:—This is the first time *Paulsilvella* is registered out of East Africa and registered on a subtropical area (for Ilha Grande Island; Fig. 1).

Examined material:—**BRAZIL**, Bahia: Sebastião Gomes reef (morphological approach). SPF 567001, *A. beauvoisii* J.V. Lamouroux (1816: 299) turf (*J. cubensis* also present), 17°54'38,88"S 39°06'44,28"W; SPF 567003,

25 January 2008, B.N. Torrano-Silva & E.C. Oliveira; *A. beauvoisii* turf, 17°54'38,88"S 39°06'44,28"W, 25 January 2008, B.N. Torrano-Silva & E.C. Oliveira; SPF 56997, *A. fragilissima* turf, 17°55'22,62"S 39°07'54,48"W, 17 October 2008, B.N. Torrano-Silva & C.E. Amancio; SPF 56998, *A. fragilissima* turf, 17°54'38,88"S 39°06'44,28"W, 15 October 2008, B.N. Torrano-Silva & C.E. Amancio.

BRAZIL, Rio de Janeiro: Ilha Grande Island (both morphological and molecular approach). SPF 57694, *A. fragilissima* turf, 23°06'54.8" S 044°17'36.0" W, 8 September 2013, B.N. Torrano-Silva & F. Nauer; SPF 57695, *P. huveorum* on various hosts, 23°06'54.8" S 044°17'36.0" W, 8 September 2013, B.N. Torrano-Silva & F. Nauer; SPF 57696, *J. rubens*, 23°06'54.8" S 044°17'36.0" W, 8 September 2013, B.N. Torrano-Silva & F. Nauer; SPF 57697, *Amphiroa* sp. turf, 23°06'54.8" S 044°17'36.0" W, 8 September 2013, B.N. Torrano-Silva & F. Nauer; SPF 57698, *P. huveorum* on various hosts, 23°06'57.3"S 044°16'12.8"W, 8 September 2013, B.N. Torrano-Silva & F. Nauer.

Discussion

The observed morphology and anatomy from Brazilian and Eastern Africa *Paulsilvella* living specimens confirm these are the same morphospecies. In spite of that, some reproductive features contradict the Woelkerling *et al.* (2002) view of species delimitation for this genus. The existence of both flushed and protruding carposporangial conceptacles (even on the same thalli) unify the characteristics which originally separated *P. huveorum* and *P. antiqua* (Woelkerling *et al.* 2002), but we decided not propose the synonym because more data about this genera is need to solve this controversy. Apart from that, there is no certainty if the only conceptacle found for *P. antiqua* was carposporangial or tetrasporangial, as it was empty and the roof features are similar in both phases (Woelkerling *et al.* 2002, 370: 35).

In the molecular analysis, we have found *Paulsilvella* included either at the base (*rbcL*) or nested (*psbA* + SSU rDNA) within the sequences of other Lithophylloideae representants, confirming its original placing in the subfamily based on the morphological features (Woelkerling *et al.* 2002). Also *Paulsilvella* and *Lithothrix* were not monophyletic (supplementary material 1 and 2), confirming the transfer of the fossil species *P. antiqua* from the genus *Lithothrix* (Woelkerling *et al.* 2002) to *Paulsilvella*. The basal placing of *Paulsilvella*, in the *rbcL* phylogeny (or a polytomy if we consider only the Bootstrap supported branches) is probably a consequence of the limited set of species included in the *rbcL* analysis.

A closer relationship between *Titanoderma* and *Amphiroa* based on *psbA* + SSU rDNA sequences is once more shown, following the SSU rDNA inferences from Bailey (1999), Broom *et al.* (2008) and Bittner *et al.* (2011). Unfortunately there were no available *psbA* and SSU rDNA sequences from the same specimen of *Lithothrix*, but this genera closer relationship to crustose genera (rather than to *Amphiroa*) is shown on *psbA* and SSU more replete analyses (supplementary materials 1 and 2). At the same time, *Lithothrix* closer relation to *Lithophyllum* samples at the *rbcL* dataset (prior to *Amphiroa* clade) could be artificial, once there were no available *rbcL* sequences for *Titanoderma*. For the encrusting genus *Titanoderma*, there are only SSU rDNA sequences available and the three species analysed are more closely related to articulated genera, *Amphiroa* and *Lithothrix*, rather than to other encrusting forms of *Lithophyllum* (Fig. 2), also according to previous published data (op. cit.).

The addition of *P. huveorum* sequences to the present molecular inferences also didn't resolve the positioning of *Lithophyllum* within the Lithophylloideae, which is already being suggested as a non-monophyletic genus (Hernandez-Kantun *et al.* submitted). The present phylogenetic analyses indicate that the three growing forms found within the Lithophylloideae (encrusting, geniculate and monomerous) are not distributed as a continuous pattern. Morphological changes from the believed encrusting ancestor of the Lithophylloideae may have been driven independently, or following an initial shift event, which could have then evolved by different pathways to the geniculate and monomerous forms, including reversal steps on *Titanoderma*. These two possible evolutionary pathways are now reworked after their initial proposal by Bailey 1999 but; even after the inclusion of *Paulsilvella*'s molecular data, the geniculate and monomerous forms origins remain a mystery and may be elucidated with future additions on concatenated anatomical and molecular data from *Amphiroa*, *Lithophyllum* and *Titanoderma*, and also the missing genera, *Ezo* and *Tenarea*, to the Lithophylloideae phylogeny inferences.

Unfortunately, until this moment, nothing can be said regarding molecular similarities from Western Africa and Western Atlantic specimens, since this is the first time *Paulsilvella* DNA is isolated and there are no sequences from outside Brazil to compare. Additional collections are needed to verify phyletic distances. The new

geographical record for *Paulsilvella* suggests a relationship between Indo Pacific and Atlantic by the old Tethys Sea. Detecting this species on Brazilian coast also reinforces the hypothesis on the Indo-Pacific origin of the Brazilian marine macroflora composition (Horta *et al.* 2001).

It is important to note that, although *Paulsilvella* is uncommonly seen on field, it does not mean that it is indeed a rare species—or even that it has not been collected many times previously. Their thallus' inconspicuous size for human eyes may have led to the present existence of *P. huveorum* individuals attached to their hosts, which have already been deposited on herbaria. Some of their hosts are worldwide distributed: as an example, *A. fragilissima*, the commonest host, grows on Europe, Western and Eastern Africa, Indian Ocean Islands, South-west and Eastern Asia, Australia, New Zealand, the Pacific Islands, North, Central and South America, including the Caribbean islands (Guiry 2014). Another fact to register is the possibility that *P. huveorum* grows on a much wider range of hosts, including other species of coralline geniculate algae, bryozoans and hydrozoans. As *Paulsilvella* has not been spotted growing on crustose coralline algae until this moment, apparently this epiphyte prefers the turf micro-environment, avoiding washable surfaces. Adding the present data to the previous notes from Woelkerling *et al.* (2002), we can list a variable set of marine environments on which *P. huveorum* was found, including rocky shores, reef barriers, mangroves and seagrass meadows. Following this reasoning, and considering the worldwide distribution of geniculate algae, it is very reasonable to consider that *Paulsilvella* could be soon registered for a wider range of distribution, on condition that careful collections are taken and meticulous turf scavenging (for new and old collections) is worked out.

Acknowledgements

First author was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (process number 2010/19234-3). Other fundings include FAPESP 2013/11833-3 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq 564945-2010-2. Two anonymous reviewers have greatly contributed to improvement of this manuscript. Leandro M. Vieira kindly reviewed the hydrozoan and bryozoans hosts for *P. huveorum*. We also want to thank to Projeto Ecossistemas Costeiros, ECosteiros (<http://www.ecosteiros.eco.br>) for SCUBA gear providing and to Fabio Nauer, Carlos Eduardo Amancio and Eurico Cabral de Oliveira for support during collection.

References

- Adey, W.H. (1970). A revision of the Foslie crustose coralline herbarium. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* 1: 1–46.
- Adey, W.H., Masaki, T. & Akioka, H. (1974). *Ezo epiyessoense*, a new parasitic genus and species of Corallinaceae (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Phycologia* 13: 329–344.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-13-4-329.1>
- 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(4): 519–533.
<http://dx.doi.org/10.1666/09041.1>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Bailey, J.C. 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanoderma pustulatum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* 38(3): 208–216.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-38-3-208.1>
- Bailey, J.C. & Chapman, R.L. (1998). A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *Journal Phycology* 34: 692–705.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340692.x>
- Bailey, J. C. & Chapman, R. L. (1996). Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) determined by 18S rRNA gene sequence analysis. In: Chaudhary, B.R. & Agrawal, S.B. (Eds.) *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, pp. 363–76.
- Bailey, J.C., Gabel, J.E. & Freshwater, D.W. (2004). Nuclear 18S rRNA gene sequence analyses indicate that the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta) is a polyphyletic taxon. *Phycologia* 43: 3–12.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-3.1>

- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Sayers, E.W. (2013) Genbank. *Nucleic Acids Research* 41: D36–42.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bory de Saint-Vincent J.B. (1832). Notice sur les polypiers de la Grèce. *Expédition Scientifique de Morée* (Section des Sciences Physiques) 3(1): 204–209.
- Bittner L., Payri, C.E., Maneveldt, G.W., Couloux, A., Cruaud, C., de Reviers, 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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.019>
- Broom, J.E.S., Hart, D.R., Farr, T.J., Nelson, W.A., Neill, 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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.028>
- Cabioch, J. (1972). Etude sur les Corallinales. II. La morphogénèse; conséquences systématiques et phylogénétiques. *Cahiers de Biologie Marine*, 13: 137–287.
- Cabioch, J. (1988). Morphogenesis and generic concepts in coralline algae - a reappraisal. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 42: 493–509.
- Freshwater, D.W. & Rueness, J. (1994) Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33(3): 187–194.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-33-3-187.1>
- Freshwater, D.W., Fredericq, S., Butler, B.S., Hommersand, M.H., Chase, M.W. (1994). A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7281–7285.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.15.7281>
- Freshwater, D.W., Fredericq, S. & Bailey, J.C. (1999). Characteristics and utility of nuclear-encoded large-subunit ribosomal gene sequences in phylogenetic studies of red algae. *Phycological Research* 47: 33–38
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.1999.00148.x>
- Freshwater, D.W., Fredericq, S., Butler, B.S., Hommersand, M.H. & Chase, M.W. (2013). A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15): 7281–7285.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.15.7281>
- 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(3), 298–316.
<http://dx.doi.org/10.2216/10-42.1>
- Gavio, B., Hickerson, E. & Fredericq, S. (2005) *Platoma chrysomenioides* sp. nov. (Schizymeniaceae), and *Sebdenia integra* sp. nov. (Sebdeniaceae), two New Red Algal Species from the Northwestern Gulf of Mexico, with a Phylogenetic Assessment of the Cryptonemiales Complex (Rhodophyta). *Gulf of Mexico Science* (1): 38–57.
- Goff, L.J. & Moon, D.A. (1993) PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *Journal of Phycology* 29(3): 381–384.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00381.x>
- Gray, J.E. (1867) *Lithothrix*, a new genus of Corallinae. *Journal of Botany, British and Foreign* 5: 33.
- Guindon, S. & Gascuel O. (2006). PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696–704.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2014). AlgaeBase - world-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
<http://www.algaebase.org>; searched on 05 March 2014.
- 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., Broadwater, S.T., Woelkerling, W.J. & Mitrovski, P.J. (2003). *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA Phylogeny and resurrection of the Hapalidaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae, and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988–998.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02158.x>
- Harvey, A.S., Woelkerling, W.J., Farr, T.J., Neill, K.F. & Nelson, W.A. (2005) *Coralline algae of central New Zealand: An identification guide to common 'crustose' species*. NIWA, Wellington, 145 pp.
- Hernandez-Kantun, J.J., Riosmena-Rodríguez, R., Hall-Spencer, J., Peña, V., Maggs, C. & Rindi, F. Under revision. Molecular phylogeny of free-living coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) Submitted.
- Heydrich, F. (1897) Corallinaceae, insbesondere Melobesieae. *Berichte der deutsche botanischen Gesellschaft* 15: 34–70.
- Horta, P.A., Amancio, C.E., Coimbra, C.S. & Oliveira, E.C. (2001) Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea*, 28(3), 243–265.
- Huelsenbeck & Ronquist (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Johansen, H.W. (1969). Morphology and systematics of coralline algae with special reference to *Calliarthron*. *University of California Publications in Botany* 49: 1–98.

- 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(3): 662–672.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00996.x>
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J. & McInerney, J.O. (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* 24: 6–29.
- Kützing, F.T. (1849) *Species algarum*. pp. [i]–vi, [1]–922. Lipsiae [Leipzig]: F.A. Brockhaus.
- Lamouroux, J.V.F. (1812a) Extrait d'un mémoire sur la classification des Polypiers coralligènes non entièrement pierreux. *Nouveaux Bulletin des Sciences* 3: 181–188.
- Lamouroux, J.V.F. (1812b). Sur la classification des Polypiers coralligènes non entièrement pierreux. *Nouveau Bulletin des Sciences par la Société Philomathique de Paris* 3: 181–188.
- Lamouroux, J.V.F. (1816) *Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes*. F. Poisson, Paris, 560 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.11172>
- 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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.012>
- Le Gall, L., Payri, C.E., Bittner, C.E. & Saunders, G.W. (2010) Multigene polygenetic analyses support recognition of the Sporolithales, ord. nov. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(1): 302–305.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.026>
- Martone, P.T., Lindstrom, S.C., Miller, K.A. & Gabrielson, P.W. (2012) *Chiharaea* and *Yamadaia* (Corallinales, Rhodophyta) represent reduced and recently derived articulated coralline morphologies. *Journal of Phycology* 48(4): 859–868.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01190.x>
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D. * McGuire, G. (2004) TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20 (11), 1806–1807
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth155>
- Milstein, D. & Oliveira, M.C. (2005) Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44(2): 212–221.
[http://dx.doi.org/10.2216/0031-8884\(2005\)44\[212:mpobrb\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[212:mpobrb]2.0.co;2)
- Moura, C.W.N., Kraus, J.E., Cordeiro-Marino, M. (1997) Metodologia para obtenção de cortes histológicos com historresina e coloração com azul de toluidina O para algas coralíneas (Rhodophyta, Corallinales). *Hoehnea* 24(2): 17–27.
- Moura, C.W.N. & Guimarães, S.M.P.B. (2005) O gênero *Amphiroa* (Lithophylloideae, Rhodophyta) no litoral do Brasil. *Monografias Ficológicas* 2: 3–65.
- Nägeli, C. (1858) Die Stärkekörner. In: Nägeli, C. & Cramer, C. (eds) *Pflanzenphysiologische Untersuchungen Vol. 2*, Schulthess-Verlag, Zürich, 623 pp.
- Nylander, J.A.A. (2004) *MrModeltest 2.2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Philippi, R.A. (1837) Beweis, dass die Nulliporen Pflanzen sind. *Archiv für Naturgeschichte* 3: 387–393.
- 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.
<http://dx.doi.org/10.1139/b06-117>
- Saunders, G.W. (2008) A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*–*Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86: 773–789.
<http://dx.doi.org/10.1139/b08-001>
- Saunders, G.W. & Moore, T.E. (2013) Refinements for the amplification and sequencing of red algal DNA barcode and RedToL phylogenetic markers: a summary of current primers, profiles and strategies. *Algae* 28(1): 31–43.
<http://dx.doi.org/10.4490/algae.2013.28.1.031>
- Scott, F.J., Saunders, G.W. & Kraft, G.T. (2013) *Entwisleia bella*, gen. et sp. nov., a novel marine ‘batrachospermaceous’ red alga from southeastern Tasmania representing a new family and order in the Nemaliophycidae. *European Journal of Phycology* 48(4): 398–410.
<http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2013.849359>
- Setchell, W.A. (1943). *Mastophora* and the Mastophoreae: genus and subfamily of Corallinales. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 29: 127–135.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.29.5.127>
- Silva, P.C. & Johansen, H.W. (1986). A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). *British Phycological Journal* 21: 245–254.
<http://dx.doi.org/10.1080/00071618600650281>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 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.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00123-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00123-4)
- Weber-van Bosse, A. (1904). Corallinaea verae of the Malay Archipelago. *Siboga-Expeditie Monographie* 61: 78–110.
- Woelkerling, W.J. (1993). Type collections of Corallinales (Rhodophyta) in the Foslé Herbarium (TRH). *Gunneria* 67: 1–289.
- Woelkerling, W.J., Sartoni, G. & Boddi, S. (2002) *Paulsilvella huveorum* gen. et sp. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) from the Holocene of Somalia and Kenya, with a reassessment of *Lithothrix antiqua* from the Late Pleistocene of Mauritius. *Phycologia* 41: 358–373.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-41-4-358.1>
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Bhattacharya, D. (2002) A single origin of the peridinin- and fucoxanthin- containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *Proceedings of National Academy of Sciences United States of America* 99(18): 11724–11729.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.172234799>
- Yoon, H.S., Müller, K.M., Sheath, R.G., Ott, F.D. & Bhattacharya, D. (2006). Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 42: 482–492.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00210.x>
- Zanardini, G. (1844) Rivista critica delle Corallinee (o Polypai calciferi di Lamouroux). *Atti del Reale Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti* 3: 186–188.

Conclusões Gerais

Conforme proposto, os resultados apresentados sob a forma dos **Capítulos 3, 4 e 5** cumpriram com os objetivos propostos desta Tese:

- . Investigamos a diversidade de espécies de Lithophylloideae da costa brasileira, incluindo aspectos modernos da taxonomia no grupo através da combinação dos métodos morfológicos/anatômicos e moleculares.
- . Avaliamos a aplicação de quatro marcadores como *DNA Barcodes* junto às Lithophylloideae brasileiras.
- . Com a inclusão dos dados recém-produzidos, ao *dataset* disponível nos bancos públicos de dados moleculares, discutimos e fizemos novas inferências quanto às relações filogenéticas dentro de Lithophylloideae.

Adicionalmente, devemos pontuar os seguintes avanços quanto ao conhecimento taxonômico, molecular, filogenético e ecológico para os representantes de Lithophylloideae do Brasil.

- É a primeira vez que a diversidade específica de *Amphiroa*, *Lithophyllum*, *Paulsilvella* e *Titanoderma* para o Brasil é investigada de maneira somatória e comparativa, quanto a uma variedade de aspectos que incluíram os morfológicos/anatômicos, ecológicos e moleculares (incluindo a própria avaliação das ferramentas moleculares).
- Encontramos 26 espécies de Lithophylloideae para a costa brasileira, sendo quinze *Amphiroa*, oito *Lithophyllum*, uma *Paulsilvella* e duas *Titanoderma*: *Amphiroa rigida*, *A. vanbosseae*, *Amphiroa* sp. 1, *Amphiroa* sp. 2, *Amphiroa* sp. 3, *Amphiroa* sp. 4, seis espécies para o Complexo *A. fragilissima*, três espécies para o Complexo *A. beauvoisii*, *Lithophyllum atlanticum*, *L. corallinae*, *Lithophyllum* cf. *depressum*, *Lithophyllum* sp. 1, *Lithophyllum* sp. 2, *Lithophyllum* sp. 3, *Lithophyllum* sp. 4, *Lithophyllum* cf. *margaritae*, *Paulsilvella huveorum*, *Titanoderma pustulatum* e *T. prototypum*.
- Desta forma a ferramenta molecular possibilitou, pela primeira vez, a identificação de espécies crípticas dentro desta subfamília, o que levou à proposta de criação do Complexo *A. beauvoisii* (com três espécies) e do Complexo *A. fragilissima* (com seis espécies).
- *Paulsilvella huveorum* é encontrada pela primeira vez no Oceano Atlântico, sendo que também produzimos as primeiras sequências moleculares para o gênero. Novas características anatômicas também foram apresentadas para a espécie.
- Ao mesmo tempo em que descrevemos oito novas espécies para a costa brasileira (quatro de *Amphiroa* e quatro de *Lithophyllum*), apresentamos novos dados quanto à anatomia das espécies previamente descritas.
- Apresentamos um extenso levantamento e uma intensa reavaliação das características morfológicas e anatômicas empregadas para a discriminação de *Amphiroa*, *Lithophyllum*, *Titanoderma* e *Paulsilvella*. É a primeira vez que esta reavaliação tem embasamento molecular e com um conjunto tão amplo de espécies e espécimes, de forma que pudemos avaliar as características que realmente sustentam as espécies – dentro das propostas de *DNA-based species concept* (Tautz *et al.* 2003; Lelliaert *et al.* 2014) e de *Molecular Assisted Alpha Taxonomy* (Saunders 2008; Clarkston & Saunders 2010).
- É a primeira vez que se empregou um esforço na aplicação de características comuns entre os quatro gêneros de Lithophylloideae, considerando as limitações impostas pela particularidade morfoanatômica de cada um destes gêneros.

- Os quatro marcadores testados para a distinção de espécies, UPA, COI-5P, *psbA* e a porção 3' do *rbcl*, são confiáveis para a delimitação de espécies em *Amphiroa*, *Lithophyllum* e *Titanoderma* proporcionando ótimos valores de suporte para as espécies e valores significativos de *barcoding gap*.
- No contexto dos aspectos filogenéticos internos em Lithophylloideae, temos ainda que: *Amphiroa* é monofilético; encontramos indícios de que *Lithophyllum* e *Titanoderma* sejam polifiléticos. Apesar disto, ainda precisamos de um maior esforço na produção de sequências deste grupo, além do uso de análises mais robustas (como a concatenada). Também é novidade a evidência de que existem dois grandes ramos que sustentam a diversidade da subfamília.
- Apresentamos uma nova proposta de distinção de *Titanoderma* (à parte de *Lithophyllum*): mantemos a proposta anterior da necessidade que exista um hipotalo com células em paliçada; esta observação porém, só deve ser interpretada como uma “paliçada natural” caso se desenvolva sobre porções lisas do substrato. Desta forma, casos em que se observa a variação da altura das células do hipotalo devido à rugosidade do substrato devem ser visto como um artifício (“paliçada artificial”), não sendo aceitos como discriminatórios para *Titanoderma*.
- Com este trabalho multiplicamos grandemente o banco de dados para os marcadores UPA, COI-5P, *psbA*, (além de algumas adições para o SSU rDNA), principalmente no que se refere a *Amphiroa*, que contava com poucas contribuições até o momento – e *Paulsilvella*, que não tinha qualquer sequência produzida, conforme comentado.
- A distribuição das espécies de *Amphiroa*, *Lithophyllum* e *Titanoderma* ao longo da costa brasileira possibilitou um incremento à discussão quanto à distribuição das macroalgas marinhas bentônicas, adicionando ao cenário o papel das correntes costeiras e do Giro do Atlântico Sul. Também sugerimos que a zona de transição (entre a Região Tropical e a Região Temperada Quente), outrora apenas para o ES, passe a considerar também o RJ, conforme trabalhos pretéritos.
- Existe uma diferença bastante representativa entre a diversidade de espécies encontradas nas zonas de meso e de infralitoral, sendo que para *Amphiroa* a maior diversidade está no mesolitoral, enquanto que para *Lithophyllum* e *Titanoderma* a maior diversidade se encontra no infralitoral e *Paulsilvella* é restrita ao infralitoral. Encontramos espécies exclusivas de mesolitoral e também espécies exclusivas de áreas que normalmente só são acessíveis através de mergulho equipado (SCUBA). Estes fatos chamam a atenção da necessidade de se incluir diferentes técnicas de coleta nos trabalhos de diversidade em Florideophycideae, do contrário podemos negligenciar uma diversidade inexplorada.
- Os padrões que observamos para a distribuição das espécies no gradiente latitudinal da costa brasileira obedecem, em linhas gerais, ao que foi proposto para a caracterização da distribuição das macroalgas marinhas brasileiras baseando-se nos padrões observados por Horta *et al.* (2001). Adicionalmente, os dados que apresentamos sugerem a relevância de outro fator de influência na distribuição das algas marinhas na costa: o padrão de circulação de águas superficiais ao longo da costa.

REFERÊNCIAS

- Altschul S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* (25): 3389-3402.
- Amado-Filho G.M.; Maneveldt G.; Marins B.V.; Manso R.C.C.; Pacheco M.R. & Guimarães S.M.P.B. 2007. Structure of rhodolith beds from a depth gradient of 4 to 55 meters at the south of Espírito Santo State coast, Brazil. *Cienc. Mar.* 33: 399-410.
- Amado-Filho G.M.; Pereira-Filho G.H.; Bahia R.G.; Abrantes D.P.; Veras P.C. & Matheus Z. 2010a. Occurrence and distribution of rhodolith beds on the Fernando de Noronha Archipelago of Brazil. *Aquat. Bot.* 101: 41-45.
- Amado-Filho G.M.; Maneveldt G.W.; Pereira-Filho G.H.; Manso R.C.C. Bahia R.G.; Barros-Barreto M.B. & Guimarães S.M.P.B. 2010b. Seaweed diversity associated with a Brazilian tropical rhodolith bed. *Cienc. Mar.* 36(4): 371-391.
- Anisimova M. & Gascuel O. 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative, *Syst. Biol.* 55(4): 539-552.
- Athanasiadis A. 1999. The taxonomic status of *Lithophyllum stictaeforme* (Rhodophyta, Corallinales) and its generic position in light of phylogenetic considerations. *Nord. J. Bot.* 19(6): 735-7445.
- Athanasiadis A. 2001. Lectotypification of *Lithophyllum arcticum* (Corallinales, Rhodophyta) and a study of its relationships within the Melobesioideae. *Nord. J. Bot.* (21): 93-112.
- Bailey J.C. 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanoderma pustulatum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* 38 (3): 208-216.
- Bailey, J.C.; Chapman, R.L. 1998. A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *J. Phycologia* 34: 692-705.
- Bah T. 2011. Inkscape: Guide to a Vector Drawing Program. NJ, USA: Prentice Hall Press Upper Saddle River, NJ, USA, 504 p.
- 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.
- Bailey J.C. 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanoderma pustulatum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* 38 (3): 208-216.
- Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996. Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 18S rRNA gene sequence analysis. In: Cytology, Genetics and Molecular Biology of algae (Chaudhary, B.R. & Agrawal, S.B. eds.). Amsterdam, Academic Publishing. Pp. 363-376.
- Bailey J.C. & Chapman R.L. 1998. A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *J. Phycologia* 34: 692-705.
- Bailey J.C.; Gabel J.E. & Freshwater D.W. 2004. Nuclear 18S rRNA gene sequence analyses indicate that the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta) is a polyphyletic taxon. *Phycologia* 43: 3-12.
- Barnes D.K.A. & Miller P. 2005. Drifting plastic and its consequences for sessile organism dispersal in the Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 146(4): 815-825.
- Benso D.A.; Karsch-Mizrachi I.; Lipman D.J.; Ostell J.; Wheeler D.L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue), D34-D38. doi:10.1093/nar/gki063.
- Benson D.A.; Cavanaugh M.; Clark K.; Karsch-Mizrachi I.; Lipman D.J.; Ostell J. & Sayers E.W. 2013. Genbank. *Nucleic Acids Res.* 41: D36-D42. DOI:10.1093/nar/gks1195.
- Berchez F.A.; Tiago C.G.; Rosso S.; Dias G. & Oliveira-Filho E.C. 2009. Structure of a coralline algal bed on southeast Brazil. *Braz. J. Ecol.* 13: 49-57.

Blaxter M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 359: 669–679.

Bittner L.; Payri C.E.; Maneveldt G.W.; Couloux A.; Cruaud C.; de Reviers B. & Le Gall L. 2011. Evolutionary history of the Corallinales (Corallinophycidae, Rhodophyta) inferred from nuclear, plastidial and mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61: 697–713.

Braga J.C.; Vescogni A.; Bosellini F.R. & Aguirre J. 2009. Coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) in western and central Mediterranean Messinian reefs. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 275(1-4): 113–128.

Broom J.E.S.; Hart D.R.; Farr T.J.; Nelson W.A.; Neill 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46: 958–973.

Cabioch J. 1972. Etude sur les Corallinacées. II. La morphogénèse: conséquences systématiques et phylogénétiques. *Cah. Biol. Mar.* 13: 137–288.

Campbell S.J. & Woelkerling W.J. 1990. Are *Titanoderma* and *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta) distinct genera? *Phycologia* 29(1): 114–125.

Carro B.; Lopez L.; Peña V.; Bárbara I. & Barreiro R. 2014. DNA barcoding allows the accurate assessment of European maerl diversity: a Proof-of-Concept study. *Phytotaxa* 190(1): 176–189.

Cassano V. 2009. Taxonomia e filogenia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta), com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

Chamberlain Y.M.; Irvine L.M. & Walker R. 1991. A redescription of *Lithophyllum orbiculatum* (Rhodophyta, Corallinales) in the British Isles and a reassessment of generic delimitation in the Lithophylloideae. *Eur. J. Phycologia* 26(2): 149–167.

Clarke K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18: 117–143.

Clarckston B.E. & Saunders G.W. 2010. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* 88: 119–131.

Clement M.; Posada D. & Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molec. Ecol.* 9: 1657–1659.

Costa I.C.; Horta P.A.; Bergstrom E.R. & Nunes J.M.C. 2014. Taxonomic study of crustose coralline algae off the northeastern Brazilian coast. *Phytotaxa* 190(1): 130–161.

Cunningham C.W. 1997. Can tree incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14(7): 733–740.

De Clerck O.; Gavio B.; Fredericq S.; Barbara I. & Coppejans E. 2005. Systematics of *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence, including the reinstatement of *G. minima* and the description of *G. capensis* sp. nov. *J. Phycologia* 41: 391–410.

Decaisne J. 1842. Essais sur une classification des algues et des polypiers calcifères de Lamouroux. Mémoire sur les corallines ou polypiers calcifères. Annales des Sciences Naturelles, Botanique, serie 2, 18: 96–128.

Derraik J.G.B. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Poll. Bull.* 44: 842–852.

Diaz-Pulido G.; Nash M.C.; Anthony K.R.N.; Bender D.; Opdyke B.N.; Reyes-Nivia C. & Troitzsch U. 2014. Greenhouse conditions induce mineralogical changes and dolomite accumulation in coralline algae on tropical reefs. *Nature Commun.* 5:3310.

Dickie G. 1874. Enumeration of algae collected at Fernando de Noronha. *J. Linnean Soc. (Bot.)* 14: 363–365.

Do-Sung C. 1989. A Taxonomic study of *Amphiroa* (Rhodophyta, Corallinaceae) in Korea. Tese de Mestrado, Department of Botany, Seoul National University, Seoul, Korea.

Elias L.M.C. 2009. Variabilidade interanual da ressurgência de Cabo Frio – RJ. Dissertação de Mestrado. universidade Federal do Rio de Janeiro.

Emiliano P.C.; Veiga E.P.; Vivanco M.J.F. & Menezes F.S. 2010. Critérios de informação de Akaike versus Bayesiano: análise comparativa. Disponível em: <<http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/Paulo%20C%C3%A9sar%20Emiliano.pdf>>. Acesso em 08.IV.2015.

Farr T.; Broom J.; Hart D.; Neill K. & Nelson W. 2009. Common coralline algae of northern New Zealand: an identification guide. NIWA Information Series 70.

Farris J.S.; Kallersjo M.; Kluge A.G. & Bult C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10(3): 15-319.

Faugeron et al. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycologia* 37: 705-716.

Ferreira B.R. 2013. Identificação de *Amphiroa* (Rhodophyta) de Ilhabela-SP. Monografia de Bacharelado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Figueiredo M.A.O. 1997. Colonization and growth of crustose coralline algae in Abrolhos, Brazil. Proceedings of the VIII International Coral Reef Symposium 1: 689-693.

Figueiredo M.A.O. 2000. Recifes de Corais ou Recifes de Algas? *Cienc. Hoje* 28: 74-76.

Figueiredo M.A.O. 2005. Diversity of macrophytes on the Abrolhos Bank, Brazil. In: Dutra G.F. *et al.* (Eds.) A rapid marine biodiversity assessment of the Abrolhos Bank, Bahia, Brazil. Washington (DC, USA): Conservation International. P. 67-74.

Figueiredo M.A.O. & Steneck R.S. 2002. Floristic and ecological studies of crustose coralline algae on Brazil's Abrolhos reefs. Proceedings of the IX International Coral Reef Symposium 1: 493-498.

Figueiredo M.A.O.; Horta P.A.; Pedrini A.G. & Nunes J.M.C. 2008. Benthic marine algae of the coral reefs of Brazil: a literature revision. *Oecol. Bras.* 12: 258-269.

Freshwater W.D. & Rueness J. 1994. Phylogenetic relationship of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species based on *rbcl* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33(3): 187-194.

Freshwater D.W.; Fredericq S. & Hommersand M.H. 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid *rbcl* nucleotide sequences. *J. Phycologia* 31, 616–632.

Freshwater D. W.; Tudor K.; O'Shaughnessy K. & Wysor B. 2010. DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: comparison of COI with *rbcl* and verification of the "barcoding gap." *Cryptogam. Algal.* 31, 435–449.

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(3): 298–316.

Galil & Zenetos 2002. A sea change - exotics in the Eastern Mediterranean sea. In: Leppäkoski *et al.* (Eds.): Invasive aquatic species in Europe. 325-336. Kluwer Academic Publishers.

Garbary D. & Veltkamp C.J. 1980. Observations on *Mesophyllum lichenoides* (Corallinales, Rhodophyta) with the scanning electron microscope. *Phycologia* 19(1): 49-53.

Goff L.J. & Moon D.A. 1993. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycologia* 29(3): 381–384.

Guindon S. & Gascuel O. 2006. PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52(5): 696–704.

Gurgel C.F.D.; Fredericq S. & Norris J.N. 2004. Phylogeography of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): a study of genetic discontinuity in a continuously distributed species based on molecular evidence. *J. Phycologia* 40: 748–758.

- Guerardi D.F.M. & Bosence D.W.J. 2001.** Composition and community structure of the coralline algal reefs from Atol das Rocas, South Atlantic, Brazil. *Coral Reefs* 19: 205-219.
- Guiry, M.D. & Guiry, M.D. 2015.** AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 23 March 2015.
- Hall T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41: 95-98.
- Harvey W.H. 1847.** Corallineae. Nereis Australis. Reeve Brothers. London.
- Harvey W.H. 1849.** Nereis australis, or algae of the southern ocean: being figures and descriptions of marine plants, collected on the shores of the Cape of Good Hope, the extra-tropical Australian colonies, Tasmania, New Zealand, and the Antarctic regions; deposited in the Herbarium of the Dublin University. Part 2. pp. 65-124. Reeve Brothers, London.
- Harvey A.S.; Woelkerling W.J. & Millar A.J.K. 2002.** The Sporolithaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia: taxonomy and 18S rDNA phylogeny. *Phycologia* 41(3): 207-227.
- Harvey A.S.; Broadwater S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski P.J. 2003.** *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA Phylogeny and resurrection of the Hapalidaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae, and Melobesioideae. *J. Phycologia* 39: 988-998.
- Harvey A.S.; Woelkerling W.J.; Farr T.J.; Neill K.F. & Nelson W.A. 2005.** Coralline algae of central New Zealand: An identification guide to common 'crustose' species. NIWA Information Series No. 57.
- Harvey A.S. & Woelkerling W.J. 2007.** A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Cienc. Mar.* 33(4): 411-426.
- Harvey A.S.; Woelkerling Wm.J. & Millar A.J.K. 2009a.** The genus *Lithophyllum* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Rhodophyta) in south-eastern Australia, with the description of *L. riosmenae*, sp. nov. *Australian Systematic Botany* 22: 296-317.
- Harvey A.S.; Woelkerling Wm.J. & Millar A.J.K. 2009b.** The genus *Amphiroa* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Rhodophyta) from the temperate coasts of the Australian continent, including the newly described *A. klochkovana*. *Phycologia* 48(4): 258-290.
- Hebert P.D.N.; Cywinska A.; Ball S.L. & deWaard J.R. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Henriques M.C.M.O.; Villas-Boas A.B.; Riosmena-Rodríguez R. & Figueiredo M.A.O. 2008.** Novos registros para o Brasil de algas calcárias incrustantes (Corallinales, Rhodophyta) provenientes de bancos de profundidade no Estado do Espírito Santo. XII Congresso Brasileiro de Ficologia, Universidade Católica de Brasília, Águas Claras, 07 a 11 de Julho de 2010.
- Henriques M.C.; Riosmena-Rodríguez R.; Coutinho L.M. & Figueiredo M.A.O. 2014.** Lithophylloideae and Mastophoroideae (Corallinales, Rhodophyta) from the Brazilian continental shelf. *Phytotaxa* 190(1): 112-129.
- Hernández-Kantún J.J.; Riosmena-Rodríguez R.; Hall-Spencer J.M.; Peña V.; Maggs C.A. & Rindi F. 2015.** Phylogenetic analysis of rhodolith formation in the Corallinales (Rhodophyta), *European Journal of Phycology* 50(1): 46-61, DOI: 10.1080/09670262.2014.984347.
- Hind K.R. & Saunders G.W. 2013.** A Molecular Phylogenetic Study of the Tribe Corallineae (Corallinales, Rhodophyta) with an Assessment of Genus-Level Taxonomic Features and Descriptions of Novel Genera. *J. Phycologia* 49: 103-114.
- 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.
- 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.S. & Oliveira E.C. 2001.** Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28(3): 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 a conservação. *Oecol. Bras.* 12(2): 243-257.
- Horta P.A.; Scherner F.; Bouzon Z.L.; Riosmena-Rodrigues R. & Oliveira E.C. 2011.** Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine (Corallinales, Rhodophyta) from Southern Brazil. *Rev. Brasil. Bot.*, 34(1): 125-134.
- Howe M.A. 1928.** Notes on some marine algae from Brazil and Barbados. *Journal of Washington Academy of Science* 18 (7): 186-91.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Hughey J.R., Silva P.C. & Hommersand M.H. 2001.** Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinales (Rhodophyta) using DNA from type material. *J. Phycologia* 37: 1091-1109.
- Hughey J.R. & Hommersand M.H. 2008.** Morphological and molecular systematic study of *Chondracanthus* (Gigartinales, Rhodophyta) from Pacific North America. *Phycologia*: 47(2): 124-155.
- IMPACT** (Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Working Group on Impacts on the Marine Environment) **1998.** Marine habitat reviews presented by the United Kingdom. English Nature, Peterborough.
- Iha C. 2014.** Diversidade de Gelidiales (Rhodophyta) baseada em marcadores moleculares e estudos morfoanatômicos para região Sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.
- Irvine L.M. & Chamberlain Y.M. 1994.** Seaweeds of the British Isles, Vol. 1 - Rhodophyta Part 2B: Corallinales, Hildenbrandiales. HMSO, London. 288 p.
- Johansen H.W. 1969.** Morphology and systematics of coralline algae with special reference to *Calliarthron*. *U. Calif. Publ. Bot.* 49: 1-98.
- Joly A.B. 1957.** Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. *Bol. Fac. Fil. Ciênc. e Letr. Univ. S. Paulo (Botânica)* 217: 1-199.
- Kato A.; Baba M.; & Suda S. 2011.** Revision of the Mastophoroideae (Corallinales, Rhodophyta) and polyphyly in nongeniculate species widely distributed on Pacific coral reefs. *J. Phycologia* 47(3): 662–672.
- Lamouroux J.V.F. 1816.** Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes. pp. [i]-lxxxiv + 1-560. Caen: De l'imprimerie de F. Poisson.
- 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. *Mol. Phyl. and Evol.* 43: 1118-1130.
- Lemoine M. 1929.** Les Corallinacées de l'Archipel des Galapagos et du Golfe de Panama. *Archives du Muséum National d'Histoire Naturelle sér. 6, 4*: 37-88.
- Le Gall, L. & Saunders G.W. 2010.** DNA Barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J. Phycologia* 46: 374–389.
- Leliaert F.; Verbruggen H.; Vanormelingen P.; Steen F.; LópezBautista J.M.; Zuccarello G.C. & De Clerck O. 2014.** DNA-based species delimitation in algae. *Eur. J. Phycologia* 49(2): 179-196, DOI: 10.1080/09670262.2014.904524.
- Lessa E.P. 1990.** Multidimensional scaling of geographic genetic structure. *Syst. Biol.* 39: 242–252.
- Lin S.M.; Fredericq S. & Hommersand M.H. 2001.** Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on large subunit rDNA and *rbcl* sequences, including the Phycodryodeae, subfam. nov. *J. Phycologia* 37: 881–99.
- Martens G. 1870.** Conpectus algarum Braziliae hactenus detectarum. *Videnskabelige Meddelelser dansk naturhistoriske Forening* 2: 297-314.

- Martone P.T.; Lindstrom S.C.; Miller K.A. & Gabrielson P.W. 2012.** *Chiharaea* and *Yamadaia* (Corallinales, Rhodophyta) represent reduced and recently derived articulated coralline morphologies. *Journal of Phycology* 48(4): 859–868. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01190.x
- Milne I.; Wright F.; Rowe G.; Marshal D.F.; Husmeier D. & McGuire G. 2004.** TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20 (11), 1806-1807
- Milstein D. & Oliveira M.C. 2005.** Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44(2): 212–221.
- Milstein D.; Medeiros A.S.; Oliveira E.C. & Oliveira, M.C. 2011.** Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? *J. Appl. Phycologia* 24, 837–845.
- Milstein D.; Medeiros A.S.; Oliveira E.C. & Oliveira M.C. 2015.** Native or introduced? A re-evaluation of *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil based on molecular analyses. *Eur. J. Phycologia* 50(1): 37-45.
- Moura C.W.N. 1992.** Coralináceas com genículo (Corallinales, Rhodophyta) do litoral Oriental do Estado do Rio Grande do Norte - Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife.
- Moura C.W.N. 2000.** Coralináceas com genículo (Rhodophyta, Corallinales) do litoral do Brasil. 264 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Moura C.W.N.; Kraus J.E. & Cordeiro-Marino M. 1997.** Metodologia para obtenção de cortes histológicos com historesina e coloração com azul de toluidina O para algas coralináceas (Rhodophyta, Corallinales). *Hoehnea* 24(2): 17–27.
- Moura, C.W.N. & Guimarães, S.M.P.B. 2002.** *Amphiroa van-bosseae* (Corallinales, Rhodophyta) no Atlântico tropical americano. *Hoehnea* 29(3): 267-273.
- Moura C.W.N. & Guimarães S.M.P.B. 2005.** O gênero *Amphiroa* (Lithophylloideae, Rhodophyta) no litoral do Brasil. *Monogr. Ficol.* 2: 3-65.
- Nash M.C.; Troitzsch U.; Opdyke B.N.; Trafford J.M.; Russel B.D & Kline D.I. 2011.** First discovery of dolomite and magnesite in living coralline algae and its geobiological implications. *Biogeosciences* 8: 3331-3340.
- Nauer F. 2014.** Filogenia molecular e diversidade do gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) na costa brasileira. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.
- Nelson W.A.; Sutherland J.E.; Farr T.J.; Hart D.R.; Neill K.F.; Kim H.J. & Yoon H.S. 2015.** Multi-gene phylogenetic analyses of New Zealand coralline algae: *Corallinapetra novaezelandiae* gen. et sp. nov. and recognition of the Hapalidiales ord. nov. *J. Phycologia* (no prelo).
- Nunes C.W.N.; Guimarães S.M.P.B.; Donnangelo A.; Farias J. & Horta P.A. 2008.** Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não articuladas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59 (1): 75-86.
- Nylander J.A.A. 2004.** MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira E.C. 1977.** Algas marinhas bentônicas do Brasil. Tese de Livre-Docência. Instituto de biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 407 p.
- Peña V. & Bárbara I. 2004.** Diferenciación morfológica y anatómica entre *Lithothamnion corallioides* y *Phymatolithon calcareum* (Corallinales, Rhodophyta) en dos bancos de maërl de la Ría de Arousa (N.O. Península Ibérica). *Anales de Biología* 26: 21-27.
- Peña V.; Adey W.H.; Riosmena-Rodríguez R.; Jung M.J.; Afonso-Carrillo J.; Choi H.G. & Bárbara I. 2011.** *Mesophyllum sphaericum* sp. nov. (Corallinales, Rhodophyta): a new maërl-forming species from the Northeast Atlantic. *J. Phycologia* 47: 911-927
- Peña V.; Rousseau F.; Reviers B. & Le Gall L. 2014.** First assessment of the diversity of coralline species forming maerl and rhodoliths in Guadeloupe, Caribbean using an integrative systematic approach. *Phytotaxa* 190(1): 190–215.

- Pereira S.L. 2012.** Reconstrução filogenética: inferência bayesiana. In: Matioli S.R. & Fernandes F.M.C. (Eds.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Editora Holos. P. 147-156.
- Piqué M.P.R. 1984.** Estudos das coralináceas articuladas (Rhodophyta) do litoral do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- Philippi, R.A. 1837.** Beweis, dass die Nulliporen Pflanzen sind. *Archiv für Naturgeschichte* 3: 387–393.
- Presting G.G. 2006.** Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Can. J. Bot.* 84: 1434–1443.
- Pueschel C.M. & Cole K.M. 1982.** Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. *Am. J. Bot.* 69: 703–720.
- Puillandre N.; Lambert A.; Brouillet S. & Achaz G. 2012.** ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21: 1864–1877.
- Rambaut A. 2009.** FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. Website: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ratnasingham S. & Hebert P.D.N. 2007.** BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7(3): 355-364.
- Richards J.L.; Gabrielson P.W. & Fredericq S. 2014.** New Insights into the Genus *Lithophyllum* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Corallinales) from Deepwater Rhodolith Beds Offshore the NW Gulf of Mexico. *Phytotaxa* 190(1): 162–175.
- Riosmena-Rodríguez R. & Siqueiros-Beltrones D.A. 1996.** Taxonomy of the genus *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) in the southern Baja California Peninsula, Mexico. *Phycologia* 35(2): 135-147.
- Riosmena-Rodríguez R.; Woelkerling W.J. & Foster M.S. 1999.** Taxonomic reassessment of rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales, Rhodophyta) in the Gulf of California, Mexico. *Phycologia* 38(5): 401-417.
- Riosmena-Rodríguez R.; Steller D.L.; Hinojosa-Arango G. & Foster M.S. 2010.** Reefs that rock and roll - Biology and conservation of rhodolith beds in the Gulf of California. In: R.C. Brusca (Ed.) *The Gulf of California*. Tucson, The University of Arizona Press and The Arizona-Sonora Desert Museum. P.p. 49-71.
- 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.
- Rokas A. & Carroll S.B. 2005.** More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Mol. Biol. Evol.* 22(5): 1337–1344.
- Rosas-Alciquira E.F.; Riosmena-Rodríguez R. & Neto A.I. 2010.** Segregating characters used within *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) and taxonomic reevaluation. *J. Appl. Phycologia* 23(3): 475-488.
- Saitou N. & Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sambrook J.; Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., v. 3. Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.
- Sanger F.; Nicklen S. & Coulson A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P. Natl. Acad. Sci.* 74(12): 5463-5467.
- Saunders G.W. 2005.** Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1879-1888.
- Saunders G.W. & Bailey J.C. 1997.** Phylogenesis of pit-plug-associated features in the Rhodophyta: inferences from molecular systematic data. *Can. J. Bot.* 75: 1436-1447.
- Saunders G.W. & Moore T.E. 2013.** Refinements for the amplification and sequencing of red algal DNA barcode and RedToL phylogenetic markers: a summary of current primers, profiles and strategies. *Algae* 28(1): 31–43.
- Saunders G.W. 2008.** A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*-*Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86: 773-789.

- Schweigger A.F. 1819.** Beobachtungen auf naturhistorischen Reisen: anatomisch-physiologische Untersuchungen über Corallen; nebst einem Anhang, Bemerkungen über den Bernstein enthaltend. Berlin: G. Reimer. 127 p.
- Sherwood A. & Sheath R.F. 2000.** Biogeography and systematics of Hildenbrandia (Rhodophyta, Hildenbrandiales) in Europe: inferences from morphometrics and *rbcL* and 18S gene sequence analyses. *Eur. J. Phycologia* 35: 143–152
- Sherwood A.R. & Presting G.G. 2007.** Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in Eukaryotic algae and cyanobacteria. *J. Phycologia* 43, 605–608.
- Sherwood A.R.; Kurihara A.; Conklin K.Y.; Sauvage T. & Presting G.G. 2010a.** The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006–2010): a summary of principal findings. *BMC Plant Biol.* 10: 258.
- Sherwood A.R.; Sauvage T.; Kurihara A.; Conklin K.Y. & Presting G.G. 2010b.** A comparative analysis of COI, LSU and UPA marker data for the Hawaiian florideophyte Rhodophyta: implications for DNA barcoding of red algae. *Cryptogamie, Algologie* 31(4): 451–465.
- Seo K.S.; Cho T.O.; Park J.S.; Yang E.C.; Yoon H.S. & Boo S.M. 2003.** Morphology, basiphyte range, and plastid DNA phylogeny of *Campylaeophora borealis* stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Taxon* 52: 9–19.
- 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.
- 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. Anais do XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar – XII COLACMAR.
- Sissini M.N.; Oliveira M.C.; Gabrielson P.W.; Robinson N.R.; Okolodkov Y.B.; Riosmena-Rodríguez R.; Horta P.A. 2014.** *Mesophyllum erubescens* (Corallinales, Rhodophyta)—so many species in one epithet. *Phytotaxa* 190(1): 299–319.
- Steller D.L.; Foster M.S.; Riosmena-Rodríguez R. 2007.** Sampling and monitoring rhodolith beds. Pp. 93–97. In: Sampling biodiversity on Coastal communities - NaGISA protocols for seagrass and macroalgal habitats (Rigby, P.R., Iken, K. & Shirayama, Y. eds.). Kyoto University Press, Japan.
- Stoeckle M. 2003.** Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* 53(9): 796–797.
- Swofford D.L. 2003.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sunesson S. 1943. The structure, life-history, and taxonomy of the Swedish Corallinales. *Aela Univ. lund. N.F. Avd.* 2 39(9): 1–66.
- Tâmega F.T.S. & Figueiredo M.A.O. 2005.** Distribuição das algas calcárias incrustantes (Corallinales, Rhodophyta) em diferentes habitats na Praia do Forno, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. *Rodriguésia* 56(87): 123–132.
- Tâmega F.T.S. & Figueiredo M.A.O. 2007.** Distribution of crustose coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) in the Abrolhos reefs, Bahia, Brazil. *Rodriguésia* 58(4): 941–947.
- Tamura K.; Stecher G.; Peterson D.; Filipski A. & Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Taylor W.R. 1931.** Synopsis of the marine algae of Brazil. *Revue Algologique* 5: 279–313.
- Taylor W.R. 1960.** Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. Ann Arbor, University of Michigan Press. 870 p.
- Tautz D.; Arctander P.; Minelli A.; Thomas R.H. & Vogler A.P. 2003.** A plea for DNA taxonomy. *Trend. Ecol. Evol.* 18: 70–74.
- Templeton A.R.; Crandall K.A. & Sing C.F. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Torrano-Silva B.N.; Riosmena-Rodríguez R. & Oliveira M.C. 2014.** Systematic position of *Paulsilvella* in the Lithophylloideae (Corallinales, Rhodophyta) confirmed by molecular data. *Phytotaxa* 190(1): 094–111.

- Townsend R.A. & Adey W.H. 1990.** Morphology of the Caribbean alga: *Goniolithon improcerum* Foslie et Howe in Foslie (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 33: 99-116.
- Valentin J.L.; André D.L. & Jacob S.A. 1987.** Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: two-dimensional structure and variability during a Wind cycle. *Cont. Shelf Res.* 7: 77-88.
- Vidal R.; Meneses I. & Smith M. 2002.** Enhanced DNA extraction and PCR amplification of SSU ribosomal genes from crustose coralline algae. *J. Appl. Phycologia* 14: 223-227.
- Vidal R.; Meneses I. & Smith M. 2003.** Molecular genetic identification of crustose representatives of the order Corallinales (Rhodophyta) in Chile. *Mol. Phylog. Evol.* 28: 404-419.
- Vieira-Pinto T.; Oliveira M.C.; Bouzon J.; Sissini M.; Richards J.L.; Riosmena-Rodríguez R.; Horta P.A. 2014.** *Lithophyllum* species from Brazilian coast: range extension of *Lithophyllum margaritae* and description of *Lithophyllum atlanticum* sp. nov. (Corallinales, Corallinophycidae, Rhodophyta). *Phytotaxa* 190(1): 355-369.
- Villaça R.; Fonseca A.C.; Jensen V.K. & Knoppers B. 2010.** Species composition and distribution of macroalgae on Atol das Rocas, Brazil, SW Atlantic. *Bot. Mar.* 53: 113-122.
- Villas Bôas A.B. 2004.** Colonização e crescimento das algas calcárias incrustantes (Corallinales, Rhodophyta) no Recife do Atol das Rocas. Dissertação de Mestrado (Biologia Marinha). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.
- Villas-Bôas A.B.; Figueiredo M.A.O. & Villaça R.C. 2005.** Colonization and growth of crustose coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) at Atol das Rocas Reef. *Braz. J. Oceanogr.* 53 (3/4): 147-156.
- Villas-Bôas A.B. 2008.** Comunidades de organismos incrustantes e identificação de algas calcárias em bancos de rodolitos no Estado do Espírito Santo. Tese de Doutorado (Botânica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Villas-Boas A.B.; Riosmena-Rodriguez R.; Amado-Filho G.M.; Maneveldt G. & Figueiredo M.A. 2009.** Rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales; Rhodophyta) from Espírito Santo state, Brazil, including the description of *L. depressum* sp. nov. *Phycologia* 48: 237-248.
- Woelkerling W.J.; Chamberlain Y.M.; Silva P.C. 1985.** A taxonomic and nomenclatural reassessment of *Tenarea*, *Titanoderma* and *Dermatolithon* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of type and other critical specimens. *Phycologia* 24: 317-337.
- Woelkerling W.J. & Campbell S.J. 1992.** An account of southern Australian species of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bulletin of the British Museum. Nat. Hist. (Bot.)* 22(1), 1-107.
- Woelkerling W.J.; Irvine L.M. & Harvey A. 1993.** Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). *Austr. Syst. Bot.* 6: 277-293.
- Woelkerling W.M.J.; Sartoni G. & Bod S. 2002.** *Paulsilvella huveorum* gen. & sp. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) from the Holocene of Somalia and Kenya, with a reassessment of *Lithothrix antiqua* from the Late Pleistocene of Mauritius. *Phycologia* 41(4): 358-373.
- Woelkerling W.J. & Harvey A. 2012.** Lectotypification and epitypification of the type species of *Amphiroa*, *A. tribulus* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 51(1): 113-117.
- Woelkerling W.J. 1983.** A taxonomic reassessment of *Lithophyllum* Philippi (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of R. A. Philippi's original collections. *Br. Phycologia J.*, 18(3): 299-328.
- Woelkerling W.J. 1988.** The coralline red algae: an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. London and Oxford. British Museum (Natural History) and Oxford University Press. xi + 268 p.
- Yamaguishi-Tomita N. 1976.** Contribuição ao conhecimento do gênero *Sporolithon* (Corallinaceae, Cryptonemiales) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 138 p.
- 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 680-688.
- Yoneshigue Y. 1985.** Taxonomie et écologie des algues marines dans la région de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brésil). Tese de Doutorado, Université de Marseille II.

Yoon H.S.; Hackett J.D. & Bhattacharya D. 2002. A single origin of the peridinin and fucoxanthin containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. Unit. St. Am.* 99(18): 11724-11729.

Yoshida T. 1998. Marine algae of Japan. 1222 pp. Uchida Rokakuho Publishing Co., Ltd., Tóquio.

Zhang J.; Kapli P.; Pavlidis P. & Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29(22): 2869-2876.

ANEXO I – Amostras e Sequências

Lista de amostras coletadas para esta Tese, relacionando o nome da espécie aos detalhes de coleta e às sequências produzidas. Apenas Lithophylloideae.

Tabela 1. Relação das informações de campo e das sequências geradas para as amostras de Lithophylloideae que coletamos na costa brasileira.

Espécie	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>A. fragilissima</i> [1]	-	ibc1403	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x		x	x	
	-	ibc1199	Pr. dos Castelhanos, Anchieta, ES, entremarés, 05.V.2012	20°50'04.18"S 40°37'21.57"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1200	Pr. dos Castelhanos, Anchieta, ES, entremarés, 05.V.2012	20°50'04.18"S 40°37'21.57"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x	x		x	
	-	ibc1225	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 09.V.2017	20°43'47.63"S 40°31'25.61"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x				
	-	ibc1481	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	
	SPF57697	ibc1484	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	x
	-	ibc1254	Pr. do Viana, Ilhabela, SP, entremarés, 03.VIII.2012	23°45'31.5"S 45°21'03.2"W	Vieira, B.R. & B. Torrano-Silva	x				
	-	ibc1033	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, entremarés, 30.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1040	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, 6-10m prof., 30.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x		x	x	
	-	ibc1017	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 15m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x	x	x	x	
	-	ibc1314	Pr. de Pta. do Peba, Piaçabuçu, AL, 0,5m prof., 11.III.2013	10°21'23.1"S 36°17'45.1"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1335	São Miguel dos Milagres, AL, entremarés, 14.III.2013	9°16'00.2"S 35°21'55.8"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1396	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x				
	-	ibc1399	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x				
	-	ibc1400	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x		x	x	
	-	ibc1402	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x				
	-	ibc1403	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, 0,5m prof., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x		x	x	

Espécie	Voucher	Nº de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcl	SSU rDNA
<i>A. fragilissima</i> [1]	-	ibc1412	23.V.2013 Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, 0,5m prof., 24.V.2013	38°13'44.1"W 13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	Pinto & C.A.A. Azevedo B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x		x	x	
	-	ibc1451	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, entremarés, 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x			x	
	-	ibc1453	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, entremarés, 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1455	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, entremarés, 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1456	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, entremarés, 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1457	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, entremarés, 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1481	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	
	SPF57697	ibc1484	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	x
<i>A. fragilissima</i> [2]	-	ibc1489	Parcel Manuel Luís, MA, 15m prof., 12.IV.2012	00°52'S 44°16'W	P.A. Horta	x		x	x	
<i>A. fragilissima</i> [3]	-	ibc1018	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 10m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x	x	x	x	
<i>A. fragilissima</i> [4]	-	ibc1343	Pedra Rachada, Paracuru, CE, entremarés, 24.IV.2013	3°24'21.4"S 39°01'46.7"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x			x	
	-	ibc2591	Pr. do Tororão, Prado, BA, entremarés, 14.V.2014	17°14'21.8"S 039°12'48.3"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x	x	x	x	
<i>A. fragilissima</i> [5]	-	ibc1219	Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, ES, entremarés, 08.V.2012	20°38'06.83"S 40°26'13.25"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1057	Pr. do Forno, Armação de Búzios, RJ, entremarés, 25.IX.2011	22°45'42.56"S 41°52'29.11"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1048	Pr. da Ferradura, Armação de Búzios, RJ, entremarés, 25.IX.2011	22°46'09.62"S 41°52'59.81"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x		x		
	-	ibc1096F	Prainha, Arraial do Cabo, RJ, entremarés, 29.IX.2011. GPS	22°57'22.06"S 42°01'36.30"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x			x	
	-	ibc1143	Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, 12m prof., 24.II.2012	27°36.34'S 48°23.13'W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo			x	x	
<i>A. fragilissima</i> [6]	-	ibc1304	Pr. de Pta. do Pebas, Piaçabuçu, AL, 0,5m prof., 11.III.2013	10°21'23.1"S 36°17'45.1"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
	-	ibc1454	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, 0,5m prof., 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1458	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, 0,5m prof., 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x			x	

Espécie	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>A. fragilissima</i> [6]	-	ibc1468	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, 0,5m prof., 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1414	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, PROF., 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x				
	-	ibc2534F	Pta. do Corumbau, Prado, BA, 0,5m prof. 13.V.2014	16°53'52.0"S 039°06'34.7"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x				
	-	ibc2534G	Pta. do Corumbau, Prado, BA, 0,5m prof. 13.V.2014	16°53'52.0"S 039°06'34.7"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x		x	x	
	SPF57694	ibc1480	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	x
	-	ibc1120	Pr. do Carro, Saco do Mamanguá, Parati, RJ, 0,5m prof., 09.XII.2011	23°14'21.95"S 44°37'06.85"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
<i>A. vanbosseae</i>	-	ibc1395	Pr. de Jauá, Camaçari, BA, PROF., 23.V.2013	12°49'51.0"S 38°13'44.1"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo				x	
	-	ibc1007	Recife Sebastião Gomes, Caravelas, BA, 0,5m prof., 25.I.2008	17°55'22.62"S 39°07'54.48"W	B. Torrano-Silva & E.C. Oliveira	x	x	x	x	
	-	ibc1432	Recifes das Caramuanas, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, 0,5m prof., 25.V.2013	13°07'16.0"S 38°45'15.5"W	B. Torrano, M. Jamas, T. Vieira-Pinto & C.A.A. Azevedo	x		x	x	
<i>A. rigida</i>	-	ibc1450	Pr. de Guarajuba, Camaçari, BA, PROF., 26.V.2013	12°39'01.4"S 38°03'53.4"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x			x	
	-	ibc1217	Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, ES, entremarés, 08.V.2012	20°38'06.83"S 40°26'13.25"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1223	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 09.V.2017	20°43'47.63"S 40°31'25.61"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x	x	
	-	ibc1224	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 09.V.2017	20°43'47.63"S 40°31'25.61"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x	x	
	-	ibc1180	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x	x	x	x	
<i>Amphiroa</i> sp. 1	-	ibc1345	Pr. da Pedra Rachada, Paracuru, CE, PROF., 24.IV.2013	3°24'21.4"S 39°01'46.7"W	B. Torrano, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
<i>Amphiroa</i> sp. 2	-	ibc1475	Pr. de Subaúma, Entre Rios, BA, mesolitoral, 27.V.2013	12°14'15.9"S 37°46'11.8"W	B. Torrano-Silva, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
	-	ibc2627	Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, BA, 0,5m prof., 16.V.2014	14°48'21.4"S 039°01'25.2"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x	x	x	x	
<i>Amphiroa</i> sp. 3	-	ibc1096A	Praia, Arraial do Cabo, RJ, entremarés, 29.IX.2011. GPS	22°57'22.06"S 42°01'36.30"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
<i>A. beauvoisii</i> [1]	-	ibc1218	Pta. da Pr. de Setiba, Guarapari, ES, entremarés, 08.V.2012	20°38'06.83"S 40°26'13.25"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1226	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 09.V.2017	20°43'47.63"S 40°31'25.61"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x	x	
	-	ibc1178	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m	20°50'00.3"S	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x				

Espécie	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>A. beauvoisii</i> [1]	-	ibc1181	prof., 05.IV.20112 Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	40°41'48.5"W 20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x		x		
	-	ibc1182	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x	x	x		
	-	ibc1183	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x	x			
	-	ibc1058	Pr. do Forno, Armação de Búzios, RJ, entremarés, 25.IX.2011	22°45'42.56"S 41°52'29.11"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x				
	-	ibc1095	Prainha, Arraial do Cabo, RJ, entremarés, 29.IX.2011. GPS	22°57'22.06"S 42°01'36.30"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1124	Laje Grande, Saco do Mamanguá, Parati, RJ, 0,2-1,0m prof. 09.XII.2011	23°16'20.52"S 44°37'50.39"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x				
	-	ibc1198	Banco do Índio, Anchieta, ES, 16m prof., 11.IV.2012	4 K 336118 768848	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x			x	
	-	ibc1273	Pr. do Julião, Ilhabela, SP, entremarés, 04.VIII.2012	23°51'12.76"S 45°24'44.53"W	B. Torrano-Silva; Vieira, B.R.; Vieira-Pinto, T. & Azevedo, C.A.A.	x				
	-	ibc1274	Pr. do Julião, Ilhabela, SP, entremarés, 04.VIII.2012	23°51'12.76"S 45°24'44.53"W	B. Torrano-Silva; Vieira, B.R.; Vieira-Pinto, T. & Azevedo, C.A.A.	x				
	-	ibc1003	Pr. de Pta. das Canas, Florianópolis, SC, entremarés, 26.II.2012	27°24.89'S 48°26.78'W	B. Torrano-Silva & P.A. Horta	x				
<i>A. beauvoisii</i> [2]	-	ibc1046	Pr. da Ferradura, Armação de Búzios, RJ, entremarés, 25.IX.2011	22°46'09.62"S 41°52'59.81"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x		x	
	-	ibc1077	Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, RJ, 1,5m prof. 27.IX.2011	22°44'27.27"S 41°52'25.81"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x		
	-	ibc1107	Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, SP, 6-12m prof., 26.X.2011	24°06'14.7"S 045°42'10.3"W	B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira	x		x		
	-	ibc1136	Ilha Rapada, SP, 12m prof. 12.I.2012	23°25'34.07"S 44°54'12.83"W	P.A. Horta	x	x	x	x	
	-	ibc1263	Porto Frades, Ilhabela, SP, entremarés, 04.VIII.2012	23°55'42.1"S 45°26'38.1"W	B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues, T. Vieira-Pinto & C.A. Azevedo	x				
	-	ibc1266	Porto Frades, Ilhabela, SP, entremarés, 04.VIII.2012	23°55'42.1"S 45°26'38.1"W	B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues, T. Vieira-Pinto & C.A. Azevedo	x				
	-	ibc1008	Pr. da Fortaleza, Ubatuba, SP., 2m prof., 19.IX.2010	23°31'55.4"S 45°09'43.6"W	H. Verbruggen, M.B. Barros-Barreto, M.C. Oliveira & B. Torrano-Silva	x	x	x	x	
	-	ibc1238	Pr. de Cibratel, Itanhaém, SP, entremarés, 20.VII.2012	24°13'18.72"S 46°51'05.11"W	B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues & W. Oliveira	x	x	x	x	
	-	ibc1144	Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, 12m prof. 24.II.2012	27°36.34'S 48°23.13'W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo		x	x	x	
	-	ibc1164	Ganchos de Fora, Governador Celso Ramos, SC, entremarés, 27.II.2012	27°18'21.82"S 48°32'49.83"W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo			x		

Espécie	Voucher	Nº de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcl	SSU rDNA
<i>A. beauvoisii</i> [3]	-	ibc1227	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 09.V.2017	20°43'47.63"S 40°31'25.61"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x	x	
	-	ibc1179	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x	x	x	x	
	-	ibc1184	Pr. da Areia Preta, Anchieta, ES, 0-2m prof., 05.IV.20112	20°50'00.3"S 40°41'48.5"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x	x			
	-	ibc1087	Pr. da Ilha do Farol, Arraial do Cabo, RJ, entremarés, 28.IX.2011	23°00'05.63"S 42°00'16.38"W	B. Torrano-Silva, F. Nauer & C. Iha	x	x			
<i>A. beauvoisii</i> [3]	-	ibc1129	Pr. Grande, Pouso da Cajaíba, Parati, RJ, entremarés, 12.XII.2011	23°15'49.31"S 44°35'04.43"W	B. Torrano-Silva, F. Nauer & C. Iha	x		x	x	
	-	ibc1023	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, 5m prof. 29.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x	x	x		
	-	ibc1113	Ilha do Farol, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, SP, 12m prof., 27.X.2011	24°05'47.7"S 045°42'09.6"W	M.C. Oliveira & B. Torrano-Silva	x	x	x		
	-	ibc1041	Pr. do Éden, Guarujá, SP, entremarés, 12.IX.2011	23°59'05.10"S 46°11'11.64"W	Medeiros A., C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1152	Pr. de Pta. das Canas, Florianópolis, SC, entremarés, 26.II.2012	27°24.89'S 48°26.78'W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo	x			x	
<i>Amphiroa</i> sp. 4	-	ibc2624	Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, BA, 0,5m prof., 16.V.2014	14°48'21.4"S 039°01'25.2"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x	x	x	x	
<i>L. atlanticum</i>	-	ibc1289	Pr. do Francês, Marechal Deodoro, AL, 1m prof. 10.III.2013	9°46'07.79"S 35°50'17.44W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto			x	x	
	-	ibc1079	Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, RJ, 3m prof. 27.IX.2011	22°44'27.27"S 41°52'25.81"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x		x	
	-	ibc1082	Pr. de João Fernandes, Armação de Búzios, RJ, 3m prof. 27.IX.2011	22°44'27.27"S 41°52'25.81"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer			x		
	-	ibc1088	Praias do Pta.I do Atalaia, Arraial do Cabo, RJ, mesolitoral, 28.IX.2011	22°59'17.09"S 42°00'46.14"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer			x		
	-	ibc2646	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer			x	x	
	-	ibc1009	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 15m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x	x		x	
	-	ibc1014	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 5m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x			x	
	-	ibc1027	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, 5m prof. 29.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x				
	-	ibc1104A	Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, 10m prof., 26.X.2011	24°06'14.7"S 045°42'10.3"W	B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira	x		x		
	-	ibc1106	Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, 12m prof., 26.X.2011.	24°06'14.7"S 045°42'10.3"W	B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira	x		x		
	-	ibc1140A	Ilha Rapada, SP, 12m prof. 12.I.2012	23°25'34.07"S	P.A. Horta	x				

Espécie	Voucher	Nº de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>L. atlanticum</i>	-	ibc1232	Pr. de Cibratel, Itanhaém, SP, entremarés, 20.VII.2012	44°54'12.83"W 24°13'18.72"S 46°51'05.11"W	B. Torrano-Silva, B.V. Rodrigues & W. Oliveira	x	x		x	
	-	ibc1016	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 5m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x				
	-	ibc1157	Rancho Norte, ilha do Arvoredo, Florianópolis, SC, 25.II.2012	27°17'19.49"S 48°22'05.95"W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo		x	x	x	x
	-	ibc1161	Pr. de Palmas, Governador Celso Ramos, SC, entremarés, 27.II.2012	27°18'47.90"S 48°32'23.01"W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo			x		
<i>L. corallinae</i>	-	ibc1292	Pr. do Francês, Marechal Deodoro, AL, 1m prof. 10.III.2013	9°46'07.79"S 35°50'17.44W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto				x	
	-	ibc1194	Banco do Índio, Anchieta, ES, 19m prof., 11.V.2012	20°53'12.137"S 40°34'58.355"W	B. Torrano-Silva & C.E. Amancio	x			x	
	-	ibc1294	Pr. do Francês, Marechal Deodoro, AL, 1m prof. 10.III.2013	9°46'07.79"S 35°50'17.44W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1072	Pr. de João Fernandinho, Búzios, RJ, 5m prof. 26.IX.2011	22°44'20.3"S 41°52'27.2"W	B. Torrano-Silva, C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
	-	ibc1011	Ilha da Queimada Grande, Itanhaém, SP, 15m prof., 19.IV.2010	23°59'12"S 46°11'15"W	B. Torrano-Silva & M. Sissini	x			x	
<i>T. pustulatum</i>	-	ibc1415	Buraco do Inferno, Fernando de Noronha, PE, 21.XI.2011	03°50'S 32°25'W	F. Scherner & D. Burgos	x	x		x	
<i>Lithophyllum</i> sp. 1[1]	-	ibc1491	Laje 2 Irmãos, Fernando de Noronha, 20-25m. prof., 09.VIII.2013	03°50'S 32°25'W	P.A. Horta	x				x
	-	ibc1492	Pta. da Sapata, Fernando de Noronha, PE, 20-25m. prof., 08.VIII.2013	03°50'S 32°25'W	P.A. Horta	x		x		
<i>Lithophyllum</i> sp. 1[2]	-	ibc1221	Enseada Azul, Meaípe, ES, entremarés, 08.V.2012	20°43'46.26"S 40°31'25.67"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x		
	-	ibc1204	Pr. dos Castelhanos, Anchieta, ES, entremarés, 05.V.2012	20°50'04.18"S 40°37'21.57"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x	x	x		
	-	ibc1205	Pr. dos Castelhanos, Anchieta, ES, entremarés, 05.V.2012	20°50'04.18"S 40°37'21.57"W	B. Torrano-Silva, M.C. Oliveira, F. Nauer & C. Iha	x		x		
<i>Lithophyllum</i> sp. 2	-	ibc2634	Farol, I. da Trindade, ES, 14m prof. 10.VII.2012	S20°29'54.1" W29°19'19.1"	M. Sissini	x				
<i>Lithophyllum</i> sp. 3	-	ibc1288	Pr. do Francês, Marechal Deodoro, AL, 1m prof. 10.III.2013	9°46'07.79"S 35°50'17.44W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
	-	ibc1293	Pr. do Francês, Marechal Deodoro, AL, 1m prof. 10.III.2013	9°46'07.79"S 35°50'17.44W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto				x	
<i>Lithophyllum</i> sp. 4	-	ibc1469	Buraco do Inferno, Fernando de Noronha, PE, 21.XI.2011	03°50'S 32°25'W	F. Scherner & D. Burgos			x	x	
	-	ibc2648	Pta. da Sapata, Fernando de Noronha, PE, 25m. prof., 07.VIII.2013	03°50'S 32°25'W	P.A. Horta	x	x	x	x	

Espécie	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>Lithophyllum</i> sp. 4	-	ibc2649	Pta. da Sapata, Fernando de Noronha, PE, 10m. prof., 07.VIII.2013	03°50'S 32°25'W	P.A. Horta	x	x	x	x	
	-	ibc1477	Pr. do Leo, Fernando de Noronha, PE, 21.XI.2011	03°50'S 32°25'W	M. Sissini	x		x	x	
	-	ibc1419	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc1425	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1426	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
	-	ibc1427	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x	x	x	x	
	-	ibc1428	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1429	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, entremarés, 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	
	-	ibc1474	Pr. de Subaúma, Entre Rios, BA, mesolitoral, 27.V.2013	12°14'15.9"S 37°46'11.5"W	B. Torrano-Silva, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x				
	-	ibc2537	Pta. do Corumbau, Prado, BA, 0,5m prof., 13.V.2014	16°53'52.0"S 039°06'34.7"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos					x
	-	ibc2589	Pr. do Tororão, Prado, BA, mesolitoral, 14.V.2014	17°14'21.8"S 039°12'48.3"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x				
	-	ibc2631	Pr. do Morro de Pernambuco, Ilhéus, BA, 0,5m prof., 16.V.2014	14°48'21.4"S 039°01'25.2"W	B. Torrano-Silva, J. Pires & A.S. Santos	x				
	-	ES3/ibc1303	Ilha Escalvada, ES, 20-25m prof. 28.III.2012	20°40'S 44°24'W	M. Sissini	x		x	x	
	-	ES7/ibc1315	Ilhas Rasas, ES, 15m prof. 29.III.2012	20°40'80"S 40°22'00"W	M. Sissini	x	x	x	x	
	-	ES9/ibc1322	Ilha Escalvada, ES, 20-25m prof. 28.III.2012	20°40'S 44°24'W	M. Sissini	x		x		
	-	ES12/ibc1328			M. Sissini	x			x	
	-	ibc2637	Calheta, I. da Trindade, ES, 3m prof. 24.VI.2012	20°30'29.5"S 29°18'37.0"W	Sissini, M	x	x	x	x	
	-	ibc2639	Noroeste, I. da Trindade, ES, 15m prof. 04.VII.2012	20°29'57.8"S 29°20'39.2"W	Sissini, M	x	x		x	
<i>T. prototypum</i>	-	ibc2636	Eme, I. da Trindade, ES, 14m prof. 6.VIII.2012	20°30'49.9"S 29°20'13.4"W	M. Sissini			x	x	x
<i>Lithophyllum</i> cf. <i>depressum</i>	-	ibc1006	Chapeirão no Parcel de Abrolhos, BA, 6m prof., 27.I.2008	17°58'24.72"S 038°40'27.36"W	B. Torrano-Silva & E.C. Oliveira	x			x	
	-	ibc1444	Pr. da Coroa, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, BA, 1m prof. 24.V.2013	13°00'21.2"S 38°38'16.0"W	B. Torrano-Silva, M. Jamas, C.A.A. Azevedo & T. Vieira-Pinto	x		x	x	x

Espécie	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>Lithophyllum cf. depressum</i>	-	ibc2632	Crista do Galo, I. da Trindade, ES, 0,5m prof. 12.VI.2012	20°29'22.1"S 29°20'03.1"W	M. Sissini	x		x		
	-	ibc2638	Orelhas, I. da Trindade, ES, 15m prof. 31.VII.2012	20°29'40.2"S 29°20'32.9"W	M. Sissini	x	x	x	x	
	-	ibc2640	Crista do Galo, I. da Trindade, ES, 0,5m prof. 12.VI.2012	20°29'22.1"S 29°20'03.1"W	M. Sissini	x				
	-	ibc2641	Crista do Galo, I. da Trindade, ES, 0,5m prof. 12.VI.2012	20°29'22.1"S 29°20'03.1"W	M. Sissini	x				
	-	ibc2633	Crista do Galo, I. da Trindade, ES, 0,5m prof. 12.VI.2012	20°29'22.1"S 29°20'03.1"W	M. Sissini	x		x	x	
	-	ibc2642	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer			x		
	-	ibc2643	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer			x	x	
<i>Lithophyllum cf. margaritae</i>	-	ibc2644	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer			x	x	
	-	ibc1156	Rancho Norte, ilha do Arvoredo, Florianópolis, SC, 25.II.2012	27°17'19.49"S 48°22'05.95"W	B. Torrano-Silva, M. Sissini, F. Nauer & C.A.A. Azevedo				x	
<i>P. huveorum</i>	SPF57695	ibc1482	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	x
	SPF57698	ibc1486	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva & F. Nauer	x		x	x	x

Tabela 2. Relação das informações de campo e das sequências geradas para amostras recém-coletadas incluídas nas inferências filogenéticas realizadas, incluindo algumas Lithophylloideae (*Amphiroa* e *Lithophyllum*) coletadas fora do país, além de outros grupos de Corallinophycideae coletados no Brasil.

Identificação	Voucher	N° de Coleta	Localidade e data	Coordenadas (GMS)	Coletores	Número de acesso no Genbank				
						UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
<i>A. tribulus</i>	-	ibc2656	Akumal, Yucatán, México, 12.10.2014	-	L. Collado & A. Neto			x		
<i>A. sp.</i>	-	ibc2657	Akumal, Yucatán, México, 12.10.2014	-	L. Collado-Vides & A. Neto	x		x		
<i>Amphiroa</i> sp.	-	ibc2651	Sandfly Bay, Panamá, 08.V.2012	-	M. Sissini	x		x	x	
<i>L. margaritae</i>	-	ibc2647	Bahía Concepción, BCS, México, XII.2012	-	J. Martínez & L.A. McConnico	x		x	x	
Lithophylloideae incrustante	-	Bdt#19/ibc2652	Isla Color, Mimbi Timbi, Panamá, 11.V.2012	-	M. Sissini	x		x	x	
<i>Hydrolithon</i> sp.	-	IT30/ibc2635	Pr. das Cabritas, I. da Trindade, ES, 9m prof. 14.VI.2012	-	M. Sissini	x		x	x	
<i>Hydrolithon</i> sp.	-	IT34/ibc2653	Calheta, I. da Trindade, ES, 3m prof. 7.IX.2014	-	M. Sissini	x		x		
<i>Pneophyllum</i> sp.	-	IT57/ibc2636	I. da Trindade, ES, 2012	-	M. Sissini	x	x	x	x	
<i>Arthrocardia</i> sp.	-	ibc1001	Pr. de Pta. das Canas, Florianópolis, SC, entremarés, 26.II.2012	27°24.89'S 48°26.78'W	B. Torrano-Silva & P.A. Horta	x	x	x	x	
<i>Arthrocardia</i> sp.	-	ibc1021	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, 5m prof. 29.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x		x		
<i>Arthrocardia</i> sp.	-	ibc1022	Ilha das Palmas, Ubatuba, SP, 5m prof. 29.VIII.2011	23°32'50.00"S 45°01'50.19"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x		x	x	
<i>Jania</i> sp.	-	ibc1034	Ilha das Cabras, Ubatuba, SP, entremarés, 30.VIII.2011	23°31'01.41"S 45°02'29.36"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x		x	x	
<i>Jania</i> sp.	-	ibc1035	Ilha das Cabras, Ubatuba, SP, entremarés, 30.VIII.2011	23°31'01.41"S 45°02'29.36"W	B. Torrano-Silva, A. Medeiros, C. Iha & F. Nauer	x		x		
<i>Jania</i> sp.	-	ibc1042	Pr. do Éden, Guarujá, SP, entremarés, 12.IX.2011	23°59'05.10"S 46°11'11.64"W	Medeiros A., C. Iha & F. Nauer	x	x	x	x	
<i>Jania</i> sp.	SPF57696	ibc1483	Pr. Vermelha, Ilha Grande, RJ, 5m prof., 09.VII.2013	23°09'34.7"S 044°21'01.3"W	B. Torrano-Silva	x		x	x	
<i>Lithothamnion</i> sp.	-	ibc1103	Saco do Oratório, Arq. de Alcatrazes, São Sebastião, SP, 10m prof., 26.C.2011	24°06'14.7"S 045°42'10.3"W	B. Torrano-Silva & M.C. Oliveira	x		x		x

Tabela 3. Sequências retiradas no Genbank, organizadas por cada *voucher*.

Identificação	Origem	Voucher	Número de acesso no Genbank				
			UPA	COI-5P	psbA	rbcL	SSU rDNA
CORALLINALES							
Corallinaceae							
Corallinoideae							
Alatocladia yessoensis	Japão: Província de Miyaki, Todogasaki	NCU:588184	-	-	-	HQ322277	-
Arthrocardia corymbosa	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Wellington, Ilha Bay	ASE090	-	-	DQ168015	-	-
	África do Sul: Cabo Oriental, Praia de Kidds	NCU:594345	-	-	-	JN701475	-
Arthrocardia filicula	África do Sul		-	-	-	-	U61258
Bossiella californica	EUA: Califórnia, Carmel, Stillwater Cove		-	-	-	-	U60945
Bossiella orbigniana	Chile: Valpariso, Quintay, Praia Caleta	SGO:155070	-	-	-	HQ322279	-
Calliarthron cheilosporioides	EUA: Califórnia, Condado de Monterey, Pacific Grove	UBC:A87283	-	-	-	HQ322284	-
Calliarthron tuberculosum	EUA: California, Condado de Monterey, Pacific Grove	UBC:A87285	-	-	-	HQ322316	U60944
Cheilosporum sagittatum	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Northland, Praia Te Horo	ASD219	-	-	DQ168009	-	-
	Austrália, Victoria, Pt. Lonsdale		-	-	-	-	U60745
Chiharaea bodegensis	Canadá: Colúmbia Britânica, Bamfield, Seppings I.	GWS010828	-	-	-	HQ322332	KC157576
Chiharaea silvae	Canadá: Colúmbria Britânica, Ilha de Vancouver, Porto de Renfrew	NCU:590266	-	-	-	JN701473	-
Corallina officinalis	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Wellington, Ilha Bay	ASE091	-	-	DQ168010	KC134323	-
Corallina pilulifera	Japão: Chiba, Choshi, Nagasaki		-	-	DQ787634	DQ787558	-
Corallina pinnatifolia	EUA: Califórnia, Condado de Orange, Praia da Laguna	UBC:A88590	-	-	-	HQ322333	-
Corallina vancouveriensis	Canadá: Colúmbia Britânica, Porto de Renfrew, Praia Botany	NCU:588197	-	-	-	HQ322334	-
Non-geniculate Coralline	Nova Zelândia: Ilha do Sul, Baia Golden, Praia Wharariki	NZC0445	-	-	DQ167895	-	-
Haliptilon roseum	Nova Zelândia: Ilhas Chatham, Riacho Te One	ASD027	-	-	DQ168011	-	-
	Austrália: Victoria, Pt. Lonsdale		-	-	-	-	U60947
Haliptilon squamatum	Reino Unido: Dorset Kimmeridge	BUT1	-	-	-	-	FM180110
Jania crassa	África do Sul: Natal, Praia Palm		-	-	-	-	U62113
Jania natalensis	África do Sul: Praia de Palm, KwaZulu-Natal	DMK2	-	-	-	EU349111	-
Jania rubens	Reino Unido	CCAP:1399/2	-	-	-	-	FR865647

	Brasil: Ilha Grande, Rio de Janeiro	SPF57696	KM044014	-	KM044019	KM044024	KM044029
<i>Jania sagittata</i>	Austrália: Tasmania, Stanley Breakwater	GWS016470	-	-	-	KC134331	KC157580
<i>Jania sp.</i>	Nova Zelândia: Ilha Stewart, Baía Lee	ASE281	-	-	DQ168020/F J755792	-	-
<i>Serraticardia macmillanii</i>	Canadá: Colúmbia Britânica, Porto de Renfrew, Praia de Botany	NCU:588188	-	-	-	HQ322338	U62114
<i>Yamadaea melobesioides</i>	Japão: Província de Chiba, Awa-Kominato	UBC:A62034	-	-	-	JN701477	-
<i>Lithophylloideae</i>			-	-	-	-	-
<i>Amphiroa anceps</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Northland, Cabo Norte	ND473	-	-	FJ361601	-	-
<i>Amphiroa beauvoisii</i>	EUA: Carolina do Norte, Baía de Onslow	NCweed1184	KF367784	KF367761	-	-	-
	Brasil: Ilha Grande, Rio de Janeiro	SPF57697	KM044015	KM044020	KM044025	KM044030	-
<i>Amphiroa foliacea</i>	EUA: Havaí, Honolulu	ARS00799	-	HQ422658	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS00797	-	HQ422659	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02041	HQ420962	HQ422626	-	-	-
<i>Amphiroa fragilissima</i>	EUA: Key Largo, Condado de Dade		-	-	U04039	-	U60744
	Brasil: Ilha Grande, Rio de Janeiro	SPF57694	KM044012	KM044017	KM044022	KM044027	-
<i>Amphiroa hancockii</i>	EUA		-	-	-	-	AY234233
<i>Amphiroa rigida</i>	México: Mahahual, El Faro	GALW:15768	-	-	JQ896250	-	JQ896277
<i>Amphiroa zonata</i>	Japão: Província de Chiba, Katsuura	NCU:590262	-	-	-	JN701462	-
<i>Amphiroa tribulus</i>	EUA		-	-	-	-	AY234234
<i>Amphiroa sp.</i>	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02782	HQ420955	-	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02308	HQ421467	-	-	-	-
	Austrália: Victória, Porto de Lonsdale		-	-	-	-	U62115
<i>Amphiroa valonioides</i>	EUA: Havaí, Honolulu	ARS00802	HQ421023	HQ422698	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS00801	HQ421497	-	-	-	-
<i>Lithophyllum atlanticum</i>	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Praia Ponta das Canas	FLOR:14576	-	KP192396	-	-	KP192390
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Ilha do Arvoredo	FLOR 14568	KP192371	-	-	-	-
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Ilha do Xavier	FLOR 14575	KP192375	-	-	-	KP192387
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Praia Ponta das Canas	FLOR 14576	KP192377	KP192396	-	-	KP192386
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Praia Ponta das Canas	FLOR:14574	KP192376/ KP192374	KP192395	-	-	-
	Brasil: Santa Catarina, Ilha do Arvoredo	FLOR:14569	KP192373	KP192394	-	-	-

	Brasil: Santa Catarina, Ilha do Arvoredo	FLOR:14567	KP192372	KP192393	-	-	-
	Brasil: Rio Grande do Sul, Torres	FLOR:14566	-	-	-	-	KP192389
<i>Lithophyllum byssoides</i>	Espanha: Ilha Tarifa, Cadiz	GALW:15769	-	-	JQ896252	-	-
	Espanha: San Pedro de Circo, Coruna	GALW:15732	-	-	JQ896251	-	JQ896278
<i>Lithophyllum carpophylli</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Northland	DH3	-	-	DQ167941	-	-
	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Wellington, Ponto Ranger	NZC0870	-	-	DQ167984/ FJ361554/ FJ361555	-	-
<i>Lithophyllum corallinae</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Baia das Ilhas, Moturoa/Rangiatea	ND309	-	-	FJ361544	-	-
	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Auckland, Leigh, Baia de Mathesons	ND52	-	-	FJ361409	-	-
<i>Lithophyllum dentatum</i>	Espanha: La Caleta, Cadiz	GALW:15770	-	-	JQ896255	-	JQ896282
	Irlanda: Ardgroom, Co. Cork	GALW:15771	-	-	JQ896237	-	JQ896264
<i>Lithophyllum grumosum</i>	EUA: Pacífico Norte	Lpro10xii08Lgru	-	-	-	JX393106/JX393121	-
	EUA: Pacífico Norte	cru_cor_13iv09b	-	-	-	JX393124	-
<i>Lithophyllum impressum</i>	EUA: Pacífico Norte	KM56_13iv09b	-	-	-	JX393129	-
			-	-	JQ917416	HQ322335/JX393128	-
<i>Lithophyllum incrustans</i>	EUA		-	-	-	-	AF093410
	Spain: Camella, Galicia	GALW:15772	-	-	JQ896236	-	JQ896263
	França: Bretanha, Finistère, Roscoff	GALW:15733	-	-	JQ896256	-	-
<i>Lithophyllum insipidum</i>	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02347	-	HQ423068	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02818	-	HQ422710	-	-	-
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02358	-	HQ423075	-	-	-
	EUA: Havaí, Oahu, Waimanalo, Baia Cockroach, Pier Makai	BISH 683170	-	-	-	-	DQ628977
	Japão: Okinawa	RYU:A0004	-	-	-	-	AB576007
<i>Lithophyllum johansenii</i>	Nova Zelândia: Ilhas Chatham, Ponto Okawa	NZC0769	-	-	DQ167963/ FJ361408/ FJ361549	-	-
<i>Lithophyllum kotschyanum</i>	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02355	-	HQ423072	-	-	-
	EUA: Havaí, Ilhas do Nordeste Havaiano, Atol de Pearl e Hermes	BISH 683166	-	-	-	-	DQ628975
	Japão: Okinawa	RYU:A0008	-	-	AB576031	-	DQ628974/U62117/ AB576011

	Japão: Okinawa	RYU:A0001	-	-	AB576030	-	
<i>Lithophyllum kotschyannum</i>	Japão: Okinawa	RYU:A0006	-	-	AB576029	-	AB576008
	Japão: Okinawa	RYU:A0007	-	-	-	-	AB576009
	Japão: Okinawa	RYU:A0005	-	-	-	-	AB576010
<i>Lithophyllum cf. kotschyannum</i>	EUA: Havaí, Oahu, Kahala, Hunakai	BISH 699887	-	-	-	-	DQ628976
<i>Lithophyllum margaritae</i>	México: El Pardito-La Ilobera, Ilha de San Jose	GALW:15764	-	-	JQ896235	-	JQ896262
	México: Canal de San Lorenzo, La Paz	GALW:15767	-	-	JQ896253	-	JQ896280
	Brasil: Santa Catarina, Ilha do Arvoredo	FLOR:14571	KP192379	KP192398	-	-	KP192392
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Ilha do Arvoredo	FLOR 14570	KP192378	KP192397	-	-	-
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Ilha do Arvoredo	FLOR 14580	KP192380	-	-	-	KP192392
	Brasil: Santa Catarina, Florianópolis, Ilha do Arvoredo	FLOR 14581	KP192381	-	-	-	KP192391
	Brasil: Santa Catarina, Ilha do Arvoredo	FLOR:14570	-	KP192397	-	-	-
<i>Lithophyllum pustulatum</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Far North, Ponto Henderson	ND639	-	-	FJ361746	-	-
	Nova Zelândia: Ilha do Sul, Baía Golden, Praia Wharariki	NZC0314	-	-	DQ167872/ FJ361749	-	-
<i>Lithophyllum riosmenae</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Northland, Ponto Pihakoa	ND496	-	-	FJ361615	-	-
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Wellington, Ponto Ranger	NZC0864	-	-	DQ167970/ FJ361442/ FJ361446/ FJ361581	-	-
<i>Lithophyllum sp</i>	EUA: Banco de Sackett, offshore Louisiana	LAF4294	-	KJ418418	-	-	-
	EUA: Banco de Sackett, offshore Louisiana	LAF5438	-	KJ418419	KJ418415	KJ652012	-
	EUA: California, Farol do Posto Pigeon	GWS021413	-	KM254959	-	-	-
	França: Bretanha, Finistère, Baía de Brest	GALW:15746	-	-	JQ896238	-	-
	Irlanda: Baía Kingstown	GALW:15745	-	-	-	-	JQ896266
	França: Bretanha, Finistère, Rade de Brest	CPVP-965	-	KC861444	-	-	-
	Irlanda: Galway, Connacht, Baía de Kingstown	CPVP-303	-	KC861445	KC819247	-	-
	Irlanda: Galway, Connacht, Baía de Kingstown	CPVP-302	-	KC861446	KC819246	-	-
	Nova Zelândia: Ilha do Sul, Baía Golden	NZC0491	-	-	DQ167958	-	-
	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Far North, Ponto Hooper/Kapowairua	ND608	-	-	FJ361730	-	-
<i>Lithothamnion sp.</i>	EUA: Havaí, Oahu, Waikiki, Cabeça de diamante de	BISH 689378	-	-	-	-	DQ629010

	Natatorium						
<i>Lithothrix aspergillum</i>	Canadá: Colúmbia Britânica, Ilha de Bath	UBC:A68043	-	-	-	HQ322336	-
	EUA: Califórnia, Condado Orange, Praia de Laguna		-	-	-	-	U61249
	Canadá: Colúmbia Britânica, Lagoa da Ilha Murchison, Gwaii Haanas	GWS013285	-	JQ615865	-	-	-
	Canadá: Colúmbia Britânica, Estação Warden da Ilha Huxley, Gwaii Haanas	GWS013658	-	JQ615866	JQ422236/ JQ422237	-	-
			-	-	JQ917417	-	-
<i>Paulsilvella huveorum</i>	Brasil: Ilha Grande, Rio de Janeiro	SPF57695	KM044013	-	KM044018	KM044023	-
	Brasil: Ilha Grande, Rio de Janeiro	SPF57698	KM044016	-	KM044021	KM044026	KM044031
<i>Pseudolithophyllum muricatum</i>	Canadá: Vancouver, Praia Botanical		-	-	-	AY294373	-
<i>Pseudolithophyllum sp.</i>	Canadá	GWS010093	-	-	JQ422243	-	-
<i>Titanoderma prototypum</i>	EUA: Havaí, Oahu, Kahala, Hunakai	BISH 699820	-	-	-	-	DQ628981
	EUA: Havaí, Honolulu	ARS02351	-	HQ423070	-	-	-
<i>Titanoderma pustulatum</i>	EUA		-	-	-	-	AF093409
<i>Titanoderma sp.</i>	EUA: Banco de Ewing, offshore Louisiana	LAF6557A	-	-	KJ418412	-	-
	EUA: Banco de Ewing, offshore Louisiana	LAF6556A	-	-	-	KJ652013	-
	EUA: Banco de Sackett, offshore Louisiana	LAF6735	-	KJ418416	KJ418413	KJ652016	-
Mastophoroideae			-	-	-	-	-
<i>Hydrolithon gardineri</i>	USA: Havaí, Oahu, Waimanalo, Baía Cockroach, Pier Makai	BISH 683169	-	-	-	-	DQ628993
<i>Hydrolithon pachydermum</i>	EUA		-	-	-	-	AY234235
<i>Hydrolithon reinboldii</i>	EUA: Havaí, Praia de Kahaluu	BISH 699817	-	-	-	-	DQ629003
<i>Hydrolithon onkodes</i>	Japão: Okinawa	RYU:A0011	-	-	AB576037	-	-
<i>Mastophora pacifica</i>	Nova Zelândia: Ilhas Kermadec, Ilha Raoul, Baía Denham	ND130	-	-	FJ361461	-	-
	Japão: Okinawa	RYU:A0017	-	-	-	-	AB576026
<i>Mastophoropsis canaliculata</i>	Austrália: Tasmania, Ponto de Nine Pin	GWS015547	-	-	-	KC134335	-
<i>Metamastophora flabellata</i>	EUA		-	-	-	-	AY234240
<i>Metagoniolithon chara</i>	Austrália: Victoria, Pt. Lonsdale		-	-	-	-	U60743
<i>Neogoniolithon spectabile</i>	EUA		-	-	-	-	AY234238

<i>Pneophyllum conicum</i>	Japão: Okinawa	RYU:A0031	-	-	AB576040	-	-
	Japão: Okinawa	RYU:A0029	-	-	-	-	AB576023
<i>Spongites tunicatus</i>	Nova Zelândia: Ilha do Sul, Baia Golden, Wainui	NZC0510	-	-	DQ167900	-	-
<i>Spongites yendoi</i>	Nova Zelândia: Ilha do Sul, Kaikoura, Recife Oaro	NZC0076	-	-	DQ167988/ FJ361459	-	U60948
HAPALIDIALES			-	-	-	-	-
Melobesioideae			-	-	-	-	-
<i>Clathromorphum reclinatum</i>	Canadá: Colúmbia Britânica, Ilha de Ridley, Prince Rupert	GWS008332	-	-	-	KC134324	-
<i>Lithothamnion glaciale</i>	Canadá: Terra Nova e Labrador, Banco de Maerl, Baia de Bonne	GWS007312	-	-	-	KC134336	-
<i>Mesophyllum erubescens</i>	EUA: Havaí, Lanai, Praia do Naufrágio	BISH 683246	-	-	-	-	DQ629011
	México: Canal San Lorenzo. La Paz	GALW:15773	-	-	-	-	JQ896270
<i>Mesophyllum macroblastum</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Wellington, Praia Makara	NZC0847	-	-	DQ167993	-	-
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Nova Zelândia: Ilha do Norte, Northland, Ponto Pihakoa	ND365	-	-	FJ361577	-	-
<i>Mesophyllum vancouveriense</i>	Canadá: Colúmbia Britânica, Porto Renfrew, Praia Botany	NCU:588185	-	-	-	HQ322337	-
<i>Synarthrophyton patena</i>	Austrália: Victoria, Sul do Pier de Queenscliff	KRD833	-	-	-	KC134328	-
SPOROLITHALES			-	-	-	-	-
Sporolithaceae			-	-	-	-	-
<i>Sporolithon durum</i>	Austrália	Spor	-	-	DQ168023	-	-
<i>Sporolithon ptychoides</i>	EUA: Havaí, Oahu, Praia de Waikiki	BISH 666725	-	-	-	-	DQ629014
<i>Sporolithon sp.</i>	EUA: Havaí, Oahu, Praia de Kawaikui	BISH 699822	-	-	-	-	DQ629015

ANEXO II – Gráficos e outros resultados obtidos pelos métodos de agrupamento (espécies incrustantes)

As espécies de *Lithophyllum* e de *Titanoderma* receberam as seguintes siglas durante as análises:

- i1** – *Lithophyllum atlanticum*
- i2** – *Lithophyllum corallinae*
- i3** – *Titanoderma*
- i4** – *Lithophyllum* sp.1- subgrupo [1]
- i5** – *Lithophyllum* sp.1 - subgrupo [2]
- i6** – *Lithophyllum* sp.2
- i7** – *Lithophyllum* sp. 3
- i8** – *Lithophyllum* sp.4
- i9** – *Titanoderma*
- i10** – *Lithophyllum* cf. *depressum*
- i11** – *Lithophyllum* cf. *margaritae*.

Os resultados serão apresentados para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P) na seguinte ordem:

1. Visualização da similaridade entre espécies através de Neighbor Joining (NJ)
2. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)
3. Statistical Parsimony Network (SPN)
4. Multidimensional Scaling (MDS – 2D)
5. Poisson Tree Process (PTP), Maximum Likelihood flavor.

1. Visualização da similaridade entre espécies através de Neighbor Joining (NJ)

UPA

COI-5P

psbA

rbcL-3P

2. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

(Agrupa as sequências por hipóteses preliminares de espécies, ou *psh* em inglês; cada uma dessas aparece como “Group[1]”, “Group[2]” e assim por diante; os gráficos são fornecidos automaticamente pela ferramenta Web)

UPA

Pmin usado 0.035

Pmax usado 0.055

Initial Partition with prior maximal distance $P=4.97e-02$

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 7 ;id: i10-1006-AB i10-1444-BA i10-2632-TR i10-2633-TR i10-2638-TR i10-2640-TR i10-2641-TR

Group[2] n: 16 ;id: i1-1009-QG i1-1014-QG i1-1016-QG i1-1027-PL i1-1079-RJ i1-1104A-AA i1-1106-AA i1-1140A-IR i1-1232-SP gb|KP192377 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192376 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192375 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192374 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192373 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192372 *Lithophyllum atlanticum* gb|KP192371 *Lithophyllum atlanticum*

Group[3] n: 8 ;id: i2-1011-QG i2-1072-RJ i2-1194-ES i2-1294-AL gb|KP192381 *Lithophyllum margaritae* gb|KP192380 *Lithophyllum margaritae* gb|KP192379 *Lithophyllum margaritae* gb|KP192378 *Lithophyllum margaritae*

Group[4] n: 5 ;id: i5-1204-ES i5-1205-ES i4-1221-ES i4-1491-FN i4-1492-FN

Group[5] n: 1 ;id: i7-1288-AL

Group[6] n: 18 ;id: i8-1303-ES i8-1315-ES i8-1322-ES i8-1328-ES i8-1419-BA i8-1425-BA i8-1426-BA i8-1427-BA i8-1428-BA i8-1429-BA i8-1474-BA i8-1477-FN i8-2589-BA i8-2631-BA i8-2648-FN i8-2649-FN i8-2637-TR i8-2639-TR

Group[7] n: 1 ;id: i3-1415-FN

Group[8] n: 1 ;id: i6-2634-TR

COI-5P

Pmin usado 0.001

Pmax usado 0.120

Initial Partition with prior maximal distance $P=7.05e-02$

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 8 ;id: i1-1009-IQG i1-1079-RJ i1-1157-IArv i1-1232-SP gb|KP192396 Lithophyllum atlanticum BR gb|KP192395 Lithophyllum atlanticum BR gb|KP192394 Lithophyllum atlanticum BR gb|KP192393 Lithophyllum atlanticum BR

Group[2] n: 1 ;id: i2-1072-RJ

Group[3] n: 2 ;id: i5-1204-ES i5-1221-ES

Group[4] n: 1 ;id: i7-1288-AL

Group[5] n: 1 ;id: i8-1315-ES

Group[6] n: 1 ;id: i3-1415-FN

Group[7] n: 6 ;id: i8-1426-BA i8-1427-BA i8-2648-FN i8-2649-FN i8-2637-TR i8-2639-TR

Group[8] n: 1 ;id: i9-2636-TR

Group[9] n: 1 ;id: i10-2638-TR

Group[10] n: 2 ;id: gb|KP192398 Lithophyllum margaritae BR gb|KP192397 Lithophyllum margaritae BR

psbA

Pmin usado 0.001

Pmax usado 0.090

Partition with prior maximal distance P=7.71e-02

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 5 ;id: i2-1072-RJ i2-1294-AL i11-2642-IGde i11-2643-IGde i11-2644-IGde

Group[2] n: 9 ;id: i1-1082-RJ i1-1088-RJ i1-1104-AAIc i1-1106-AAIc i1-1157-IArv i1-1161-SC i4-1204-ES i1-1289-AL i1-2646-IGde

Group[3] n: 3 ;id: i5-1205-ES i4-1221-ES i4-1492-FN

Group[4] n: 1 ;id: i7-1288-AL

Group[5] n: 13 ;id: i8-1303-ES i8-1315-ES i8-1322-ES i8-1425-BA i8-1426-BA i8-1427-BA i8-1428-BA i8-1429-BA i8-1469-FN i8-1477-FN i8-2637-TR i8-2648-FN i8-2649-FN

Group[6] n: 4 ;id: i10-1444-BA i10-2632-TR i10-2633-TR i10-2638-TR

Group[7] n: 1 ;id: i9-2636-T

rbcl-3P

Pmin usado 0.085

Pmax usado 0.155

Initial Partition with prior maximal distance P=1.40e-01

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.000000

Group[1] n: 4 ;id: i10-1006-AB i10-1444-BA(ruim) i10-2633-TR i10-2638-TR

Group[2] n: 7 ;id: i1-1009-IQG i1-1014-IQG i1-1079-RJ i1-1157-IArv i1-1232-SP i1-1289-AL i1-2646-IGde

Group[3] n: 8 ;id: i2-1011-IQG i2-1072-RJ i11-1156-IArv i2-1194-Blnd i2-1292-AL i2-1294-AL i11-2643-IGde i11-2644-IG

Group[4] n: 2 ;id: i7-1288-AL i7-1293-AL

Group[5] n: 15 ;id: i8-1303-ES i8-1315-ES i8-1328-ES i8-1469-FN i8-1425-BA i8-1426-BA i8-1427-BA i8-1428-BA i8-1429-BA i8-1477-FN i8-2537-TR i8-2637-TR i8-2639-TR i8-2648-FN i8-2649-FN

Group[6] n: 1 ;id: i3-1415-FN

Group[7] n: 1 ;id: i9-2636-TR

3. Statistical Parsimony Network (SPN)

(Caixas e círculos ilustram haplótipos; caixas isoladas representam espécies sem variação de haplótipo; caixas e círculos unidos por traços representam, em conjunto, uma mesma hipótese de espécie, e neste caso as caixas seriam o haplótipo ancestral hipotético; os pontos brancos posicionados nestes traços separam, cada um, duas diferenças de composição em par de bases entre os haplótipos)

UPA

COI-5P

psbA

rbcL-3P

4. Multidimensional Scaling (MDS – 2D)

(Visualização da distribuição dos dados no Espaço Euclidiano, a partir das distância euclidianas - ou da similaridade - entre as sequências; cada espécie hipotética está representada por um símbolo distinto)

UPA

COI-5P

psbA

rbcl-3P

(Barras vermelhas unem sequências de uma mesma espécie hipotética; barras azuis separam diferentes espécies hipóteses de espécies)

psbA

rbcl-3P

ANEXO III – Gráficos e outros resultados obtidos pelos métodos de agrupamento (Amphiroa)

As espécies de *Amphiroa* receberam as seguintes siglas durante as análises:

- A1** – *Amphiroa fragilissima* [1]
- A2** – *Amphiroa fragilissima* [2]
- A3** – *Amphiroa fragilissima* [3]
- A4** – *Amphiroa fragilissima* [4]
- A5** – *Amphiroa fragilissima* [5]
- A6** – *Amphiroa fragilissima* [6]
- A7** – *Amphiroa vanbosseae*
- A8** – *Amphiroa rigida*
- A9** – *Amphiroa* sp. 1
- A10** – *Amphiroa* sp. 2
- A11** – *Amphiroa* sp. 3
- A12** – *Amphiroa beauvoisii* [1]
- A13** – *Amphiroa beauvoisii* [2]
- A14** – *Amphiroa beauvoisii* [3]
- A15** – *Amphiroa* sp. 4

Os resultados serão apresentados para os quatro marcadores (UPA, COI-5P, *psbA* e *rbcL*-3P) na seguinte ordem:

1. Visualização da similaridade entre espécies através de Neighbor Joining (NJ)
2. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)
3. Statistical Parsimony Network (SPN)
4. Multidimensional Scaling (MDS – 2D)
5. Poisson Tree Process (PTP), Maximum Likelihood flavor.

1. Visualização da similaridade entre espécies através de Neighbor Joining (NJ)

UPA

COI-5P

psbA

rbcL-3P

2. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

(Agrupa as sequências por hipóteses preliminares de espécies, ou *psh* em inglês; cada uma dessas aparece como “Group[1]”, “Group[2]” e assim por diante; os gráficos são fornecidos automaticamente pela ferramenta Web)

UPA

Pmin usado 0.001

Pmax usado 0.02

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.64e-02$

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 25 ;id: A1-1017-IQG A1-1033-CB A1-1040-CB A1-1199-ES A1-1200-ES A1-1225-ES A1-1254-IBela A1-1297-AL A1-1305-AL A1-1307-AL A1-1314-AL A1-1335-AL A1-1396-BA A1-1399-BA A1-1400-BA A1-1402-BA A1-1403-BA A1-1412-BA A1-1451-BA A1-1453-BA A1-1455-BA A1-1456-BA A1-1457-BA A1-1481-IG A1-1484-IG

Group[2] n: 1 ;id: A2-1489-ML

Group[3] n: 1 ;id: A3-1018-IQG

Group[4] n: 2 ;id: A4-1343-CE A4-2591-BA

Group[5] n: 4 ;id: A5-1096F-RJ A5-1048-RJ A5-1057-RJ A5-1219-ES

Group[6] n: 9 ;id: A6-1120-RJ A6-1304-AL A6-1414-BA A6-1454-BA A6-1458-BA A6-1468-BA A6-1480-IG A6-2534F-BA A6-2534G-BA

Group[7] n: 2 ;id: A7-1432-BA A7-1007-RSG

Group[8] n: 5 ;id: A8-1180-ES A8-1217-ES A8-1223-ES A8-1224-ES A8-1450-BA

Group[9] n: 1 ;id: A9-1345-CE

Group[10] n: 2 ;id: A10-1475-BA A10-2627-BA

Group[11] n: 1 ;id: A11-1096A-RJ

Group[12] n: 13 ;id: A12-1003-SC A12-1058-RJ A12-1095-RJ A12-1124-RJ A12-1178-ES A12-1181-ES A12-1182-ES A12-1183-ES A12-1198-ES A12-1218-ES A12-1226-ES A12-1273-IBela A12-1274-IBela

Group[13] n: 8 ;id: A13-1008-SP A13-1046-RJ A13-1077-RJ A13-1107-AAIc A13-1136-IR A13-1238-SP A13-1263-IBela A13-1266-IBela

Group[14] n: 9 ;id: A14-1023-PL A14-1041-SP A14-1087-AAIc A14-1113-AAIc A14-1129-RJ A14-1152-SC A14-1179-ES A14-1184-ES A14-1227-ES

COI-5P

Pmin usado 0.002

Pmax usado 0.0025

Partition with prior maximal distance $P=2.23e-03$

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.000000

Group[1] n: 3 ;id: A1-1017-IQG A1-1033-ICab A1-1199-ES

Group[2] n: 1 ;id: A3-1018-IQG

Group[3] n: 1 ;id: A4-2591-BA

Group[4] n: 1 ;id: A5-1219-ES

Group[5] n: 1 ;id: A6-1120-RJ

Group[6] n: 1 ;id: A7-1007-RSG

Group[7] n: 3 ;id: A8-1180-ES A8-1223-ES A8-1224-ES

Group[8] n: 1 ;id: A9-1345-CE

Group[9] n: 2 ;id: A10-1475-BA A10-2627-BA

Group[10] n: 1 ;id: A11-1096A-RJ

Group[11] n: 5 ;id: A12-1095-RJ A12-1182-ES A12-1183-ES A12-1218-ES A12-1226-ES

Group[12] n: 4 ;id: A13-1077-RJ A13-1136-IR A13-1144-IXa A13-1238-SP

Group[13] n: 3 ;id: A14-1023-IPal A14-1087-RJ A14-1179-ES

Group[14] n: 1 ;id: A15-2624-BA

Group[15] n: 1 ;id: A14-1041-SP

Group[16] n: 1 ;id: A14-1227-ES

Pmin usado 0.03

Pmax usado 0.07

Initial Partition with prior maximal distance P=4.82e-02

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 12 ;id: A1-1199-ES A1-1017-IQG-corrigida A1-1033-ICab A1-1040-ICab-corrigida A1-1199-ES-corrigida A1-1335-AL A1-1481-IGde-corrigida A1-1484-IGde A1-1400-BA A1-1403-BA A1-1412-BA A2-1489-MA(PML)

Group[2] n: 1 ;id: A3-1018-SP(IQG)

Group[3] n: 1 ;id: A4-2591-BA

Group[4] n: 5 ;id: A5-1048-RJ A5-1219-ES A5-1143-IXa A5-1048-RJ-corrigida A5-1057-RJ

Group[5] n: 5 ;id: A6-1120-RJ A6-1304-AL A6-1468-BA A6-1480-RJ(IGde) A6-2534G-BA

Group[6] n: 2 ;id: A7-1007-RSG A7-1432-BA

Group[7] n: 4 ;id: A8-1180-ES A8-1217-ES A8-1223-ES A8-1224-ES

Group[8] n: 1 ;id: A9-1345-CE

Group[9] n: 2 ;id: A10-1475-BA A10-2627-BA

Group[10] n: 1 ;id: A11-1096A-RJ

Group[11] n: 5 ;id: A12-1095-RJ A12-1181-ES A12-1182-ES A12-1218-ES A12-1226-ES

Group[12] n: 8 ;id: A13-1008-SP-corrigida A13-1144-IXa A13-1077-RJ-corrigida A13-1107-AAlc-corrigida A13-1164-SC A13-1136-IRap-corrigida A13-1046-RJ-corrigida A13-1238-SP

Group[13] n: 4 ;id: A14-1041-SP A14-1129-RJ A14-1179-ES A14-1227-ES

Group[14] n: 1 ;id: A15-2624-BA

rbcl-3P

Pmin 0.001

Pmax 0.99

Partition with prior maximal distance $P=7.23e-02$

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=0.500000

Group[1] n: 4 ;id: A1-1199-BInd 597 bp A1-1451-BA 597 bp A1-1403-BA 597 bp A2-1489-PML 597 bp

Group[2] n: 1 ;id: A3-1018-IQG 597 bp

Group[3] n: 2 ;id: A4-1343-CE 597 bp A4-2591-BA-masomeno 597 bp

Group[4] n: 2 ;id: A5-1143-IXa 597 bp A5-1219-ES 597 bp

Group[5] n: 3 ;id: A6-1468-BA 597 bp A6-1120-RJ 597 bp A6-1480-IGde 597 bp

Group[6] n: 2 ;id: A7-1007-RSG 597 bp A7-1395-BA 597 bp

Group[7] n: 3 ;id: A8-1223-ES 597 bp A8-1224-ES 597 bp A8-1217-ES 597 bp

Group[8] n: 1 ;id: A9-1345-CE 597 bp

Group[9] n: 2 ;id: A10-2627-BA 597 bp A10-1475-BA 597 bp

Group[10] n: 1 ;id: A11-1096-RJ 597 bp

Group[11] n: 1 ;id: A12-1218-ES 597 bp

Group[12] n: 3 ;id: A13-1144-IXa 597 bp A13-1136-IR 597 bp A13-1238-SP 597 bp

Group[13] n: 3 ;id: A14-1179-ES 597 bp A14-1041-SP 597 bp A14-1129-RJ 597 bp

Group[14] n: 1 ;id: A15-2624-BA 597 bp

3. Statistical Parsimony Network (SPN)

(Caixas e círculos ilustram haplótipos; caixas isoladas representam espécies sem variação de haplótipo; caixas e círculos unidos por traços representam, em conjunto, uma mesma hipótese de espécie, e neste caso as caixas seriam o haplótipo ancestral hipotético; os pontos brancos posicionados nestes traços separam, cada um, duas diferenças de composição em par de bases entre os haplótipos)

UPA

COI-5P

psbA

rbcL-3P

(Visualização da distribuição dos dados no Espaço Euclidiano, a partir das distância euclidianas - ou da similaridade - entre as sequências; cada espécie hipotética está representada por um símbolo distinto)

Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

2D Stress: 0,06

MOTU

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Resemblance: D1 Euclidean distance

2D Stress: 0,14

MOTU

Legend:

- 1 (green triangle up)
- 3 (blue triangle down)
- 4 (cyan square)
- 5 (red diamond)
- 6 (magenta circle)
- 7 (black plus)
- 8 (green cross)
- 9 (blue asterisk)
- 10 (orange triangle up)
- 11 (yellow inverted triangle down)
- 12 (cyan square)
- 13 (purple diamond)
- 14 (green circle)
- 15 (blue triangle up)

Sample labels on plot:

- A10-1475-BA
- A10-2627-BA
- A8-1223-ES
- A8-1220-ES
- A3-1018-JOG
- A12-1183-ES
- A12-1188-ES
- A12-1095-RJ
- A11-41024-ES
- A11-41024-ES
- A1-1033-ES
- A15-2624-BA
- A11-1096A-RJ
- A13-1035-BA
- A9-1345-CE
- A2-19-ES
- A4-2591-BA
- A7-1007-RSG
- A6-1120-RJ

psbA

rbcl-3P

5. Poisson Tree Process (PTP), *Maximum Likelihood flavour*

(Barras vermelhas unem seqüências de uma mesma espécie hipotética; barras azuis separam diferentes espécies hipóteses de espécies)

UPA

COI-5P

psbA

rbcL-3P

Para ler ouvindo: <https://open.spotify.com/user/biatorrano/playlist/6SnFQ2Cz2gKPCemLiNIMsY>