Natália Rodrigues Guimarães

**Diversidade do Gênero *Hypnea* (Gigartinales,
Rhodophyta) do Estado de São Paulo Baseada
em Marcadores Moleculares e Morfologia.**

VERSÃO REVISADA

São Paulo

2011

Natália Rodrigues Guimarães

Diversidade do Gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) do Estado de São Paulo Baseada em Marcadores Moleculares e Morfologia.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Cabral de Oliveira

VERSÃO REVISADA

O original desta obra encontra-se disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências-USP

São Paulo

2011

Guimarães, Natália Rodrigues

Diversidade do Gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) do Estado de São Paulo Baseada em Marcadores Moleculares e Morfologia./Natália Rodrigues Guimarães – São Paulo: N.R., 2011. p.: il

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2011.

1. *cox1*, 2.“DNA barcoding”, 3. *Hypnea*, 4. filogenia, 5. *rbcL*, 6. UPA. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título

Comissão Julgadora:

Mutue Toyota Fujii

Prof(a). Dr(a).

Valéria Cassano

Prof(a). Dr(a).

Mariana Cabral de Oliveira

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Aos mestres que me ensinaram o caminho da Ciência:
João Petucco, Ciro César Zanini Branco e Mariana Cabral de Oliveira.
Aos amigos Manu, Fábio e Carol.

**“The sea, once it casts its spell,
holds one in its net of wonder.”**
Jacques Cousteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa cedida ao projeto temático Rhodo-SP (2007/51270-7) e pela bolsa de mestrado (nº 2009/01077-1).

À Professora Mariana Cabral de Oliveira, pela orientação e apoio durante os anos de desenvolvimento do projeto e pelo exemplo de mulher/mãe/pesquisadora que foi para mim.

À Professora Nair Yokoya pela colaboração indispensável para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Instituto de Biociências da USP, em especial ao Departamento de Botânica, pelo programa de pós-graduação.

Aos professores e mestres do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP: Eurico, Estela, Fungyi, Valéria, Lúcia e Salatino; e da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo: Mutuê, Silvia Pitta e Diclá, que, durante o desenvolvimento deste trabalho, se dispuseram inúmeras vezes a me ajudar e incentivar.

Aos técnicos, alunos e funcionários da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Algas Marinhas (LAM) da USP: Rosário Petti, Henrique Lauand e Carolina Franco, pelo apoio e colaboração em todos os momentos da minha pesquisa.

A todos que me ajudaram nas coletas realizadas para que este trabalho pudesse se concretizar.

Aos amigos Fábio e Manu, pelos ensinamentos iniciais de bancada no “LAM”.

Aos “LAMigos” e agregados pela companhia, almoços, amigos secretos, aniversários ... Enfim, pelos momentos de descontração e pela paciência comigo nos últimos dois anos e meio.

À minha família e amigos pelo apoio incondicional e risadas quando mais precisei.

Este trabalho é o resultado de todas essas amizades e todos os ensinamentos que carregarei comigo para as próximas etapas da minha vida.

Muito obrigada!

ÍNDICE

Lista de Tabelas	I
Lista de Figuras	II
I- Resumo	01
II- Abstract	02
1- Introdução	03
1.1- Filo Rhodophyta	03
1.2- O gênero <i>Hypnea</i>	06
1.3- Marcadores moleculares e o Método “DNA barcoding”	10
2.-Objetivos	14
3.-Materiais e Métodos	15
3.1- Coletas	15
3.2- Processamento das amostras	15
3.3- Extração de DNA e amplificação dos marcadores moleculares	21
3.4- Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas	23
3.5- Submissão de sequências nos bancos de dados	26
4 -Resultados	26
4.1- Marcadores moleculares	26
4.2- Análises Filogenéticas	31
4.3- Morfologia	38
5- Discussão	55
5.1- Marcadores Moleculares e Filogenia	55
5.2- <i>H.cervicornis</i> X <i>H.spinella</i>	58
5.3- <i>H.musciformis</i> X <i>H.nigrescens</i>	60
5.4- <i>Hypnea flexicaulis</i>	61
5.5- <i>Hypnea</i> sp1 e <i>Hypnea</i> sp2	62
6- Conclusão	63
Referências	65
ANEXOS	71

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pg
Tabela 1. Espécies do gênero <i>Hypnea</i> citadas para região do Atlântico (modificada de Lúcio, 2006).....	08
Tabela 2. Espécies e sinônimas das espécies de <i>Hypnea</i> referidas para o Brasil.	09
Tabela 3. Espécies do gênero <i>Hypnea</i> citadas por diferentes autores para o estado de São Paulo e/ou para o Brasil. "X" representa as espécies presentes e "0" representa as não presentes segundo a fonte citada. [] indicam sinônimas.	10
Tabela 4. Marcadores moleculares usados no gênero <i>Hypnea</i> , com sequências depositadas no GenBank e suas referências.	14
Tabela 5. Listagem das amostras de <i>Hypnea</i> (numeradas de acordo com o projeto Rhodo-SP) e dados da coleta.	17-20
Tabela 6. Caracteres morfológicos utilizados nas análises morfológicas das espécies de <i>Hypnea</i> (baseado em Masuda, 1997 e Lúcio, 2009).	21
Tabela 7. "Primers" para PCR e sequenciamento para os diferentes marcadores moleculares. Nos primers do marcador <i>rbcL</i> , r = A ou G; y = C ou T; w = A ou T.	22
Tabela 8. Sequências do marcador <i>cox1</i> obtidas do GenBank utilizadas nas análises.	24
Tabela 9. Sequências do marcador <i>rbcL</i> do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas.	25
Tabela 10. Espécies do gênero <i>Hypnea</i> analisadas neste trabalho agrupadas de acordo com as sequências obtidas para o marcador <i>cox1</i> . Número das amostras de acordo com a Tabela 5.	27
Tabela 11. Porcentagem de identidade (no triângulo da porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior em negrito) entre as sequências do <i>cox1</i> as espécies e haplótipos estudados do gênero <i>Hypnea</i> . <i>H. musciformis</i> : IBC0098, IBC0138, IBC0188; <i>H. cervicornis</i> : BOT004, IBC0028, IBC0186, IBC0194, IBC0200; <i>H. spinella</i> : IBC0041; <i>H. flexicaulis</i> : IBC0190; <i>H.sp1</i> : IBC0212; <i>H.sp2</i> : BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.	28
Tabela 12. Porcentagem de identidade (no triângulo inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior) entre as sequências do UPA dos espécimes estudados do gênero <i>Hypnea</i> . <i>H. cervicornis</i> : IBC0028, IBC0064 e IBC0247; <i>H. musciformis</i> : IBC0040, IBC0098 e IBC0185; <i>H. spinella</i> : IBC0129; <i>H. flexicaulis</i> : IBC0190; <i>H.sp1</i> : IBC0212; <i>H.sp2</i> : BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.	29
Tabela 13. Porcentagem de identidade (no triângulo inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior em negrito) entre as sequências de <i>rbcL</i> dos espécimes estudados do gênero <i>Hypnea</i> . <i>H. cervicornis</i> : IBC0028, IBC0064, IBC0245; <i>H. musciformis</i> : IBC0040, IBC0098, IBC0185; <i>H. spinella</i> : IBC0129; <i>H. flexicaulis</i> : IBC0190; <i>H.sp1</i> : IBC0212; <i>H.sp2</i> : BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.	30
Tabela 14. . Divergências interespecíficas e intraespecíficas para os marcadores <i>cox1</i> , UPA e <i>rbcL</i> entre as amostras do gênero <i>Hypnea</i> sequenciadas para este estudo.	37
Tabela 15. Características morfológicas das espécies do gênero <i>Hypnea</i> analisadas neste trabalho.	53
Tabela 16. Amostras identificadas pelo número de projeto (NºRhodo-SP), indicando local de coleta e número do voucher depositado nos herbários SP ou SPF. ** indicam voucher não localizados.	54-55
Tabela 17. Comparação entre divergências inter e intraespecíficas com espécies do gênero <i>Hypnea</i> e para Rhodophyta em geral. Sublinhados os valores obtidos utilizando somente as amostras deste estudo.	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pg
Figura 1. Composição de táxons de Rhodophyta (a), Florideophyceae (b) e Gigartinales (c). Árvores a e b modificadas, respectivamente, de Yoon <i>et al.</i> (2006) e Tree of Life (http://tolweb.org/Florideophyceae/21781) e lista de famílias de Gigartinales s.s. (c) retirada de Saunders (2004).	05
Figura 2. Ciclos para PCR dos três marcadores utilizados neste trabalho retirados, de a) Freshwater <i>et al.</i> (1994), b) Saunders (2005) e c) Sherwood & Presting (2007).	23
Figura 3. Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências de <i>cox1</i> obtidas de espécies do gênero <i>Hypnea</i> ; a sequência de <i>Chondracanthus teedi</i> foi utilizada como grupo externo. Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap de duas matrizes analisadas. Apenas valores maiores do que 0,62 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso e localidade geográfica. As amostras de São Paulo estão destacadas em negrito.	32
Figura 4. Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA, mostrando o agrupamento de espécies do gênero <i>Hypnea</i> . Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap. Apenas valores maiores do que 70 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso. As amostras de São Paulo estão destacadas em negrito.	34
Figura 5. Análise Bayesiana (MB) de sequências de <i>rbcL</i> mostrando as relações filogenéticas de espécies do gênero <i>Hypnea</i> . Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap para análise de Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parsimônia (MP) - NJ/MP. As probabilidades <i>a posteriori</i> (<i>pp</i>) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda da figura. Apenas valores maiores do que 0,70 ou 70 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso. As amostras de São Paulo estão destacadas em negrito.	36
Figura 6 – 13. Pranchas de fotos de <i>Hypnea cervicornis</i>	40
Figura 14 – 17. Pranchas de fotos de <i>Hypnea flexicaulis</i>	43
Figura 18 – 23. Pranchas de fotos de <i>Hypnea musciformis</i>	46
Figura 24 – 29. Pranchas de fotos de <i>Hypnea spinella</i>	48
Figura 30 – 34. Pranchas de fotos de <i>Hypnea</i> sp. 1	50
Figura 35 – 39. Pranchas de fotos de <i>Hypnea</i> sp. 2	52
ANEXO I. Matriz de sequências de <i>cox1</i> das espécies de <i>Hypnea</i> sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5	71
ANEXO II. Matriz de sequências de UPA das espécies de <i>Hypnea</i> sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5	82
ANEXO III. Matriz de sequências de <i>rbcL</i> das espécies de <i>Hypnea</i> sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5	84
ANEXO IV. Matriz de identidade do marcador <i>cox1</i> das sequências obtidas neste e estudo e das sequências retiradas do banco de dados. Amostras numeradas de acordo com as Tabelas 5, 8 e 9	90
ANEXO V. Matriz de identidade do marcador <i>rbcL1</i> das sequências obtidas neste e estudo e das sequências retiradas do banco de dados. Amostras numeradas de acordo com as Tabelas 5, 8 e 9	91-93

I. RESUMO

O gênero *Hypnea* J.V. Lamouroux (1813) (Cystocloniaceae, Gigartinales), com cerca de 67 espécies descritas, apresenta ampla distribuição geográfica pelas costas marinhas de águas quentes ao redor do mundo. Algumas espécies de *Hypnea* são usadas para a produção de carragenanas, hidrocolóides de grande importância na indústria atual. A taxonomia do gênero é bastante problemática e a identificação das espécies é complicada devido a uma morfologia relativamente simples que muitas vezes é influenciada pelas condições do habitat onde se encontram. Apesar das revisões regionais já realizadas, o número certo de espécies e o *status* de algumas delas permanece em dúvida. Estudos moleculares já foram realizados com o gênero *Hypnea* principalmente para região da Ásia. A técnica do “DNA barcoding” tem sido testada em Rhodophyta com sucesso para identificação rápida de espécies, utilizando a região 5’ do gene mitocondrial da citocromo *c* oxidase subunidade I, o marcador *cox1*. Outro marcador recentemente testado como “DNA barcode” é o domínio V do gene plastidial 23S, o marcador UPA. Além destes, o marcador plastidial *rbcL* tem sido utilizado como ferramenta para estudos filogenéticos do gênero *Hypnea*. No presente trabalho, foram sequenciadas para o marcador *cox1*, 49 amostras provenientes do litoral do estado de São Paulo, uma amostra proveniente do estado do Rio de Janeiro e cinco amostras mantidas em cultura provenientes dos litorais dos estados de São Paulo e Espírito Santo. Foram identificados seis grupos taxonômicos diferentes segundo o marcador *cox1*. Representantes de cada um desses grupos foram sequenciados para os marcadores UPA e *rbcL*. A divergência interespecífica encontrada entre as amostras sequenciadas neste estudo para o marcador *cox1* foi 62 – 100 pb (10,1 - 16,3%); para o marcador UPA foi 9 – 16 pb (2,5-4,4%) e para o marcador *rbcL* foi 42 – 88 pb (3,2 – 6,7%). As divergências intraespecíficas das amostras obtidas neste estudo foram, 0 – 5 pb (0 - 0,9 %) para o marcador *cox1*, 0 – 1 pb (0 – 0,3%) para o marcador UPA e 0 – 6 pb (0 – 0,5%) para o marcador *rbcL*. As divergências observadas corroboram a existência de seis entidades taxonômicas diferentes. Após análise da morfologia e comparação com sequências disponíveis no GenBank as espécies do gênero *Hypnea* foram nomeadas como: *H. cervicornis*, *H. flexicaulis*, *H. musciformis*, *H. spinella*, *Hypnea* sp.1 e *Hypnea* sp.2. Sendo a espécie *Hypnea flexicaulis* a primeira citação para o Oceano Atlântico. Baseado nos estudos moleculares e morfológicos, concluímos que a espécie *H. nigrescens*, anteriormente citada para o Estado de São Paulo, é na verdade uma variação morfológica de *H. musciformis*. Ainda, concluímos que as espécies de *H. cervicornis* e *H. spinella* não devem ser colocadas em sinonímia uma vez que suas características morfológicas e as diferenças nas sequências obtidas através dos três marcadores utilizados mostram que são duas espécies distintas.

II. ABSTRACT

The genus J.V. Lamouroux (1813) (Cystocloniaceae, Gigartinales), comprises 67 described species, has a wide geographical distribution on the tropical shores around the world. Some species of *Hypnea* are used for the production of carrageenan, hydrocolloids of great importance in today's industry. The taxonomy of the genus is very problematic and *Hypnea* species identification is complicated by a relatively simple morphology that is often influenced by the conditions of the habitat. Although some regional reviews have been carried out, the right number of species and the status of some species remain in doubt. Molecular studies have been carried out mainly dealing with species from Asia. The technique of "DNA barcoding" has been successfully tested in Rhodophyta for rapid identification of species using the 5' region of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I, the marker *cox1*. Recently, another marker tested as "DNA barcode" is the domain V of the plastidial 23S gene, the marker UPA. In addition, the plastidial marker *rbcL* has been used as a tool for phylogenetic studies of the genus *Hypnea*. In this study, were sequenced for the marker *cox1*, 49 samples from the coast of São Paulo State, a sample from the State of Rio de Janeiro and five samples maintained in culture from the coastal states from the States of São Paulo and Espírito Santo. We identified six different taxonomic groups according to the marker *cox1*. Representatives of each of these groups were sequenced for the UPA and *rbcL* markers. The divergence found among the *cox1* sequences in this study was from 62 to 100 bp (10.1 - 16.3%), for the UPA marker was from 9 to 16 bp (2.5 to 4.4%), and for the *rbcL* marker was 42 to 88 bp (3.2 - 6.7%). The intraspecific divergences for the samples sequenced in this study were 0-5 bp (0 - 0.9%) for the *cox1*, 0-1 bp (0 - 0.3%) for the UPA and 0-6 bp (0 - 0.5%) for the *rbcL*. The observed divergences for the three molecular markers confirm the existence of six different taxonomic entities. After analysis of the morphology and comparison with sequences available in GenBank for the genus *Hypnea* these taxonomic entities were named as: *H. cervicornis*, *H. flexicaulis*, *H. musciformis*, *H. spinella*, *Hypnea* sp. 1 and sp2. As the species *Hypnea flexicaulis* this is the first citation to the Atlantic Ocean. Based on morphological and molecular studies, we conclude that the species *H. nigrescens*, quoted earlier for the State of São Paulo, is actually a morphological variation of *H. musciformis*. Still, we conclude that the species *H. cervicornis* and *H. spinella* should not be placed in synonymy since its morphological characteristics and differences in the sequences obtained from the three molecular markers show that they are two distinct species.

1- Introdução

1.1- Filo Rhodophyta

As algas vermelhas (Rhodophyta), macro e microalgas, estão distribuídas em ambientes continentais e marinhos, de regiões tropicais a polares. O Filo Rhodophyta forma uma das principais linhagens monofiléticas dentro dos eucariotos e apresenta caracteres químicos, ultra-estruturais e reprodutivos que as separam de outros grupos de algas (Ragan *et al.* 1994, Freshwater *et al.* 1994). Os organismos deste filo possuem clorofila *a* e pigmentos acessórios, aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina na forma de ficobilissomas, localizados em tilacóides não empilhados, assim como pigmentos fotoprotetores, os carotenóides; não possuem flagelos ou centríolos em nenhuma fase de seu ciclo de vida; produzem o amido das florídeas, depositado no citoplasma (Garbary & Gabrielson 1990, Graham & Wilcox 2009). Acredita-se, ainda, que o ancestral comum das algas vermelhas, verdes e glaucófitas sofreu um evento de endossimbiose primária com uma cianobactéria (Bhattacharya & Medlin 1995, Delwiche *et al.* 1995, Cavalier-Smith 1998, McFadden 1999, Bhattacharya *et al.* 2004, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005) originando o plastídeo desse grupo, que é envolvido por duas membranas.

Assim como as outras algas, as Rhodophyta possuem um importante papel na produção primária, como fonte de alimento, produção de oxigênio e nos ciclos de carbono e nitrogênio na natureza (Graham & Wilcox 2009). As Rhodophyta, no contexto da vida moderna, apresentam grande importância econômica, principalmente na indústria de alimentos e na indústria química. Algumas espécies de algas vermelhas são cultivadas como fonte de alimento (*i.e.* *Porphyra* C.Agardh) ou para extração de hidrocolóides como o ágar-ágar e as carragenanas (*i.e.* *Gracilaria* Greville e *Kappaphycus* Doty, respectivamente) que são imprescindíveis para certas aplicações tecnológicas e industriais (Crichley & Ohno 1998).

As Rhodophyta representam mais de 60% das espécies de macroalgas presentes no ambiente marinho (Norton *et al.* 1996), sendo o filo mais diverso entre as algas bentônicas. Segundo Graham & Wilcox (2009), são estimados de 500 a 600 gêneros e pouco mais de 6000 espécies de algas vermelhas, e acredita-se que o número de espécies possa chegar a 20.000 (Norton *et al.* 1996), devido às recentes descobertas de espécies crípticas.

No Brasil, as Rhodophyta são representadas, segundo Horta *et al.* (2001) por 388 espécies dentro das 643 espécies de macroalgas marinhas conhecidas no país

(<http://www.ib.usp.br/algaemaris/AlgaemarisBrasilis.html>) e, recentemente, Fujii *et al.* (2008) afirmam que existe um total de 482 táxons infragenéricos de Rhodophyta dentre os 774 conhecidos para o Brasil.

O filo Rhodophyta era tradicionalmente dividido em duas classes ou subclasses: Florideophycidae e Bangiophycidae (Garbary & Gabrielson 1990). Recentemente a classificação do grupo tem sofrido revisões. Saunders & Hommersand (2004) propuseram o subreino Rhodoplantae, com dois filios: Cyanidiophyta e Rhodophyta. Yoon *et al.* (2006) propuseram, baseado em resultado de múltiplos marcadores moleculares, que existem sete linhagens de Rhodophyta, que devem ser reconhecidas como classes (Fig.1a). Afirma, ainda, que a criação de um subreino e dois filios não é necessária, já que as Cyanidiophyta compartilham muitas características com as Rhodophyta. Assim, baseado no fato de que as Cyanidiophyceae divergiram primeiramente na evolução das algas vermelhas e são separadas das outras linhagens, foi proposta a criação de um subfilo, Cyanidiophytina, e do subfilo Rhodophytina, agrupando todas as outras linhagens de algas vermelhas. Rhodophytina, nessa classificação, contém seis classes: Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae, e Stylonematophyceae, sendo Bangiophyceae e Florideophyceae mais proximamente relacionadas, formando um grupo monofilético (Yoon *et al.* 2006).

A classe Florideophyceae inclui, aproximadamente, 6000 espécies, cerca de 99% das espécies conhecidas (Graham & Wilcox 2009), que foram divididas, segundo Le Gall & Saunders (2007) em cinco subclasses: Hildenbrandiophycidae, Nemaliophycidae, Corallinophycidae, Rhodimeniophycidae e Ahnfeltiophycidae. Conforme o autor, o número de ordens na classe varia de 16 (Yoon *et al.* 2006) a 23 (Le Gall & Saunders 2007) (Fig. 1b).

Os membros da classe Florideophyceae crescem por meio de células apicais e consistem inteiramente de filamentos ramificados nos quais as células estão ligadas por “pit-connections”, que são conexões estruturais entre células adjacentes (Graham & Wilcox 2009). Tradicionalmente, as Florideophycidae foram classificadas em ordens e famílias com base no ciclo de vida e modo de reprodução sexuada. A constituição química da parede celular (ágar ou carragenana) também é uma característica determinante na caracterização de algumas ordens de algas vermelhas (Freshwater *et al.* 1994).

Entre as ordens de Florideophyceae, a ordem Gigartinales proposta, em 1892 por Schmitz, é uma das principais (Saunders *et al.* 2004). Kylin (1956) sugeriu a união das ordens Gigartinales e Cryptonemiales, que foi validada posteriormente por Kraft & Robins (1985). Assim, a ordem Gigartinales *sensu lato* (s.l.) passou a ter

aproximadamente 40 famílias. Trabalhos em relação à morfologia e anatomia deste grupo (Pueschel & Cole 1982, Silva & Johansen 1986, Fredericq & Hommersand 1989, Maggs & Pueschel 1989), assim como o posterior uso de ferramentas moleculares (Freshwater *et al.* 1994; Saunders & Kraft 1994,1996,2002; Harper & Saunders 2001), reduziram a heterogeneidade da ordem, tendo grande impacto no entendimento da composição e das relações entre os membros das Gigartinales (Saunders *et al.* 2004). Saunders *et al.* (2004), além de elucidar todas as mudanças pelas quais as Gigartinales já haviam passado, apresentou um estudo com membros das 40 famílias então incluídas na ordem, delineando Gigartinales *sensu stricto* (s.s.) , com 29 famílias, baseado em relações inferidas a partir do uso de um marcador molecular (Fig. 1c).

Figura 1. Composição de táxons de Rhodophyta (a), Florideophyceae (b) e Gigartinales (c). Árvores a e b foram modificadas, respectivamente, de Yoon *et al.* (2006) e Tree of Life (<http://tolweb.org/Florideophyceae/21781>) e lista de famílias de Gigartinales s.s. (c) retirada de Saunders (2004).

A família Cystocloniaceae, dentro de Gigartinales s.l., era formada pelos gêneros: *Hypnea* J.V. Lamouroux (1813), *Hypneocolax* Boergesen e *Rhodoatilis* J.Agardh. Kylin (1930) acrescentou *Calliblepharis* na família Hypneaceae e então em 1932 moveu *Calliblepharis* para as Cystocloniaceae, distinguindo essa família de Hypneaceae baseado em análises morfológicas do carposporângio. Min-Thein e Womersley (1976) questionaram essa mudança, observando que outros aspectos vegetativos e reprodutivos eram virtualmente idênticos nos dois grupos.

Em 2004, Saunders *et al.* propõe a união das famílias Hypneaceae (incluindo os gêneros *Hypnea* e *Hypneocolax*) e Cystocloniaceae, baseado em resultados de marcadores moleculares obtidos por Fredericq *et al.* (1996a) (Fig.1c).

1.2- O gênero *Hypnea*

O gênero *Hypnea* foi estabelecido por Lamouroux (1813) baseado em seis espécies, sendo sua espécie tipo, *H. musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux (Kylin 1930, Papenfuss 1968), que recebeu esse nome por sua semelhança com um musgo *Hypnum* Linné (Lúcio 2006 e Geraldino *et al.* 2010). O gênero *Hypnea* possui cerca de 67 espécies descritas (Geraldino *et al.* 2010) que variam no tamanho do talo de pequenos (menor do que 3 cm) a grandes (maior do que 50 cm) e se encontram distribuídas nas costas tropicais e subtropicais do mundo (Geraldino *et al.* 2009).

O gênero *Hypnea* é bastante conhecido dentro da família Cystocloniaceae (Saunders *et al.* 2004), ordem Gigartinales, por sua ampla distribuição geográfica, elevado número de espécies e importância econômica. O gênero é caracterizado por um talo cilíndrico a achatado, com muitas ramificações, ramos laterais curtos, cistocarpos globulares, e tetrasporângios zonados (Lamouroux 1813, Mshigeni 1978a, Womersley 1994). Depois do trabalho de Lamouroux (1813), muitas espécies foram descritas. J. Agardh (1852) descreveu 19 espécies e classificou-as em três sessões com base do hábito do talo: *Virgatae*, *Spinuligeræ* e *Pulvinatæ*. Apesar de alguns ficólogos terem aceitado e seguido essa divisão, atualmente ela não é reconhecida (e.g. Mshigeni 1978 a, b; Masuda *et al.* 1997; Geraldino *et al.* 2010).

Algumas espécies de *Hypnea* são usadas como alimento e como matéria prima para a produção de carragenanas (Greer *et al.* 1984), um hidrocolóide que apresenta uma grande importância na indústria de alimentos e cosmética. Contrário ao que era afirmado sobre a família Hypneaceae, que esta produzia somente K-carragenana (cf. Chiovitti *et al.* 1998 e referências neste citadas), hoje sabe-se que os dois tipos de carragenanas, L- carragenana e K-carragenana, coexistem em muitas espécies de *Hypnea* (Greer *et al.* 1984; Knutsen *et al.* 1995).

Devido a esse interesse econômico, estudos de maricultura para espécies de *Hypnea* já foram realizados no Brasil (Berchez & Oliveira 1989; Reis *et al.* 2006). Além de estudos de maricultura, outros estudos abordando aspectos fisiológicos, bioquímicos (Schenkman 1980; Saito & Oliveira 1990; Bravin & Yoneshigui-Valentin

2002) e biogeográficos (Haroun & Prud'Homme van Reine 1993; Hommersand & Fredericq 2003) já foram realizados com o gênero.

Schenkman (1980) estudou, entre outros fatores, a fenologia e o crescimento em diferentes condições de maricultura de *Hypnea musciformis*. Em seu trabalho de 1986, aprofundou o estudo em relação à frequência da fase tetrasporofítica e gametofítica e à ausência de plantas masculinas na natureza. Estudou os aspectos de reprodução em condições de laboratório e tentou esclarecer as dúvidas taxonômicas e o número de espécies existentes do Estado de São Paulo. Em sua discussão, Schenkman (1986) concluiu que algumas dificuldades taxonômicas do grupo são evidentes, como a plasticidade fenotípica, causando confusão na identificação das espécies, as quais são separadas por diferenças tênues.

Apesar da importância do gênero, sua taxonomia é bastante problemática e confusa. Isabella Abbot, em sua introdução para a revisão de Masuda *et al.* (1997) faz comentários sobre as dificuldades de trabalho com o gênero. Por ter uma distribuição cosmopolita e exibir uma variação morfológica muito grande, muitas vezes influenciada pelas condições do habitat onde se encontram, existe uma dificuldade na discriminação das espécies (Geraldino *et al.* 2010). Ainda, a não uniformidade das descrições das espécies do gênero causam mais confusão taxonômica (Yamagishi & Masuda 2000) e o status de algumas espécies descritas no século 19 ainda não está bem estabelecido, o que, assim como as diferentes descrições já feitas, podem levar a erros classificatórios (Masuda *et al.* 1997). Por fim, não está estabelecido o real valor taxonômico dos caracteres morfológicos utilizados na identificação das espécies (Masuda *et al.* 1997).

A Tabela 1 mostra algumas revisões realizadas para o gênero *Hypnea* para o Oceano Atlântico.

Tabela 1. Espécies do gênero *Hypnea* citadas para região do Atlântico (modificada de Lúcio, 2006)

Mshigeni & Chapman (1994): para o Oceano Atlântico	Littler & Littler (2000): para o Caribe e costas temperadas do Atlântico Americano	John et al. (2004): para zonas ocidentais da África	Creed et al. (2010): para o Barsil	Wynne (2011): Atlântico tropical e subtropical
<i>H. alopecuroides</i> Kützinger 1868	<i>H. musciformis</i>	<i>H. arbuscula</i>	<i>H. cenomyce</i>	<i>H. cenomyce</i>
<i>H. arbuscula</i> P. Dangeard 1952	<i>H. spinella</i>	<i>H. cenomyce</i>	<i>H. cornuta</i>	<i>H. cervicornis</i>
<i>H. cenomyce</i> J. Agardh 1851	<i>H. valentiae</i>	<i>H. ceramioides</i>	<i>H. musciformis</i>	<i>H. cornuta</i>
<i>H. ceramioides</i> Kützinger 1849		<i>H. divaricata</i> (C.Agardh) Greville 1870	<i>H. nigrescens</i>	<i>H. krugiana</i> Hauck 1888
<i>H. cervicornis</i> J. Agardh 1851		<i>H. eckloni</i> Suhr 1836	<i>H. spinella</i>	<i>H. musciformis</i>
<i>H. cornuta</i> (Kützinger) J. Agardh 1851		<i>H. flagelliformis</i>	<i>H. valentiae</i>	<i>H. nigrescens</i>
<i>H. flagelliformis</i> Greville ex J. Agardh 1851		<i>H. musciformis</i>	<i>H. volubilis</i> (Searles)	<i>H. spinella</i>
<i>H. hamulosa</i> (Esper) J.V. Lamouroux 1913		<i>H. pannosa</i>		<i>H. valentiae</i>
<i>H. musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamouroux 1813		<i>H. setacea</i> Kützinger 1847		<i>H. volubilis</i> Searles in C.W. Schneider & Searles 1976
<i>H. pannosa</i> J. Agardh 1847		<i>H. spicifera</i> (Suhr) Harvey 1938		
<i>H. spinella</i> (C. Agardh) Kützinger 1847		<i>H. spinella</i>		
<i>H. valentiae</i> (Turner) Montagne 1841		<i>H. tenuis</i> Kylin 1938		
		<i>H. unilateralis</i> P. Dangeard 1952		
		<i>H. valentiae</i>		

No Brasil são referidas oito espécies de *Hypnea* (<http://www.ib.usp.br/algaemaris/algaemarisbrasilis.html>; Schenkman 1986, Guimarães 2006 e Creed 2010), listadas na Tabela 2. Sendo que para o Estado de São Paulo o número de espécies citadas permanece em dúvida, como comentado abaixo.

Tabela 2. Espécies e sinonímias de *Hypnea* referidas para o Brasil.

Espécie	Localidade tipo *	Sinonímia
<i>Hypnea cenomyce</i>	Costa da Holanda	
<i>Hypnea cervicornis</i>	Ilhas Maurício	
<i>Hypnea cornuta</i>	Costa de Nova Guiné	
<i>Hypnea musciformis</i>	Trieste, Italia	<i>Hypnea arborescens</i>
<i>Hypnea nigrescens</i>	Índia	
<i>Hypnea spinella</i>	"Indiae occidentalis"	<i>Hypnea cervicornis</i>
<i>Hypnea valentiae</i>	Mar Vermelho	<i>Hypnea gracilarioides</i>
<i>Hypnea volubilis</i>		

*fonte: algaebase

Em seu trabalho de 1993, Haroun & Prud'Homme van Reine sugeriram que as espécies *Hypnea cervicornis* (J. Agardh) e *Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützting fossem colocadas em sinonímia, pois, baseado em caracteres morfológicos, foram encontradas formas intermediárias entre essas duas espécies. Sendo então a *H. cervicornis* uma forma presente em habitat mais calmo e submerso, enquanto que *H. spinella* seria a forma da espécie encontrada em um habitat com maior hidrodinamismo, ação das ondas e marés. A espécie foi então designada *H. spinella* (C. Agardh) Kützting devido à prioridade de publicação. Porém, alguns autores (Abbott 1999) não aceitaram a proposta e continuam a separar as espécies *H. spinella* e *H. cervicornis*. No Brasil, Guimarães (2006) mantém a separação das espécies, baseado no fato de seus talos apresentarem morfologias distintas. Na revisão realizada por Wynne em 2011, como citado acima, para o Atlântico tropical e subtropical essa sinonímia não é aceita, baseado em Guimarães (2006).

Ainda, a presença de *Hypnea nigrescens* no litoral do estado de São Paulo possui apenas uma citação, Schenkman (1986). E para o Brasil, uma citação é feita por Guimarães (2006). Na revisão feita por Wynne (2011) para o Atlântico tropical e subtropical a espécie é citada como presente para essa região.

A presença das espécies acima citadas fica, portanto, mais difícil de ser definida para o estado de São Paulo. A Tabela 3 mostra algumas referências de citações para espécies do estado de São Paulo e para o Brasil.

Tabela 3. Espécies do gênero *Hypnea* citadas por diferentes autores para o estado de São Paulo e/ou para o Brasil. “X” representa as espécies presentes e “0” representa as não presentes segundo a fonte citada. [] indica sinônimos.

Espécies	São Paulo		Brasil	
Fonte	Schenkman (1986)	Algaemaris ¹ (2007)	Algaebase ²	Lúcio (2006)
<i>Hypnea cenomyce</i>	0	0	X	0
<i>H. cervicornis</i>	X	0	0	0
<i>H.cornuta</i> J.Agardh	X	0	X	0
<i>H. nigrescens</i>	X	0	X	X
<i>H.musciformis</i>	X	X [<i>H.arborescens</i>]	X	X
<i>H. spinella</i>	X	X [<i>H.cervicornis</i>]	X [<i>H.cervicornis</i>]	X
<i>H. valentiae</i>	X	X [<i>H.gracilarioides</i>]	X	0
<i>H. volubilis</i>	0	0	X	0

1- <http://www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/algaemarisbrasilis.html>; 2- <http://www.algaebase.org>

A difícil identificação a nível específico somada à falta de precisão e certeza das descrições e localidades tipo encontradas na literatura, faz das espécies de *Hypnea* alvo potencial de estudos moleculares que possam auxiliar na resolução de dúvidas taxonômicas.

1.3- Marcadores moleculares e o Método “DNA barcoding”

As Rhodophyta possuem muitas espécies não descritas, e o exato número destas ainda é uma dúvida. Isso ocorre, porque a morfologia dessas algas pode ser muito variável, dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes. Sua morfologia ainda pode ser convergente e muito influenciada pelo habitat, o que leva a ocorrência de espécies crípticas. A identificação morfológica também pode ser ainda mais

dificultada, pois o ciclo de vida dessas algas é complexo e muitas vezes as fases são morfologicamente distintas e são confundidas e descritas como espécies e até gêneros diferentes (Robba *et al.* 2006).

Na década de 1980, com intuito de auxiliar na resolução desses problemas taxonômicos, técnicas moleculares foram adotadas nos estudos das algas vermelhas e, utilizadas em conjunto com a morfologia e cultura, permitiram a distinção de espécies e avanços no entendimento de suas relações filogenéticas (Robba *et al.* 2006). Pesquisadores têm utilizado cada vez mais essas ferramentas moleculares para auxílio na taxonomia e biogeografia dessas algas.

Nas Rhodophyta, diferentes regiões têm sido utilizadas como marcadores moleculares, principalmente os genes nucleares que codificam para os RNAs ribossomais (rRNA) (“small subunit rRNA gene” - SSU rDNA e “large subunit rRNA gene”-LSU rDNA) e o espaçador dos genes ribossomais (“internal transcribed spacer” – ITS) (Tai *et al.* 2001; Ross *et al.* 2003); o gene do cloroplasto que codifica a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) (Hughey *et al.* 2001); e a região espaçadora dos genes mitocondriais para a citocromo oxidase subunidades 2 e 3, *cox2-3* (Zucarello *et al.* 1999).

Enquanto que nas algas verdes (Chlorophyta) e plantas terrestres o gene *rbcL* está localizado no cloroplasto e o gene que codifica a subunidade pequena (*rbcS*) está localizado no núcleo, nas algas vermelhas e nas algas cromófitas (Heterokontophyta) ambos os genes (*rbcL* e *rbcS*) estão no cloroplasto (Hagopian *et al.* 2004). Nas Rhodophyta os dois genes são separados por uma pequena região espaçadora (espaçador *rbcL-S*), que devido a uma maior variabilidade é empregada em análises de isolados de diferentes regiões biogeográficas ou em identificações de espécies de algas (Maggs *et al.* 1992, Goff *et al.* 1994, Zuccarello & West 1997). O gene *rbcL* é também amplamente utilizado para filogenia e identificação de espécies em diferentes grupos de algas vermelhas.

O rápido desenvolvimento das tecnologias computacionais e de sequenciamento de DNA têm transformado essas informações na maior fonte de dados para a compreensão e avanço no entendimento das relações genéticas e evolutivas (Hajibabaei *et al.* 2007) para estudos de biodiversidade e das interrelações dos diversos grupos de organismos.

As sequências de marcadores moleculares que permitem a identificação de espécies têm sido denominadas de “DNA barcodes”, em analogia ao sistema de código de barras usado em produtos manufaturados (Stoeckle 2003). A técnica de “DNA barcoding” é baseada na amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

de um seguimento de DNA relativamente curto (~400-700 pb) que pode ser inteiramente sequenciado com os mesmos dois “primers” usados na PCR.

Essa técnica encontra-se entre os estudos filogenéticos e os estudos populacionais. Enquanto estes estudam, respectivamente, as relações evolutivas entre os grupos e a variação entre e dentro das populações, o “DNA barcoding” procura entender as espécies, focando na sua delimitação ao invés de suas relações (Hajibabaei *et al.* 2007).

O sistema de “DNA barcoding” é prático e uniforme para identificação de espécies, além disso, os dados gerados possuem ampla aplicação, com grande utilidade em levantamentos de biodiversidade e em conservação.

Proposto por Herbert *et al.* (2003), o “DNA barcoding” foi primeiramente utilizado para estudar a separação de espécies de animais. Muitos genes têm sido utilizados na sistemática, entretanto, o “DNA barcoding” pede um padrão global, que permita a comparação entre todos os seres vivos submetidos à técnica. Assim, um fragmento de ~ 650 pb do gene mitocondrial da citocromo c oxidase subunidade I (COI ou *cox1*) tem sido escolhido como o principal marcador para o “DNA barcoding” (Hajibabaei *et al.* 2007).

A escolha do *cox1* foi baseada em duas importantes vantagens relacionadas ao gene: a existência de “primers” universais muito robustos para amplificação de sua região 5' em animais (Folmer *et al.* 1994; Zhang & Hewitt 1997) e a distribuição do COI em um amplo espectro filogenético. Além disso, em relação a outros genes codificantes de proteínas, o COI possui uma alta taxa de substituição na terceira base, o que leva a uma taxa de evolução molecular até três vezes maior do que outros genes mitocondriais como 12S ou 16S rDNA (Knowlton & Weigt 1998).

O “DNA barcoding” permite, ainda, a detecção de espécies crípticas e fornece dados que ajudam a entender a diversidade da vida e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação. Diferentes marcadores ou protocolos podem ser necessários em certos grupos taxonômicos, mas aparentemente não existem barreiras para a aplicação dessa metodologia em nenhum grupo de ser vivo (De Salle *et al.* 2005; Saunders 2005).

Saunders (2005), baseando-se no fato de que essa técnica foi indicada para resolver problemas com plasticidade fenotípica, espécies crípticas e diferenças morfológicas nos estágio de vida dos animais, e que todos esses problemas também são observados em Rhodophyta, utilizou a região 5' do *cox1* em Rhodophyta, cobrindo 15 famílias em 6 ordens e um total de 250 indivíduos verificou que esse marcador se mostrou adequado para a distinção de espécies nos grupos de algas vermelhas estudados.

Além do *cox1*, uma região do gene do cloroplasto, o domínio V do gene 23S, que codifica o RNA da subunidade grande do ribossomo (23S RNAr), conhecido como “*universal plastid amplicon* – UPA” (Presting, 2006; Sherwood & Presting, 2007; Sherwood *et al.*, 2010) tem sido testada como marcador para o “DNA barcoding” de organismos fotossintetizantes. O UPA consiste de uma região de aproximadamente 400pb, flanqueada por sequências conservadas que podem ser usadas como “primers” universais (Presting 2006), ao contrário do *cox1*, que pode possuir variação de nucleotídeos na região dos “primers”.

O “DNA barcoding” não tem como intenção o fim da taxonomia tradicional, mas sim disponibilizar a informação molecular para ser usada mais amplamente pela taxonomia. Isso levará a alteração do número e distribuição das espécies que são reconhecidas nas linhagens das algas. No entanto, não é uma ferramenta que deve ser usada sozinha, e sim em conjunto com observações morfológicas e anatômicas, assim como com outros marcadores moleculares para obtenção de informações filogenéticas (Saunders 2005).

1.3.2-Marcadores e estudos moleculares em *Hypnea*

Relativamente poucos estudos que utilizam dados moleculares abordaram o gênero *Hypnea*. Alguns estudos já avaliaram a estrutura das Gigartinales, ordem a qual pertence *Hypnea*, baseando-se em marcadores moleculares (Hommersand *et al.* 1994; Fredericq *et al.* 1996; Saunders *et al.* 2004).

Entre os marcadores moleculares já testados para o gênero *Hypnea* está o SSU rDNA (Saunders *et al.* 2004), o *cox2-3* (Zucarello & West 2002) que tem sido utilizado principalmente como um marcador para análises populacionais em Rhodophyta; mas o principal marcador utilizado para espécies do gênero tem sido o *rbcL*. Porém, os focos destes estudos têm sido espécies coletadas na Ásia (Yamagishi & Masuda 2000; Yamagishi *et al.* 2003; Geraldino *et al.* 2006) e na África do Sul (Fredericq & Hommersand 2003) (Tabela 4). O marcador UPA também foi utilizado recentemente em algas do gênero *Hypnea* em um levantamento no Havaí (Sherwood *et al.* 2010). Faltam ainda trabalhos com marcadores moleculares de espécies localizadas em outras regiões geográficas, notadamente a região atlântica da América do Sul.

Tabela 4. Marcadores moleculares usados no gênero *Hypnea*, com sequências depositadas no GenBank e suas referências.

Marcador	Referência	País/Região
<i>rbcL</i>	Freshwater, S. <i>et al.</i> , 1994	EUA, Oc. Pacífico e Atlântico
	Yamagishi, Y. & Masuda, M., 2000	Japão
	Yamagishi, Y. <i>et al.</i> , 2003	Malaysia,
	Hommersand, M.M. & Fredericq, S., 2003	África do Sul
	Geraldino <i>et al.</i> , 2006	Coréia
	Geraldino <i>et al.</i> , 2009	Coréia, Japão e Tawian,
	Geraldino <i>et al.</i> , 2010	Coréia
<i>cox1</i>	Geraldino <i>et al.</i> , 2006	Coréia
	Geraldino <i>et al.</i> , 2009	Coréia, Japão e Tawian,
	Geraldino <i>et al.</i> , 2010	Coréia
SSU rDNA	Geraldino <i>et al.</i> , 2009	Coréia, Japão e
		Tawian,
UPA	Sherwood <i>et al.</i> , 2010	Havaí, EUA
<i>cox2-3</i>	Zuccarello & West, 2002	Oceano Pacífico

Dada a dificuldade taxonômica relacionada às espécies de *Hypnea*, tem sido recomendado que revisões regionais sejam efetuadas (Masuda *et al.* 1997). Além disso, a ausência de estudos moleculares com o gênero *Hypnea* no Brasil torna esse grupo um excelente alvo para a aplicação de marcadores moleculares.

2- Objetivos

Este trabalho tem como objetivo analisar a diversidade e filogenia das espécies de *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) do Estado de São Paulo baseado em marcadores moleculares, incluindo marcadores do tipo “DNA barcode” e morfologia. Para tanto, as seguintes etapas foram executadas:

- Obtenção de amostras georeferenciadas das espécies do gênero *Hypnea* de ocorrência no estado de São Paulo, formando um banco de material preservado para análises moleculares e exsicatas para incorporação em herbários;
- Identificação das amostras através de caracteres morfológicos e anatômicos;
- Geração de um banco de amostras com o DNA do gênero *Hypnea*;
- Sequenciamento marcadores moleculares para as amostras coletadas incluindo marcadores do tipo “DNA barcode”;
- Análise filogenética para as espécies de *Hypnea* utilizando o marcador *rbcl*.

3- Materiais e métodos

3.1-Coletas

As coletas foram realizadas em locais no litoral do Estado de São Paulo, sendo alguns locais pré-determinados pelo projeto “Flora ficológica do estado de São Paulo”, do qual também foram utilizadas amostras já preservadas em sílica gel. Estes locais, no sentido norte ao sul, são: Ubatuba: Picinguaba, Ilha das Couves, Ilha da Rapada, Praia da Fortaleza, Praia Brava, Praia Vermelha do Sul, Praia do Lamberto, Praia Dura, Domingas Dias e Praia da Lagoinha; São Sebastião e Ilhabela: Praia das Cigarras, Saco do Poço; Itanhaém: Praia dos Sonhos e Cibratel; Cananéia: Ilha do Bom Abrigo e Ilha do Cardoso. Ainda para enriquecimento das análises, duas amostras do Saco do Mamanguá, Rio de Janeiro e duas do Espírito Santo, foram incluídas. Todas as amostras obtidas foram georeferenciadas com o uso de GPS (Global Positioning System). As coletas foram realizadas no meso e infralitoral, sendo estas realizadas em períodos de maré baixa ou com método de mergulho autônomo (Tabela 5). Ainda, foram analisadas cinco amostras mantidas em cultura por K. Tesima no Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino”, do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica (Martins *et al.* 2011).

3.2- Processamento das amostras

As amostras coletadas foram triadas em campo, e/ou em laboratório com lupa. Após a triagem, amostras de *Hypnea* foram separadas para morfologia e análises moleculares. As amostras destinadas para a morfologia que estavam epifitando outras algas foram mantidas junto ao seu substrato, a fim de enriquecer as análises do material. As amostras destinadas às análises moleculares tiveram sua região apical, mais livre de contaminantes por ser a região de crescimento, limpas e separadas do resto da planta. Esses ápices foram preservados em sílica, sendo isolados da mesma por um papel absorvente, com o objetivo de não se perder nenhum fragmento da amostra seca. O remanescente dos exemplares de onde foram removidas as amostras para DNA foram fixados em formol 4% para as análises morfológicas e para a confecção de exsicatas. Exsicatas foram feitas e depositadas ou no acervo do herbário SPF (Index Herbariorum: <http://207.156.243.8/emu/ih/index.php>), localizado na Universidade de São Paulo, ou no acervo do herbário SP, do Instituto de Botânica de São Paulo.

Sempre que possível também foram separadas das amostras uma duplicata para preservação em sílica gel a serem estocadas em condições apropriadas gerando um banco de amostras que ficará disponível para outros estudos. A identificação do material foi feita primeiramente em campo baseada em caracteres morfológicos gerais e hábitos conhecidos das espécies. Os nomes dados as amostras só se tornaram permanentes após os estudos morfológicos e moleculares com as mesmas.

Os estudos morfológicos foram realizados baseando-se nas descrições originais das espécies (Kützinger 1849, J. Agardh 1851), visto que muitos dados conflitantes são encontrados na literatura. Abordagens mais atualizadas foram levadas em consideração sempre que necessário (Schenkman 1986, Geraldino *et al.* 2006, Lucio 2009). As características morfológicas observadas nas amostras estão descritas na Tabela 6.

Tabela 5. Listagem das amostras de *Hypnea* (numeradas de acordo com o projeto Rhodo-SP), dados da coleta e marcador sequenciado indicado por “ X ”

Nº RHODO- SP	Coletor	Data de coleta	Local de coleta			GPS Latitude/Longitude		cox1	UPA	rbcl
BOT0001*	S.P.B.Guimarães	04.set.1994	Ponta da Baleia	Munípio da Serra,Manguinhos, ES	Meso-litoral	-20.144.219	-40.295.200	X		
BOT0002*	S.P.B.Guimarães	04.set.1994	Ponta da Baleia	Munípio da Serra,Manguinhos, ES	Meso-litoral	-20.144.219	-40.295.200	X		
BOT0003*	S.P.B.Guimarães	27.mai.2002	Praia das Cigarras	São Sebastião,SP	Meso-litoral	- 23.436.790	- 45.157.910	X	X	X
BOT0004*	S.P.B.Guimarães	29.mai.2002	Praia da Fortaleza	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.529.591	- 45.157.910	X		
BOT0005*	N. S. Yokoya	26.out.2004	Praia da Fortaleza	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.529.591	- 45.157.910	X		
IBC0028	E.C.Oliveira	13.out.2008	Praia Vermelha do Sul - costão direito	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.512.377	- 45.172.014	X	X	X
IBC0040	E.C.Oliveira	13.out.2008	Praia Vermelha do Sul - costão esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.506.713	- 45.173.065	X	X	X
IBC0041	E.C.Oliveira	13.out.2008	Praia Vermelha do Sul - costão esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.506.713	- 45.173.065	X		
IBC0051	E.C.Oliveira/M.C.Oliveira	13.out.2008	Praia Vermelha do Sul - costão esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.506.713	- 45.173.065	X		
IBC0064	E.C.Oliveira/M.C.Oliveira	14.out.2008	Praia Dura - costão esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.495.159	- 45.165.038	X	X	X
IBC0067	E.C.Oliveira/M.C.Oliveira	14.out.2008	Praia Dura - costão esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.495.159	- 45.165.038	X		
IBC0089	E.C.Oliveira/M.C.Oliveira	15.out.2008	Ponta da Fortaleza	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.529.591	- 45.157.910	X		
IBC0098	M.C.Oliveira	16.out.2008	Praia do Costa - lado esquerdo	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.775.581	- 45.233.514	X	X	X
IBC0123	M.C.Oliveira	30.out.2008	Ilha Vitória	São Sebastião,SP	Infralitoral	- 23.436.790	- 45.23.868	X		
IBC0129	M.C.Oliveira	31.out.2008	Saco do Poço - Ilha Bela	São Sebastião,SP	Infralitoral	- 23.515.066	- 45.166.797	X	X	X

* amostras em cultura no Instituto de Botânica

Tabela 5. Continuação.

Nº RHODO- SP	Coletor	Data de coleta	Local de coleta			GPS Latitude/Longitude		cox1	UPA	rbcL
IBC0137	M.C.Oliveira	08.mai.2009	Praia das Cigarras - costão norte	São Sebastião,SP	Meso-litoral	- 23.775.581	- 45.233.514	X		
IBC0138	M.C.Oliveira	08.mai.2009	Praia das Cigarras - costão sul	São Sebastião,SP	Meso-litoral	- 23.438.990	- 45.238.870	X		
IBC0139	E.C.Oliveira/ F. Nauer	08.mai.2009	Praia Vermelha do Sul	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.438.990	- 45.238.870	X		
IBC0184	M.B.Benal	06.mai.2009	Praia da Fortaleza	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.529.591	- 45.157.910	X		
IBC0185	N.Yokoya	06.mai.2009	Praia da Fortaleza	Ubatuba,SP	Meso-litoral	- 23.529.591	- 45.157.910	X	X	X
IBC0186	M.B.Benal	06.mai/2009	Praia Brava	Ubatuba,SP	Meso-litoral	-23.300.870	-45.101.620	X		
IBC0187	N.R.Guimaraes	07.mai.2009	Praia dos Sonhos	Itanhaém,SP	Meso-litoral	- 24.175.703	-46.748.017	X		
IBC0188	N.R.Guimaraes	07.mai.2009	Praia dos Sonhos	Itanhaém,SP	Meso-litoral	- 24.175.703	-46.748.017	X		
IBC0189	E.C.Oliveira	20.nov.2009	Saco do Mamanguá	Paraty,RJ	Infralitoral	- 23.263.633	- 44.636.397	X		
IBC0190	E.C.Oliveira	20.nov.2009	Saco do Mamanguá	Paraty, RJ	Infralitoral	- 23.263.633	- 44.636.397	X	X	X
IBC0194	M.C.Oliveira/E. Costa	17.mar.2010	Praia Picinguaba, Costão Esquerdo	Ubatuba , SP	Meso-litoral	-23.380.032	-44.840.732	X		
IBC0195	S.M.P.B.Guimarães	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0196	M.T.Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0197	N.R.Guimarães	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0198	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		

Tabela 5. Continuação.

Nº RHODO- SP	Coletor	Data de coleta	Local de coleta			GPS Latitude/Longitude		cox1	UPA	rbcl
IBC0199	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0200	M.C.Oliveira/E. Costa	17.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0201	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0202	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0203	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0204	S.M.P.B.Guimarães/M.T. Fujii	16.mar.2010	Domingas Dias, Costão Direito	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.493.539	-45.147.169	X		
IBC0205	N.R.Guimarães	16.mar.2010	Praia do Laberto, Int.Ocenográfico	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.499.961	-45.117.014	X		
IBC0206	N.R.Guimarães	16.mar.2010	Praia do Laberto, Int.Ocenográfico	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.499.961	-45.117.014	X		
IBC0210	M.C.Oliveira/M.B.B.Barreto	17.mar.2010	Praia Picinguaba, Costão Esquerdo	Ubatuba, SP	Infralitoral	-23.380.032	-44.840.732	X		
IBC0211	M.C.Oliveira/M.B.B.Barreto	17.mar.2010	Praia Picinguaba, Costão Esquerdo	Ubatuba, SP	Infralitoral	-23.380.032	-44.840.732	X		
IBC0212	N.R.Guimarães	18.mar.2010	Praia Vermelha do Sul-Costão eq.	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.506.713	-45.173.065	X	X	X
IBC0213	N.R.Guimarães	18.mar.2010	Praia Vermelha do Sul-Costão eq.	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.506.713	-45.173.065	X		
IBC0214	M.C.Oliveira	18.mar.2010	Ilha das Couves	Ubatuba, SP	Infralitoral	-23.425.330	-44.904.491	X		
IBC0216	M.C.Oliveira	18.mar.2010	Ilha das Couves	Ubatuba, SP	Infralitoral	-23.425.330	-44.904.491	X		
IBC0217	M.C.Oliveira	18.mar.2010	Ilha das Couves	Ubatuba, SP	Infralitoral	-23.425.330	-44.904.491	X		

Tabela 5. Continuação.

Nº RHODO- SP	Coletor	Data de coleta	Local de coleta			GPS Latitude/Longitude		cox1	UPA	rbcl
IBC0242	M.C.Oliveira	18.mar.2010	Ilha das Couves	Ubatuba, SP	Meso-litoral	-23.425.330	-44.904.491	X		
IBC0244	N.R.Guimarães	14.mai.2010	Cibratel	Itanhaém, SP	Meso-litoral	-24.199.518	-46.812.635	X		
IBC0245	N.R.Guimarães	29.jun.2010	Ilha do Bom Abrigo	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.116.667	-47.866.667	X		X
IBC0246	N.R.Guimarães	29.jun.2010	Ilha do Bom Abrigo	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.116.667	-47.866.667	X		
IBC0247	N.R.Guimarães	29.jun.2010	Ilha do Bom Abrigo	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.116.667	-47.866.667	X	X	
IBC0248	N.R.Guimarães	29.jun.2010	Ilha do Bom Abrigo	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.116.667	-47.866.667	X		
IBC0249	N.R.Guimarães	30.jun.2010	Ilha do Cardoso	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.133.333	-47.966.667	X		
IBC0250	N.R.Guimarães	30.jun.2010	Ilha do Cardoso	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.133.333	-47.966.667	X		
IBC0251	N.R.Guimarães	30.jun.2010	Ilha do Cardoso	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.133.333	-47.966.667	X		
IBC0252	N.R.Guimarães	30.jun.2010	Ilha do Cardoso	Cananéia, SP	Meso-litoral	-25.133.333	-47.966.667	X		

Tabela 6. Caracteres morfológicos utilizados nas análises morfológicas das espécies de *Hypnea* (baseado em Masuda, 1997 e Lúcio, 2006).

Caracteres morfológicos
1. Comprimento do talo
2. Presença de anastomoses entre os ramos/râmulos
3. Coloração do talo
4. Presença de eixo principal distinto
5. Forma do eixo principal
6. Presença de gavinhas
7. Padrão de ramificação
8. Diâmetro do eixo principal na porção subapical (ou de ramificações do talo)
9. Diâmetro das células corticais
10. Diâmetro da célula axial
11. Número de células periaxiais
12. Diâmetro das células periaxiais
13. Relação diâmetro células axiais/células periaxiais
14. Presença de espessamentos lenticulares
15. Presença de tetrasporângio
16. Posição do tetrasporângio

Os cortes anatômicos foram realizados no laboratório de Algas Marinhas do Instituto de Biociências da USP, feitos à mão-livre com auxílio de lâmina de barbear e corados com azul de anilina a 1%, acidificada com HCl 1N. Os aspectos gerais e os caracteres diagnósticos de cada espécie foram obtidos com sistema digital de captura e análise de imagens Leica DM4000-B.

3.3- Extração de DNA e amplificação dos marcadores moleculares

Para a extração do DNA, o material algal mantido em sílica gel foi macerado em nitrogênio líquido. Após a maceração das amostras, o DNA foi extraído utilizando-se o protocolo do kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel – Düren, Alemanha). O DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão tris-borato-EDTA, corado com GelRed diluído em água na proporção 1:500 (“GelRed Nucleic Acid Gel Stain” - Biotium, Hayward, CA, USA), para averiguação da presença, qualidade e quantidade de DNA extraído (Sambrook *et al.* 1989).

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação da sequência alvo usando-se "primers" específicos para os diferentes marcadores moleculares (Tabela 7) através da "Polymerase Chain Reaction" ou PCR (Sambrook *et al.* 1989). Os “primers” (IDT- Iowa,

EUA) descritos para o marcador *cox1* foram retirados de Saunders (2005), os “primers” para o marcador *rbcl* (internos e externos) estão descritos em Freshwater *et al.* (1994), e os “primers” do marcador UPA estão descritos em Sherwood & Presting (2007).

As PCRs foram realizadas utilizando-se o kit da Promega (Madison, WI – EUA). Após a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, com marcador de tamanho (1 Kb DNA Ladder- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para verificar os tamanhos dos fragmentos amplificados, corados com corante GelRed na concentração 1:500. Os ciclos utilizados para a amplificação dos marcadores estão descritos da Figura 2. Os termocicladores utilizados para a realização da reação de PCR foram: Techne TC-512e Techne TC-4000 (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK). Os produtos de PCR foram purificados utilizando a coluna GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), quantificados com o uso do aparelho NanoDrop 2000 - Spechtophotometer (Wilmington, DE - EUA), e diretamente sequenciados.

Tabela 7. “primers” para PCR e sequenciamento para os diferentes marcadores moleculares. Nos “primers” do marcador *rbcl*, r = A ou G; y = C ou T; w = A ou T.

“primers”	Sequência 5'- 3'	Marcador (pb)	Referência
GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	<i>cox1</i> (~710)	Saunders 2005
GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAA _y CA		
F- <i>rbcl</i> start	ATGTCTAACTCTGTAGAA		
R753a	GCTCTTTCrTACTCyTC		
F492a	CGyATGGAyAAATTTGGACG		
R1150	GCAATTTGCrCRCArTGAATACC	<i>rbcl</i> (~1500)	Freshwater <i>et al.</i> 1994
F993	GGTACTGTTGGTAAATTwGAAGG		
R- <i>rbcl</i> S start	GTTCTTTGTGTTAATCTCAC		
P23SrV R1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	UPA (~ 400)	Sherwood & Presting 2007
P23SrV F1	GGA CAG AAA GACCCT ATG AA		

Após a obtenção dos marcadores moleculares, as amostras de DNA foram catalogadas, precipitadas em etanol e estocadas a –80°C formando um banco que ficará disponível para outros estudos (Chase *et al.* 2005).

Figura 2. Ciclos para PCR dos três marcadores utilizados neste trabalho retirados, de a) Freshwater *et al.* (1994), b) Saunders (2005) e c) Sherwood & Presting (2007).

3.4- Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas

O sequenciamento dos marcadores moleculares a partir do produto de PCR purificado e quantificado (variação da quantificação = 10,6 – 30 ng DNA/μL) foi realizado no sequenciador automático (ABI PRISM 3100) usando-se o kit “Cycle Sequencing, Big-Dye Terminator” (Applied Biosystems, Carlsbad, California-EUA), conforme instruções do fornecedor, utilizando os mesmos “primers” da PCR. Para o *rbcL*, os “primers” internos listados na Tabela 7 também foram usados para o sequenciamento. As seqüências consenso para cada marcador de amostra foram montadas usando o programa BioEdit (Hall 1999) a partir das seqüências obtidas nas direções direta e reversa. Nucleotídeos divergentes ocorrendo na mesma posição foram verificados nos cromatogramas das seqüências. As seqüências consenso obtidas foram comparadas com as seqüências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o uso do programa BLAST (Altschul *et al.* 1997).

As seqüências consenso, assim como outras seqüências obtidas no banco de dados foram alinhadas utilizando-se o Clustal-W no programa BioEdit. Para todas as matrizes de alinhamento foram removidas as regiões dos “primers” de PCR das pontas 5´ e 3´.

A matriz de UPA com 369 nucleotídeos foi construída utilizando-se 18 seqüências do banco de dados, dez seqüências obtidas neste trabalho e uma seqüência de

Chondrachantus acicularis (Gigartinaeae, Gigartinales), utilizada como grupo externo. Todas as sequências retiradas do banco de dados pertencem ao trabalho de Sherwood *et al.* 2010, e são provenientes do Havaí. Para as sequências de *cox1* foram geradas duas matrizes, uma com 466 nucleotídeos e outra com 617 nucleotídeos. As matrizes de *cox1* foram construídas utilizando-se 27 sequências do banco de dados (Tabela 8), 55 sequências deste trabalho e uma de *Chondracantus teedei* (Mertens ex Roth) Kützinger, utilizada como grupo externo. As divergências para esse marcador foram calculadas utilizando-se a matriz com 617 nucleotídeos. A matriz de *rbcL* com 1317 nucleotídeos foi construída utilizando-se 28 sequências do banco de dados (Tabela 9), dez sequências deste trabalho e uma sequência de *Calliblepharis fimbriata* (Greville) Kützinger (Cystocloniaceae, Gigartinales) e outra de *Craspedocarpus venosus* (Kützinger) Mint-Thein & Womerseley (Cystocloniaceae, Gigartinales), utilizadas como grupo externo.

Tabela 8. Sequências do marcador *cox1* obtidas do GenBank utilizadas nas análises.

Espécie	Acesso GenBank	País de origem	Referência
<i>H. boergesenii</i>	EU345983	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H. cervicornis</i>	HQ422674	Havaí	Sherwood. <i>et al.</i> (2010)
<i>H. charoides</i>	EU240822	Austrália	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H. cornuta</i>	HQ422721	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. flexicaulis</i>	EF136611	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2006)
<i>H. flexicaulis</i>	EF136601	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2006)
<i>H. flexicaulis</i>	EF136591	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2006)
<i>H. japonica</i>	EU345989	Taiwan	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H. musciformis</i>	HQ422876	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. musciformis</i>	HQ422683	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. nidulans</i>	FJ694913	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H. pannosa</i>	FJ694912	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H. pannosa</i>	FJ694892	México	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H. pannosa</i>	FJ694910	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H. spinella</i>	EU240818	Vietnã	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H. spinella</i>	HQ422681	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. stellulifera</i>	EU345985	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2006)
<i>H. valentiae</i>	HQ422901	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. valentiae</i>	HQ422680	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>H. viridis</i>	FJ694908	África do Sul	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H. sp. "asiatica"</i>	EU345981	Taiwan	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>Hypnea sp.</i>	HQ422958	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea sp.</i>	HQ422951	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea sp.</i>	HQ422905	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea sp.</i>	HQ422821	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea sp.</i>	HQ422812	Havaí	Sherwood <i>et al.</i> (2010)

Tabela 9. Sequências do marcador *rbcL* do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Acesso GenBank	País de origem	Referência
<i>H.boergesenii</i>	EU346010	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.boergesenii</i>	AF385634	Taiwan	Hommersand & Fredericq (2005)
<i>H.charoides</i>	EU240843	Austrália	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.charoides</i>	AB033159	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.chordacea</i>	AB033160	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.cornuta</i>	EU345993	Indonésia	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.cornuta</i>	AB095912	Itália	Yamagishi <i>et al.</i> (2006)
<i>H.flagelliformis</i>	AB033162	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.flexicaulis</i>	EF136632	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2006)
<i>H.flexicaulis</i>	AB033163	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.japonica</i>	EU346002	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.japonica</i>	DQ095823	-	Kim <i>et al.</i> (2005)
<i>H.musciformis</i>	EU346014	França	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.musciformis</i>	U04179	EUA	Freshwater <i>et al.</i> (1994)
<i>H.nidifica</i>	FJ694932	Cingapura	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.nidulans</i>	FJ694947	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.pannosa</i>	AB033165	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.pannosa</i>	FJ694959	México	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.rosea</i>	FJ694935	África do Sul	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.spinella</i>	EU240849	Vietnã	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.spinella</i>	AB033166	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.stellulifera</i>	EU346004	Filipinas	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.tenuis</i>	FJ694934	África do Sul	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.valentiae</i>	FJ694933	Indonésia	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.viridis</i>	FJ694930	África do Sul	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.sp. "asiática"</i>	EU345998	Coréia	Geraldino <i>et al.</i> (2009)
<i>H.sp IzuH1</i>	AB033167	Japão	Yamagishi & Masuda (2000)
<i>H.sp PJLG-2009</i>	FJ694945	Cingapura	Geraldino <i>et al.</i> (2010)
<i>H.sp PJLG-2009</i>	FJ694944	Cingapura	Geraldino <i>et al.</i> (2010)

As árvores filogenéticas foram contruídas usando o método de distância (neighbor-joining, NJ) para *cox1*, *UPA* e *rbcL*. Os métodos de máxima parcimônia (MP) e análise Bayesiana (MB) também foram utilizados para o *rbcL*. Os modelos evolutivos para as análises filogenéticas de *rbcL* foram obtidos através do programa MrModeltest 2.2 (Nylander 2004) usando Akaike Information Criterion (AIC). Para MP e NJ foi utilizado o programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). A análise de MP foi realizada sob busca heurística com 2000 réplicas de bootstrap (Felsenstein 1985) para MP e NJ. A análise Bayesiana foi realizada através do programa Mr.Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Uma corrida com quatro cadeias de MCMC foram realizadas com 1 milhão de gerações, com amostragem a cada 100 gerações. Foram descartadas as primeiras 100.000 gerações como "burn-in" para a construção da árvore consenso.

Para todas as análises realizadas foi considerada a seguinte escala arbitrária para descrever porcentagens de suporte nos ramos: 50-69, baixo; 70-85, moderado e 86-100,

alto. Nas árvores foram plotados apenas os valores maiores que 70% para bootstrap e maiores que 0,7 para probabilidades *a posteriori*. Em todas as análises os “gaps” foram considerados como dados ausentes e o modelo evolutivo de substituição nucleotídica selecionado foi o GTR+I+G, onde se assume o modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (GTR) com uma proporção de sítios invariáveis (I) e distribuição gamma (G) para acomodar as diferentes taxas para sítios variáveis.

3.5- Submissão de sequências nos bancos de dados

Os dados obtidos para os espécimes coletados do gênero *Hypnea*, assim como o detalhamento das espécies e das coletas foram revisados e organizados para depósito no banco de dados BOLD, Barcoding of Life Data System (<http://www.boldsystems.org>; Ratnasinghan & Hebert 2007). Na publicação dos dados as sequências serão depositadas também no GenBank.

Todo o material gerado para cada amostra (amostras em Si-Gel, amostras de DNA, exsiccatas e sequências) está nomeado por um código (número IBC ou número BOT) que permite a pronta recuperação no BOLD. Os marcadores moleculares possuem no mínimo duas sequências (uma na direção direta e outra na reversa), e assim como as sequências consenso, têm sua qualidade avaliada pelo BOLD Systems.

4- Resultados

4.1- Marcadores moleculares

As coletas realizadas reúnem um banco de 50 amostras coletadas e cinco amostras mantidas em cultura no Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino”, do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica. Foram sequenciadas as 55 amostras para o marcador *cox1* (ANEXO I). Após a análise dos agrupamentos obtidos para as sequências de *cox1*, foram selecionadas 10 amostras, representando cada grupo e seus diferentes haplótipos, para o sequenciamento dos marcadores UPA (ANEXO II) e *rbcl* (ANEXO III).

As sequências obtidas para o *cox1* mostraram a existência de seis grupos diferentes (Tabela 10) com divergências de 10,1 - 16,3% (Tabela 11).

Tabela 10. Espécies do gênero *Hypnea* analisadas neste trabalho agrupadas de acordo com as sequências obtidas para o marcador *cox1*. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.

<i>Hypnea cervicornis</i>	<i>Hypnea flexicaulis</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	<i>Hypnea spinella</i>	<i>Hypnea</i> sp.1	<i>Hypnea</i> sp.2
BOT0004	IBC0190	BOT0001	IBC0041	IBC0211	BOT0003
IBC0028		BOT0002	IBC0129	IBC0212	
IBC0051		BOT0005	IBC0184		
IBC0064		IBC0040	IBC0198		
IBC0139		IBC0067	IBC0203		
IBC0186		IBC0089			
IBC0194		IBC0098			
IBC0195		IBC0123			
IBC0197		IBC0137			
IBC0200		IBC0138			
IBC0201		IBC0174			
IBC0204		IBC0185			
IBC0205		IBC0187			
IBC0210		IBC0188			
IBC0213		IBC0189			
IBC0214		IBC0196			
IBC0216		IBC0199			
IBC0217		IBC0202			
IBC0242		IBC0244			
IBC0245		IBC0252			
IBC0246					
IBC0247					
IBC0248					
IBC0249					
IBC0250					
IBC0251					

O grupo identificado como *H. cervicornis* possui 26 das 55 sequências obtidas (Tabela 10). Dentro deste grupo foi observada a presença de três haplótipos para o *cox1*, com uma divergência intraespecífica de 0 a 3 pb (0 - 0,5%).

O grupo identificado como *H. musciformis* possui 20 das 55 amostras sequenciadas para o *cox1* (Tabela 10). Dentro deste grupo de sequências foi observada a presença de três haplótipos, com uma divergência intraespecífica de 0 a 4 pb (0 - 0,7 %).

O grupo identificado como *H. spinella* possui cinco das 55 sequências. Dentro deste grupo foi observada a presença de apenas um haplótipo (Tabela 10).

O grupo nomeado de *Hypnea* sp.1 possui duas das 55 sequências, com a presença de um haplótipo.

Hypnea flexicaulis e *Hypnea* sp.2 possuem, cada uma, apenas uma sequência, sendo assim, um só haplótipo (Tabela 10).

Tabela 11. Porcentagem de identidade (no triângulo da porção inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior em negrito e itálico) entre as sequências do *cox1* as espécies e haplótipos estudados do gênero *Hypnea*. *H. musciformis*: IBC0098, IBC0138, IBC0188; *H. cervicornis*: BOT004, IBC0028, IBC0186, IBC0200; *H. spinella*: IBC0041; *H. flexicaulis*: IBC0190; *H.sp1*: IBC0212; *H.sp2*: BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.

	IBC0098	IBC0138	IBC0188	BOT0004	IBC0028	IBC0186	IBC0200	IBC0041	BOT0003	IBC0190	IBC0212
IBC0098	ID	1	3	95	97	94	99	81	93	75	85
IBC0138	99,8	ID	4	97	98	95	100	82	94	76	86
IBC0188	99,5	99,3	ID	94	95	92	97	79	93	74	85
BOT0004	84,4	84,2	84,7	ID	1	2	3	78	75	86	76
IBC0028	84,2	84,1	84,6	99,8	ID	3	2	79	76	87	77
IBC0186	84,7	84,6	85,0	99,6	99,5	ID	5	77	74	86	75
IBC0200	83,9	83,7	84,2	99,5	99,6	99,1	ID	81	78	89	79
IBC0041	86,8	86,7	87,1	87,3	87,1	87,5	86,8	ID	65	96	62
BOT0003	84,9	84,7	84,9	87,8	87,6	88,0	87,3	89,4	ID	86	69
IBC0190	87,8	87,6	88,0	86,0	85,8	86,0	85,5	88,4	86,0	ID	79
IBC0212	86,2	86,0	86,2	87,6	87,5	87,8	87,1	89,9	88,8	87,1	ID

Para o marcador UPA as 10 sequências obtidas mostraram a existência, novamente, das mesmas seis entidades taxonômicas, sendo que no caso dos diferentes haplótipos encontrados para as sequências de *cox1*, as sequências de UPA foram idênticas, com exceção da amostra IBC0185 que diferiu em um nucleotídeo das duas outras amostras de *H. musciformis* (IBC0040 e IBC0098). A divergência encontrada entre as seis entidades taxonômicas foi de 2,5 – 4,4% (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagem de identidade (no triângulo inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior em negrito e itálico) entre as sequências do UPA dos espécimes estudados do gênero *Hypnea*. *H. cervicornis*: IBC0028, IBC0064 e IBC0247; *H. musciformis*: IBC0040, IBC0098 e IBC0185; *H. spinella*: IBC0129; *H. flexicaulis*: IBC0190; *H.sp1*: IBC0212; *H.sp2*: BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.

	IBC0028	IBC64	IBC0247	IBC0040	IBC98	IBC185	IBC129	IBC190	BOT003	IBC212
IBC0028	ID	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>9</i>	<i>11</i>
IBC0064	100	ID	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>9</i>	<i>11</i>
IBC0247	100	100	ID	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>9</i>	<i>11</i>
IBC0040	97,2	97,2	97,2	ID	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>14</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>15</i>
IBC0098	97,2	97,2	97,2	100	ID	<i>1</i>	<i>14</i>	<i>11</i>	<i>11</i>	<i>15</i>
IBC0185	97,0	97,0	97,0	99,7	99,7	ID	<i>15</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>24</i>
IBC0129	97,0	97,0	97,0	96,2	96,2	95,9	ID	<i>10</i>	<i>9</i>	<i>11</i>
IBC0190	97,0	97,0	97,0	97,0	97,0	96,7	97,2	ID	<i>10</i>	<i>12</i>
BOT0003	97,5	97,5	97,5	97,0	97,0	96,7	97,5	97,2	ID	<i>12</i>
IBC0212	97,0	97,0	97,0	95,9	95,9	95,6	97,0	96,7	96,7	ID

A partir da confirmação dos resultados obtidos com o marcador *cox1* e UPA foi sequenciado o marcador *rbcl*, uma vez que esse marcador possui um maior número de sequências disponíveis para a comparação no GenBank. O resultado da comparação entre as sequências de *rbcl* das amostras e as do banco de dados corroboram a existência de seis táxons entre as amostras coletadas, com uma divergência interespecífica para o marcador *rbcl* de 3,2 – 6,7 % (Tabela 13).

Tabela 13. Porcentagem de identidade (no triângulo inferior) e número absoluto de nucleotídeos divergentes (no triângulo superior em negrito e itálico) entre as sequências de *rbcl* dos espécimes estudados do gênero *Hypnea* *H. cervicornis*: IBC0028, IBC0064, IBC0245; *H. musciformis*: IBC0040, IBC0098, IBC0185; *H. spinella*: IBC0129; *H. flexicaulis*: IBC0190; *H.sp1*: IBC0212; *H.sp2*: BOT0003. Número das amostras de acordo com a Tabela 5.

	IBC0028	IBC0064	IBC0245	IBC0040	IBC0098	IBC0185	IBC0129	IBC0190	IBC0212	BOT0003
IBC0028	ID	<i>0</i>	<i>6</i>	<i>75</i>	<i>75</i>	<i>75</i>	<i>47</i>	<i>79</i>	<i>62</i>	<i>50</i>
IBC0064	100	ID	<i>6</i>	<i>75</i>	<i>75</i>	<i>75</i>	<i>47</i>	<i>79</i>	<i>62</i>	<i>50</i>
IBC0245	99,5	99,5	ID	<i>80</i>	<i>81</i>	<i>80</i>	<i>53</i>	<i>88</i>	<i>80</i>	<i>56</i>
IBC0040	94,3	94,3	93,9	ID	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>84</i>	<i>73</i>	<i>88</i>	<i>79</i>
IBC0098	94,3	94,3	93,8	99,9	ID	<i>1,3</i>	<i>84</i>	<i>72</i>	<i>88</i>	<i>84</i>
IBC0185	94,3	94,3	93,9	100	99,9	ID	<i>84</i>	<i>73</i>	<i>88</i>	<i>79</i>
IBC0129	96,4	96,4	95,9	93,6	93,6	93,6	ID	<i>79</i>	<i>55</i>	<i>42</i>
IBC0190	93,7	93,7	93,3	94,4	94,5	94,4	93,7	ID	<i>88</i>	<i>82</i>
IBC0212	95,3	95,3	94,9	93,3	93,3	93,3	95,8	93,3	ID	<i>42</i>
BOT0003	96,2	96,2	95,7	93,7	93,6	93,7	96,8	93,8	96,8	ID

4.2- ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises geradas para o marcador *cox1* utilizaram uma porção de 617 nucleotídeos da região 5' do gene, alinhando 82 sequências, referentes a 18 espécies de *Hypnea*. A árvore segundo a análise de Neighbor Joining (NJ) mostrou a formação de oito agrupamentos principais, a maioria com alto suporte das análises de bootstrap, e espécies isoladas (Figura 3).

No primeiro agrupamento, *H. flexicaulis* (Paraty, RJ) aparece como grupo irmão do clado que contém *H. flexicaulis* (Filipinas) e um agrupamento com dois cladros, um contendo *H. boergesenii* (Coreia) e outro com *H. cervicornis* (Havaí), *H. flexicaulis* (Coreia) e *H. valentiae* (Havaí).

No segundo agrupamento, *H. stellulifera* (Filipinas) aparece como grupo irmão do agrupamento que contém as sequências de *H. musciformis*. *Hypnea musciformis* do Havaí aparece como um táxon basal ao clado que contém as amostras *H. musciformis* analisadas neste trabalho. As amostras brasileiras se dividiram em dois grupos, um com três amostras de Itanhaém, SP e o outro contendo as demais amostras incluindo uma outra amostra de Itanhaém. A divergência encontrada no *cox1* entre os dois agrupamentos de *H. musciformis* do Brasil foi de 0 – 4 pb (0 – 0,7%). A divergência encontrada entre a *H. musciformis* do Havaí e as amostras Brasileiras foi de 4,3 - 4,6%.

No terceiro agrupamento encontram-se uma amostra de *H. musciformis* e outra de *H. valentiae* ambas do Havaí.

No quarto agrupamento *H. nidulans* (Filipinas) aparece como grupo irmão do clado que contém *H. pannosa* (México), *H. viridis* (África do Sul) e duas outras amostras de *H. pannosa* (Filipinas).

No quinto agrupamento, *H. spinella* (Vietnã) aparece como grupo irmão do agrupamento que contém dois cladros; o primeiro com quatro amostras do Havaí (três *Hypnea* sp e uma *H. spinella* e, o segundo, com as duas amostras de *Hypnea* sp.1 (São Paulo).

O sexto agrupamento inclui *Hypnea* sp. “asiática” (Taiwan) como grupo irmão de *Hypnea* sp. (Havaí).

No sétimo agrupamento estão todas as amostras de *H. cervicornis* coletadas em São Paulo que se dividem em dois grupos, um contendo quatro amostras de Ubatuba e o outro com as demais amostras, incluindo outras amostras de Ubatuba. A divergência encontrada no *cox1* entre os dois agrupamentos de *H. cervicornis* foi de 1 – 2 pb (0,2 – 0,4%).

No oitavo agrupamento estão as amostras de *H. spinella* obtidas para o Estado de São Paulo.

A amostra de *Hypnea* sp.2 (São Paulo) aparece isolada e não é proximalmente relacionada a nenhum dos outros clados.

Figura 3. Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências de *cox1* obtidas de espécies do gênero *Hypnea*; a sequência de *Chondracanthus teedi* foi utilizada como grupo externo. Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap de duas matrizes analisadas. Apenas valores maiores do que

60 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso e localidade geográfica. As amostras obtidas neste estudo estão destacadas em negrito.

As análises geradas para o marcador UPA utilizaram uma porção de 369 nucleotídeos do gene, alinhando 29 sequências, referentes a 12 espécies de *Hypnea* (todas as sequências retiradas do banco de dados pertencem ao trabalho de Sherwood *et al.* 2010, e são provenientes do Havaí). A árvore filogenética segundo a análise de NJ (Figura 4) mostrou a formação de seis agrupamentos e algumas sequências isoladas.

O primeiro agrupamento contém três amostras do Havaí, *H. cervicornis*, *H. musciformis* e *H. valentiae*. No segundo agrupamento, *H. cornuta* e *H. pannosa*, ambas do Havaí, aparecem juntas. O terceiro agrupamento se divide em dois clados. O primeiro com amostras de *H. musciformis* (Havaí) e o segundo com as amostras de *H. musciformis* (São Paulo). A divergência encontrada para o UPA entre esses dois agrupamentos de *H. musciformis* foi de 5 a 7 pb (1,4 – 1,7%). O quarto agrupamento contém *H. flexicaulis* (Paraty, RJ) como grupo irmão de *H. nidifica* e *H. valentiae* ambas do Havaí. No quinto agrupamento, *Hypnea* sp (Havaí) aparece como grupo irmão do clado que contém *H. spinella* (Havaí) e *Hypnea* sp.1 (São Paulo). O sexto agrupamento contém as amostras de *H. cervicornis* (São Paulo). As sequências de *H. spinella* (São Paulo) e *Hypnea* sp.2 (São Paulo) não se agruparam com nenhuma outra sequência disponível.

Figura 4. Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA, mostrando o agrupamento de espécies do gênero *Hypnea*. Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap. Apenas valores maiores do que 70 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso. As amostras de São Paulo estão destacadas em negrito.

Trinta e nove sequências representando 22 espécies de *Hypnea* foram alinhadas utilizando uma porção do gene *rbcL* com 1317 nucleotídeos. A árvore gerada pela análise Bayesiana mostra a relação filogenética das espécies do gênero *Hypnea* baseada nesse marcador (Figura 5).

As espécies de *Hypnea* analisadas formaram um agrupamento monofilético com alto suporte em relação aos grupos externos utilizados e se dividiram em dois grandes grupos, mas com um suporte moderado apenas de probabilidade *a posteriori*.

O primeiro grande grupo se dividiu em dois agrupamentos com suporte de moderado à alto nas análises. O primeiro contém *H. tenuis* (África do Sul) como grupo irmão do clado que contém *H. flexicaulis* (Filipinas e Japão), *H. japonica* (local desconhecido), *H. flexicaulis* (Paraty, RJ), *H. boergesenii* (Taiwan e Coreia). A variação encontrada para esse grupo de *H. flexicaulis* - *H. japônica* - *H. boergesenii* foi de 10 a 79 pb (0,8 - 6%). O segundo grupo por sua vez se subdivide em alguns clados. Um contendo *H. chordacea* (Japão) e *H. flagelliformis* (Japão) como grupo irmão de *H. musciformis*. As amostras de *H. musciformis* se dividem em dois agrupamentos um com os exemplares da França e EUA, e o outro com as amostras de *H. musciformis* de São Paulo, ambos com alto suporte nos ramos. A variação encontrada para o *rbcL* entre os dois agrupamentos de *H. musciformis* foi de 12 pb. O segundo agrupamento contém *H. stellulifera* (Filipinas) como grupo irmão *H. cornuta* da Indonésia e Itália. O outro agrupamento formado, referente ao primeiro grande agrupamento, inclui espécies da Ásia *H. japonica* (Coreia), e *H. nidulans*, *H. pannosa* (Japão), *Hypnea* sp. PJLG (Cingapura) e uma amostra da África do Sul de *H. viridis*.

O segundo grande grupo se divide em três agrupamentos. O primeiro, sem suporte nas análises, agrupa *H. charoides* (Austrália) com *H. rosea* (África do Sul). O segundo inclui *H. nidifica* (Cingapura), *H. charoides* e *Hypnea* sp. "asiatica" ambas do Japão, e um agrupamento com as amostras de *H. cervicornis* de São Paulo, com alto suporte nos ramos. A divergência observada entre o grupo de *H. cervicornis* e o grupo de espécies da Ásia foi de 5 a 55 pb (0,4 – 4,2%). O terceiro grupo é formado por dois agrupamentos: um contém *Hypnea* sp.2 (São Paulo), *Hypnea* sp1 (São Paulo) e *H. spinella* do Vietnã e do Japão, com uma variação de 40 a 46 pb (3,1 – 3,5%); o outro agrupa *H. valentiae* (Indonésia), *Hypnea* sp. IzuH1 (Japão) e *H. spinella* (São Paulo). A variação encontrada entre esses três últimos táxons para o *rbcL* foi de 33 a 35 pb (2,5 -2,7%).

Figura 5. Análise Bayesiana (MB) de sequências de *rbcl* mostrando as relações filogenéticas de espécies do gênero *Hypnea*. Nos ramos estão plotados os valores de bootstrap para análise de Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) - NJ/MP. As probabilidades *a posteriori* (pp) estão representadas na espessura dos ramos, segundo a legenda da Figura. Apenas valores maiores do que 70 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do n° de acesso. As amostras obtidas neste trabalho estão destacadas em negrito.

Comparando todas as amostras utilizadas nas análises, as divergências interespecíficas, calculadas a partir da matriz com 466 pb, foram de 0 a 74 pb (0 – 15,9%) para o marcador *cox1*. Ressaltando que a divergência de 0 pb ocorreu entre *H. flexicaulis*

da Coréia e *H. cervicornis* de São Paulo, Brasil. Para o marcador *rbcL* as divergências interespecíficas foram de 3 a 97 pb (0,2 – 7,4%), sendo que a divergência de 3 pb ocorreu entre *H. nidulans* e *H. pannosa* ambas da Ásia.

Entre as amostras do estado de São Paulo as divergências interespecíficas foram de 62 a 100 pb (10,6% - 16,3%) para o marcador *cox1*; 9 a 15 pb (2,5 – 4,1%) para o marcador UPA e 42 a 88 pb (3,2 – 6,7 %) para o marcador *rbcL* (Tabela14).

Entre as amostras de São Paulo a divergência intraespecífica foi de 0 a 5 pb (0 - 0,9 %) para o marcador *cox1*, 0 a 1 pb (0 – 0,3%) para o UPA e 0 a 6 pb (0-0,5%) para o *rbcL*. Estes últimos referentes às amostras de *H. musciformis* e *H. cervicornis*, que possuíam mais de uma sequência para essa análise (Tabela14).

Tabela 14. Divergências interespecíficas e intraespecíficas para os marcadores *cox1*, UPA e *rbcL* entre as amostras do gênero *Hypnea* sequenciadas para este estudo.

Marcador	Interespecífica	Intraespecífica
<i>cox1</i>	62 – 100 pb (10,1 - 16,3%)	0 – 5 pb (0 - 0,9 %)
UPA	9 – 16 pb (2,5-4,4%)	0 – 1 pb (0 – 0,3%)
<i>rbcL</i>	42 – 88 pb (3,2 – 6,7%)	0 – 6 pb (0 – 0,5%)

4.3- Morfologia

As amostras coletadas foram separadas segundo as sequências do marcador *cox1*, e a morfologia destes grupos foram avaliadas separadamente. Caracteres morfológicos (Tabela 6) foram avaliados a fim de encontrar semelhanças nas morfologias dos indivíduos de um mesmo grupo.

Segundo a análise morfológica dos grupos encontrados e separados pelas divergências das sequências de *cox1*, esses grupos foram denominados de: *H.cervicornis*, *H.flexicaulis*, *H.musciformis*, *H.spinella*, *Hypnea* sp. 1 e *Hypnea* sp. 2.

Segue abaixo a descrição morfológica das espécies encontradas.

- 1- ***Hypnea cervicornis*** J. Agardh, *Spec. gen. et ord. algar.* 2(2): 337 [bis]-351 [bis] 352-506, 1851.

Localidade tipo: Índia Ocidental ou Ilhas Maurício

Figs. 6 - 13.

Plantas de coloração vermelha-rosada a amarronzada, medindo 1 - 4 cm de altura (Figuras 6-7). Alguns espécimes apresentaram perda de coloração pelo armazenamento em formol, e apresentaram coloração diferenciada nas fotos (Figura 7). Eixo principal distinguível, cilíndrico, de consistência delicada medindo de 3 – 5 cm (Figuras 6-7), apresentando ápice reto e levemente afinado, sem ganchos ou gavinhas (Figura 8). Ramificação em padrão alterno espiralado ou no mesmo plano, inseridas em ângulo agudo ou reto, mais densa nas partes mais basais do talo. Ramos de ordem primária com diâmetro pouco menor que o eixo principal (Figura 8). Ramos de ordem secundária com diâmetro menor que do eixo principal, levemente curvado em diferentes direções (Figura 8). Râmulos espinescentes presentes (Figuras 6-8). Anastomoses pouco frequentes. Em corte transversal na região subapical, diâmetro do eixo principal medindo de 218,9 – 547,5 μm (Figura 9). Talo com uma a duas camadas de células corticais de contorno arredondado (ovalado) com diâmetro de 6,2 -22,1 μm . Células axiais medindo de 31,3 – 49,55 μm (Figura 10), 5-6 células periaxiais por célula axial, com diâmetro de (33,8) 52,8 - 72,0 (91,1) μm (Figuras. 9-10). Espessamentos lenticulares raros, observados somente em uma amostra (Ilha do Bom Abrigo, Cananéia, SP - SPF57139) (Figuras 11-12). Tetrasporângios localizados na base de râmulos, zonados (Figura 13). Plantas femininas e masculinas não foram observadas.

Hábitat: Plantas crescendo no infralitoral e em áreas de costão exposto ao impacto de ondas, epilíticas ou epífitas em outras algas.

Material examinado: São Paulo - Ubatuba: Praia Vermelha do Sul, 13.x.2008, E.C.Oliveira, tetrasporófito (SPF56877); Praia Dura, 14.xi.2008 E.C.Oliveira & M.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF56881. **Cananéia:** Ilha do Bom Abrigo, 29.vi.2010, N.R.Guimarães, planta tetraspórica, SPF56887; Ilha do Bom Abrigo, 29.vi.2010, N.R.Guimarães, planta não fértil, SPF57140; Ilha do Bom Abrigo, 29.vi.2010, N.R.Guimarães, planta tetraspórica, SPF57142; Ilha do Cardoso, 30. vi.2010, N.R.Guimarães, planta tetraspórica, SPF57144.

Figuras 6-13. *Hypnea cervicornis*. Figuras 6 e 7. Aspecto geral do talo de *H.cervicornis*. Figura 8. Detalhe das ramificações e ápice. Figuras 9-11. Corte transversal da região subapical do talo mostrando células central (C) e pericentral (PC). Figura 12. Detalhe do espessamento lenticular (EL) da amostra SPF57139. Figura 13. Detalhe do râmulo com tetrasporângios.

- 2- ***Hypnea flexicaulis*** Yamagishi, Y. & Masuda, M. The species of *Hypnea* from Japan 6: 135-162, 1997.

Localidade tipo: Ikata, Ehime Prefecture, Japão.

Figs. 14-17.

Plantas de cor vermelho enegrecido, medindo 5 -7 cm. Eixo principal distinguível e cilíndrico (Figura 14). Terminação apical tanto dos eixos principais quanto das ramificações secundárias algumas vezes encurvadas, lembrando um gancho ou gavinha (Figura 15). Ramificações primárias com diâmetro pouco menor que o eixo principal, inseridas em ângulo agudo. Pode haver ou não râmulos espinescentes. Ramificações em padrão alterno (Figura 15). Em corte transversal, diâmetro do eixo principal medindo de 457,5 – 530,4 μm na porção subapical do talo. Células axiais medindo de 58,2 – 72,4 μm (Figura 16), 6 células periaxiais por célula axial, com diâmetro de 77,4 – 158,1 μm (Figuras 16-17). Espessamentos lenticulares ausentes. Plantas tetrasporofíticas, femininas e masculinas férteis não foram observadas.

Hábitat: infralitoral, 2 metros de profundidade.

Material examinado: Rio de Janeiro: Paraty: Saco do Mamanguá, 20.xi.2009, E.C.Oliveira; planta não fértil, SPF56540.

Figuras 14-17. *H. flexicaulis*. Figura 14. Aspecto geral do talo de *H. flexicaulis*.
Figura 15. Detalhe das ramificações e ápice. Figuras 16-17. Corte transversal da região subapical do talo mostrando células central (C) e pericentral (Pc).

- 3- ***Hypnea musciformis*** (Wulfen) J.V.Lamouroux. Annls. Mus. Hist. nat., Paris 20: 21-47, 115-139, 267-293, Figs. 7-13, 1813

Basiônimo: *Fucus musciformis* (Wulfen in Jacquin), 1791

Localidade tipo: Trieste, Itália.

Figs. 18 - 23

Plantas de coloração esverdeada a vinho-enegrecidas, com 3 - 7 cm de altura (Figura 18-19). Eixos principais distinguíveis, cilíndricos, de consistência rígida ou carnosa, presença de ramos com ápices em forma de ganchos ou gavinhas (Figuras 18-19). Râmulos espinescentes dispostos predominantemente de forma unilateral (Figura 20). Ramificação irregular com predominância de ramificação alterna, em ângulo agudo ou quase reto, com até três ordens de ramificação (Figura 20). Muitas vezes, as ramificações secundárias aparecem de um lado só do ramo primário. Anastomoses ausentes. Em corte transversal da região subapical, diâmetro do eixo principal uniforme, medindo de 266,1 – 622,2 µm; 1 a 2 camadas de células corticais oval-arredondadas com diâmetro de 6,0 – 14,8 µm (Figura 21). Células axiais medindo de 42,1 – 83,3 µm; 5-8 células periaxiais por célula axial, com diâmetro de 20,0 – 66,9 (79,2) µm (Figura 21). Espessamentos lenticulares ausentes. Tetrasporângios localizados na base ou em volta do râmulo, zonados (Figura 22). Cistocarpos globosos medindo 456 – 537,7 µm (Figura 23). Plantas masculinas não foram observadas.

Hábitat: Plantas crescendo em locais batidos como epífitas em algas do gênero *Sargassum* C.Agardh ou em outras espécies de *Hypnea*, ou ainda epilíticamente.

Material examinado: São Paulo: Ubatuba: Praia Vermelha do Sul, 13.x.2008, E.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF56878; Praia do Costa, 16.x.2008, M.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF56883. **São Sebastião:** Praia das Cigarras 08.v.2009, M.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF56888. **Itanhaém:** Praia dos Sonhos, v.2010, N.R.Guimarães, planta feminina, SPF56891.

Comentários: Os espécimes coletados na Praia dos Sonhos, em Itanhaém (Figura 2) foram previamente identificados como *Hypnea nigrescens* segundo Schenkman (1986). Porém, os estudos moleculares mostraram que os espécimes identificados como *H. nigrescens* para o Estado de São Paulo correspondem a uma variação morfológica de *H. musciformis*. Os espécimes previamente identificados como *H. nigrescens* apresentam talo com coloração vináceo-enegrecida, vários eixos eretos com o mesmo comprimento, lembrando as cerdas

de um pincel, e poucos ramos com gavinhas. Estas características foram encontradas em espécimes coletados em locais diretamente expostos ao impacto de ondas.

Figuras 18-23. *Hypnea.musciformis*. Figuras 18 e 19. Aspecto geral do talo. Figura 20. Detalhe das ramificações e ápices com gavinhas. Figura 21. Corte transversal da região subapical do talo. Figura 22. Detalhe do râmulo com tetrasporângios. Figura 23. Detalhe do cistocarpo.

- 4- ***Hypnea spinella*** (C.Agardh) Kützing. Diagnosen und Bemerkungen zu neuen oder kritischen Algen 5: 1-5, 22-25, 33-38, 52-55, 164-167, 177-180, 193-198, 219-223, 1847

Basiônimo: *Sphaerococcus spinellus* C. Agardh Spec. Algar. 2: 323; 1822.

Localidade tipo: Índia Ocidental

Figs. 24 - 29

Plantas formando tufo densos, relativamente prostrados, com ramos fortemente entrelaçados por anastomoses abundantes, de coloração vermelho-pálida a vermelho-escuro, medindo 2 - 4 cm. Eixo principal indistinguível (Figuras 24-25). Talo cilíndrico, de consistência delicada, com padrão de ramificação irregular a alternado, com pequena distância entre os ramos em algumas partes do talo, podendo aparentar padrão oposto de ramificação (Figuras 25-26). Apresentam ápices retos e algumas vezes bifurcados, sem ganchos ou gavinhas. Râmulo espinoso reto (Figura 26). Em corte transversal, diâmetro da ramificação medindo de 223,7 – 520,8 µm na porção subapical do talo (Figura 27). Talo com uma a duas camadas de células corticais arredondadas (ovaladas) com diâmetro de 8,6 - 13,9 µm. Células axiais medindo de 45,8 – 78,7 µm, 5 - 6 células periaxiais por célula axial, com diâmetro de 32,2 – 102,5 µm (Figura 28). Espessamentos lenticulares ausentes (Figura 28). Tetrasporângios localizados em volta da base dos râmulos, zonados (Figura 29). Plantas femininas e masculinas não foram observadas.

Hábitat: Plantas crescendo em local de costão exposto ao impacto de ondas ou infralitoral, associadas frequentemente a coralináceas, sendo difícil separar os ramos sem parti-los.

Material examinado: **São Paulo - Ubatuba:** Praia Vermelha do Sul (13.x.2008) E.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF56879. Domingas Dias (16.iii.2010), S.M.P.B.Guimarães & M.T. Fujii, planta tetraspórica, SPF57037; **São Sebastião: Ilhabela:** Saco do Poço, 31.x.2008, M.C.Oliveira, planta tetraspórica, SPF 56884.

Figuras 24-29. *Hypnea spinella*. Figuras 24-25. Aspecto geral do talo. Figura 26. Detalhe das ramificações e ápices. Figuras 27. Corte transversal da região subapical do talo. Figura 28. Detalhe das células central (C) e pericentrais (Pc) no corte transversa. Figura 29. Detalhe do râmulo com tetrasporângios.

5- *Hypnea* sp. 1

Figs. 30-34

Plantas formando emaranhado ou tapete de ramos de coloração vermelho -rosada (forte), medindo 1,5 - 3 cm de altura (Figura 30). Os espécimes apresentaram perda de coloração pelo armazenamento em formol, e aparece com coloração diferenciada nas fotos (Figura 30). Eixo principal distinguível, cilíndrico, de consistência delicada, apresentando ápice reto e levemente afinado, sem ganchos ou gavinhas (Figura 30). Ramificação irregular, em ângulo agudo ou reto, mais densa nas partes mais velhas do talo (Figura 31). Ramos de ordem primária com diâmetro pouco menor que o eixo principal. Ramos de ordem secundária com diâmetro visivelmente menor que do eixo principal, curtos e mais finos no ápice (Figura 31). Anastomoses presentes. Em corte transversal da região subapical do talo, diâmetro do eixo principal uniforme, medindo de 181,4 – 252,7 μm (Figuras 32-33). Talo com uma a duas camadas de células corticais de contorno arredondado (ovalado). Células axiais medindo de 26,5 – 33,3 μm (Figura 32). Cada célula axial produz 5-6 células periaxiais, com diâmetro de 23,3 – 63,2 μm . Espessamentos lenticulares abundantes (Figura 32-33). Tetrasporângios localizados na parte mediana dos râmulos, zonados (Figura 34). Plantas femininas e masculinas não foram observadas.

Hábitat: Plantas crescendo em áreas de costão exposto ao impacto de ondas, epífitas sobre outras algas, e encontrada em poça de maré.

Material examinado: São Paulo - Ubatuba: Pincinguaba, 17.iii.2010, M.C.Oliveira & M.B.B.Barreto, planta tetraspórica, SPF57044 e Praia Vermelha do Sul, 18.iii.2010, N.R.Guimarães, planta tetraspórica, SPF57045.

Figuras 30 - 34. *Hypnea* sp. 1. Figura 30. Aspecto geral do talo. Figura 31. Detalhe das ramificações e ápices. Figuras 32. Corte transversal da região subapical do talo mostrando células central (C) e pericentral (Pc). Figura 33. Detalhe do espessamento lenticular (EL) no corte transversal. Figura 34. Detalhe do râmulo com tetrasporângios.

6- *Hypnea* sp. 2

Figs. 35-39

Plantas formando emaranhado de ramos de coloração avermelhada medindo 6 cm de altura. Eixo principal distinguível, cilíndrico, de consistência carnosa apresentando ápice reto sem ganchos ou gavinhas (Figura 35). Ramificação irregular, com predominância de ramificações opostas em ângulo agudo ou reto, mais densa nas partes mais basais do talo. Ramos de ordem primária com diâmetro visivelmente menor que o eixo principal. Ramos de segunda ordem com diâmetro pouco menor que os de primeira ordem. Râmulo espinescentes presentes (Figura 35). Anastomoses ausentes. Em corte transversal da região subapical, diâmetro do eixo principal medindo, na porção subapical, de 366,1 – 415,7 μm (Figura 36). Talo com uma a duas camadas de células corticais de contorno arredondado (ovalado) com diâmetro de 13,5 – 16,1 μm (Figura 36). Células axiais medindo de (19,7) 33,8 – 49,9 μm (Figura 37). Cada célula axial 5 - 6 células periaxiais, com diâmetro de (33,6) 50,5 – 116,2 μm (Figura 36-37). Espessamentos lenticulares ausentes. Tetrasporângios localizados na base, envolvendo os râmulo ou em um único lado do râmulo zonados (Figura 38). Plantas femininas e masculinas não foram observadas.

Habitat: As plantas coletadas cresciam em local de costão batido.

Material examinado: São Paulo - São Sebastião: Praia das Cigarras, 27.v.2002, S.M.P.B.Guimarães, planta tetraspórica, SP390803.

Comentários: Descrição da morfologia de espécimes cultivados em laboratório (Figura 39): Plantas de cor laranja a vermelho-pálido, medindo aproximadamente 3 cm de altura. Eixo principal distinguível, cilíndrico, com diâmetro maior do que o das ramificações, medindo aproximadamente 300 μm . Ramificações cilíndricas, inseridas em ângulo agudo ou reto, mais abundantes nas partes mais velhas do talo. Ápices sem ganchos ou gavinhas. Não apresenta anastomoses. Râmulo espinescentes retos ou levemente curvados.

Figuras 35 - 39. *Hypnea* sp. 2. Figura 35. Aspecto geral do talo. Figura 36. Corte transversal da região subapical do talo com células central (C) e pericentral (Pc). Figura 37. Detalhe das células corticais no corte transversal. Figura 38. Detalhe do ramo com tetrasporângios. Figura 39. Aspecto geral da planta cultivada em laboratório.

Tabela 15. Características morfológicas das espécies do gênero *Hypnea* analisadas neste trabalho.

Característica morfológica	<i>H. cervicornis</i>	<i>H. flexicaulis</i>	<i>H. musciformis</i>	<i>H. spinella</i>	<i>Hypnea</i> sp1	<i>Hypnea</i> sp2
Tamanho	1-3 cm	5 – 7 cm	3 -7 cm	2 -4 cm	1,5 – 3 cm	6 cm
Eixo principal	distinguível	distinguível	distinguível	indistinguível	distinguível	distinguível
Cor	vermelho-rosada a amarronzada	vermelho-enegrecido	esverdeada /vinho-enegrecida	vermelho-pálida	vermelho- rosado/forte	vermelho
Anastomoses	raras	ausentes	ausentes	abundantes	presentes	ausentes
Gavinhas	ausentes	raras	presentes	ausentes	ausentes	ausentes
Padrão de ramificação	alerno/espiralado	alerno	irregular-alerno/espiralado	irregular-alerno/oposto	irregular	oposto
Ramificações (ângulo)	agudo/reto	agudo	agudo/reto	agudo/reto	agudo/reto	agudo/reto
Diâmetro do eixo principal/talo	218,9 - 547,5 µm	(65,4) 457,5 – 530,4 µm	266,1 – 622,2 µm	223,7 – 520,8 µm	181,4 – 252,7 µm	366,1 – 415,7 µm
Célula cortical	6,2 – 22,1 µm	não observado	6,0 – 14,8 µm	8,6 – 13,9 µm	não observado	13,5 – 16,1 µm
Célula axial	31,3 – 49,55 µm	58,2 – 72,4 µm	42,1 – 83,3 µm	45,8 – 78,7 µm	26,5 – 33,3 µm	(19,7) 33,8 – 49,9 µm
Nº de células periaxiais	5 - 6	6	5 - 8	6	5 - 6	5 - 6
Diâmetro células periaxiais	(33,8)52,8 – 72,0 (91,1) µm	77,4 – 158,1 µm	20,0 – 66,9 µm	32,2 – 102,5 µm	23,3 – 63,2 µm	(33,6)50,5 – 116,2 µm
Espessamentos lenticulares	raros	ausentes	ausentes	ausente	abundantes	ausente
Tetrasporângio	307,5 – 316,7 µm	não observados	580,4 – 939,8 (1166,1) µm	410,7 – 862,5 µm	196,3 – 320,3 µm	237,7 – 655,9 µm
Posição do tetrasporângio	envolvendo a base dos râmulos	não observado	envolvendo a base dos râmulos	envolvendo a base dos râmulos	parte mediana dos râmulos	envolvendo a base dos râmulos
Cistocarpo	não observados	não observado	456,0 – 537,7 µm	não observado	não observado	não observado

As amostras analisadas formaram seis agrupamentos baseados nos três marcadores moleculares e na análise da morfologia sendo denominadas de: *Hypnea cervicornis*. J. Agardh, *Hypnea flexicaulis*, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour, *H. spinella* (C. Agardh) Kutz, *Hypnea* sp.1 e *Hypnea* sp.2 (Tabela 16).

Tabela 16. Amostras identificadas pelo número de projeto (NºRhodo-SP), indicando local de coleta e número do voucher depositado nos herbários SP ou SPF. ** indicam voucher não localizados.

RHODO-SP	Espécie	Local de Coleta	Número de acesso
BOT0001	<i>Hypnea musciformis</i>	Espírito Santo	SP365646
BOT0002	<i>Hypnea musciformis</i>	Espírito Santo	SP365645
BOT0003	<i>Hypnea</i> sp.2	São Sebastião,SP	SP 390803
BOT0004	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SP 390804
BOT0005	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba,SP	SP 365557
IBC0028	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SPF56877
IBC0040	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba,SP	SPF56878
IBC0041	<i>Hypnea spinella</i>	Ubatuba,SP	SPF56879
IBC0051	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SPF56880
IBC0064	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SPF56881
IBC0067	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba,SP	SPF56882
IBC0089	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba, SP	SPF57008
IBC0098	<i>Hypnea musciformis</i>	São Sebastião, SP	SPF56883
IBC0123	<i>Hypnea musciformis</i>	São Sebastião, SP	SPF57009
IBC0129	<i>Hypnea spinella</i>	São Sebastião,SP	SPF56884
IBC0137	<i>Hypnea musciformis</i>	São Sebastião,SP	SPF56888
IBC0138	<i>Hypnea musciformis</i>	São Sebastião,SP	SPF56886
IBC0139	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SPF56887
IBC0184	<i>Hypnea spinella</i>	Ubatuba,SP	SPF57011
IBC0185	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba,SP	SPF57012
IBC0186	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba,SP	SPF56889
IBC0187	<i>Hypnea musciformis</i>	Itanhaém,SP	SPF56890
IBC0188	<i>Hypnea musciformis</i>	Itanhaém,SP	SPF56891
IBC0189	<i>Hypnea musciformis</i>	Paraty,RJ	SPF56539
IBC0190	<i>Hypnea flexicaulis</i>	Paraty, RJ	SPF56540
IBC0194	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba , SP	SPF57029
IBC0195	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57030
IBC0196	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba, SP	SPF57031
IBC0197	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57032
IBC0198	<i>Hypnea spinella</i>	Ubatuba, SP	**
IBC0199	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba, SP	SPF57033
IBC0200	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57034
IBC0201	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57035
IBC0202	<i>Hypnea musciformis</i>	Ubatuba, SP	SPF57036
IBC0203	<i>Hypnea spinella</i>	Ubatuba, SP	SPF57037

Tabela 16. Continuação.

RHODO-SP	Espécie	Local de Coleta	Número de acesso
IBC0204	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57038
IBC0205	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	**
IBC0206	<i>Hypnea sp.</i>	Ubatuba, SP	SPF57039
IBC0210	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57043
IBC0211	<i>Hypnea sp.1</i>	Ubatuba, SP	SPF57044
IBC0212	<i>Hypnea sp.1</i>	Ubatuba, SP	SPF57045
IBC0213	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57046
IBC0214	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57047
IBC0216	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57049
IBC0217	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57050
IBC242	<i>Hypnea cervicornis</i>	Ubatuba, SP	SPF57051
IBC243	<i>Hypnea musciformis</i>	Itanhaém, SP	SPF57052
IBC244	<i>Hypnea musciformis</i>	Cananéia, SP	SPF57053
IBC0245	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57139
IBC0246	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57140
IBC0247	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57141
IBC0248	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57142
IBC0249	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57143
IBC0250	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57144
IBC0251	<i>Hypnea cervicornis</i>	Cananéia, SP	SPF57145
IBC0252	<i>Hypnea cervicornis</i>	Itanhaém, SP	SPF57146

5- Discussão

5.1- Marcadores Moleculares e Filogenia

Baseando-se nas análises moleculares e morfológicas, indicamos a existência de cinco espécies do gênero *Hypnea* para o estado de São Paulo: *H. cervicornis*, *H. musciformis*, *H. spinella*, *Hypnea sp.1*, *Hypnea sp.2*. Uma sexta espécie, *H. flexicaulis*, foi coletada no litoral sul do Rio de Janeiro.

Nas análises realizadas os três marcadores, *cox1*, *UPA* e *rbcL*, confirmaram a separação das seis espécies. Os marcadores *cox1* e *UPA*, respectivamente dos genomas mitocondrial e do cloroplasto, se mostraram eficientes na separação das espécies do gênero *Hypnea*, corroborando com outros trabalhos que utilizam esses marcadores como “DNA barcodes” (Geraldino *et al.* 2006, 2009 e 2010; Sherwood *et al.* 2010).

A divergência interespecífica do marcador *cox1*, para as amostras deste estudo, apresentou valores próximos aos encontrados para o gênero em outros locais (Geraldino *et al.* 2009, 2010). Porém, divergência mínima de 10,1% foi superior ao valor proposto por Saunders (2005) de 4,5% (Tabela 17) para as Rhodophyta de forma geral, justificando a separação das seis entidades taxonômicas em espécies diferentes. Os valores observados neste trabalho encontram-se mais próximos dos valores descritos por Geraldino *et al.* 2009 para espécies de *Hypnea* da Ásia.

A variação intraespecífica do marcador *cox1*, para as amostras deste estudo está próximo aos valores observados em estudos com *Hypnea* para outras regiões. Ainda que seu valor máximo seja menor que o observado nesses estudos, ele está bem próximo aos valores observados nos estudos com Rhodophyta (Tabela 17).

Os resultados indicam que a discriminação a nível específico é possível com a utilização do marcador *cox1*, corroborando os resultados de Saunders (2005) e dos estudos realizados com o gênero *Hypnea* (Yamagishi & Masuda 2000, Yamagishi *et al.* 2003; Geraldino *et al.* 2006, 2009 e 2010). As divergências observadas para o marcador *cox1* neste estudo, em relação aos outros marcadores utilizados mostrou-se mais alto, o que indica uma maior capacidade de distinção das espécies proximamente relacionadas. A amplificação do *cox1* para as amostras de *Hypnea* nesse estudo foi relativamente fácil utilizando os “primers” e protocolos propostos por Saunders (2005); o mesmo foi observado para o sequenciamento. M.C. Oliveira (comunicação pessoal) afirma que para outros gêneros de Rhodophyta tem sido observada alguma dificuldade na amplificação e sequenciamento do marcador *cox1*.

A divergência interespecífica observada para o marcador UPA entre as amostras deste estudo possui um valor dentro do observado por Clarkston & Saunders (2010) (Tabela 17). A divergência intraespecífica do marcador UPA (obtida apenas para as amostras de *H. cervicornis* e *H. musciformis*) entre as amostras do estado de São Paulo também são próximas aos valores apresentados por Clarkston & Saunders (2010) (Tabela 17).

O marcador UPA tem sido testado apenas mais recentemente para o “DNA barcoding” por isso ainda não possui muitas sequências disponíveis no banco de dados (GenBank). Entretanto, Sherwood *et al.* (2010) e Clarkston & Saunders (2010) usaram esse marcador com sucesso para separação de espécies de Rhodophyta do Havaí e do gênero Kallymeniaceae do Canadá, respectivamente. Sendo assim, as sequências do gênero *Hypnea* de Sherwood *et al.* (2010), disponíveis no banco de dados, foram utilizadas para a análise de NJ do marcador UPA no presente estudo. Nas árvores apresentadas, percebe-se uma discrepância entre os dados das espécies do Havaí e das amostras de São Paulo. As amostras do estado de São Paulo que

possuíam mais de uma sequência na análise ficaram agrupadas num mesmo clado, corroborando sua identidade e sua separação taxonômica em relação aos outros grupos. Porém, as amostras do Havaí representantes de uma mesma espécie aparecem distribuídas em diferentes clados (*i.e.* *H. musciformis* e *H. valentiae*). Segundo A. Sherwood (comunicação pessoal) a identificação das espécies de *Hypnea* no Havaí é bastante problemática, e nem todas as amostras que constam do banco de sequências tiveram a sua morfologia detalhada. Ainda, segundo a pesquisadora, os nomes utilizados para as amostras do Havaí são provisórios. No caso das amostras brasileiras, o marcador UPA mostrou eficácia na separação de espécies para o gênero *Hypnea*, corroborando com os outros marcadores utilizados.

Sherwood *et al.* (2010) afirmam que o marcador UPA deve ser considerado para futuros levantamentos de biodiversidade de algas pela capacidade observada na resolução de problemas taxonômicos. Clarkston & Saunders (2010) afirmam que o marcador UPA pode apresentar baixa capacidade na separação de espécies proximamente relacionadas, subestimando a diversidade, sendo assim necessários mais estudos para seu uso como “DNA barcode”. Embora o UPA tenha sido aplicado com sucesso na separação das espécies de *Hypnea* analisadas neste trabalho, acreditamos que mais estudos devem ser realizados com este marcador, a fim de estabelecer sua eficácia para os diferentes gêneros de Rhodophyta, assim como estabelecer seus limites de confiança (variações intra e interespecíficas).

As análises de *rbcL* neste trabalho, assim como em estudos mais recentes com o gênero (Yamagishi & Masuda 2000, Yamagishi *et al.* 2003, Geraldino *et al.* 2006, Geraldino *et al.* 2009 e Geraldino *et al.* 2010), mostraram-se robustas para a abordagem das relações filogenéticas entre as espécies de *Hypnea*.

A variação interespecífica observada para o marcador *rbcL*, comparando as amostras sequenciadas neste estudo tem valor máximo próximo aos resultados apresentados em outros estudos (Tabela 17) sendo mais próximos aos de Yamagishi & Masuda 2000 e Geraldino *et al.* 2009, que estudaram respectivamente, amostras de *H. charoides* do Japão e *H. asiatica* da Coreia, Japão e Taiwan. O valor mínimo encontrado entre as amostras brasileiras foi de 3,2%, o que corrobora a existência de pelo menos seis espécies de *Hypnea* na costa brasileira. Comparando-se as sequências de *rbcL* das espécies brasileiras com as de outras espécies de *Hypnea* disponíveis no GenBank o valor mínimo de divergência interespecífica é observado entre as espécies asiáticas *H. japônica*, *H. boergesenii*, *H. nidulans* e *H. pannosa* que é de 0,2% para esse marcador, o que indica a necessidade de revisão nesses táxons.

A divergência intraespecífica para o marcador *rbcl*, considerando apenas as amostras sequenciadas neste trabalho, apresentou valores dentro do observado em outros estudos com o gênero *Hypnea* em outras regiões do mundo (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação entre divergências inter e intraespecíficas com espécies do gênero *Hypnea* e para Rhodophyta em geral. Sublinhados os valores obtidos utilizando somente as amostras deste estudo.

Referência		Divergência Interespecífica			Divergência Intraespecífica		
		<i>rbcl</i>	<i>cox1</i>	UPA	<i>rbcl</i>	<i>cox1</i>	UPA
<i>Hypnea</i>	Yamagishi & Masuda 2000	71 - 88pb (5,3 - 6,6%)	*	*	*	*	*
	Yamagishi <i>et al</i> 2003	16 - 96pb (1,2 - 7,2%)	*	*	0-3pb (0 - 0,2%)	*	*
	Geraldino <i>et al</i> 2006	*	*	*	1 - 5pb (0,06-0,33%)	1 - 34pb (7,2-24,47%)	*
	Geraldino <i>et al</i> 2009	58 - 96bp (4,2 - 7 %)	157-165pb (11,53-12,12%)	*	5pb (0,37%)	28pb (2,06%)	*
	Geraldino <i>et al</i> 2010	18 - 93pb (1,3 - 6,8%)	50 -162pb (4-13%)	*	2 - 8pb (0,1-0,5%)	8 - 59pb (0,6-4,7%)	*
<i>Hypnea</i>	Este trabalho	3 - 97 pb (0,2 - 7,4%) <u>42 - 88 pb</u> <u>(3,2 - 6,7 %)</u>	0 - 74 pb (0 - 36,5%) <u>62 - 100 pb</u> <u>(10,1 - 16,3%)</u>	<u>9 - 16 pb</u> <u>(2,5-4,4%)</u>	<u>0 - 6 pb</u> <u>(0 - 0,5%)</u>	<u>0 - 5 pb</u> <u>(0 - 0,9 %)</u>	<u>0 - 6,5 pb</u> <u>(0 - 0,3%)</u>
<i>Rhodophyta</i>	Saunders (2005)	*	> 30pb (> 4,5%)	*	*	0 - 2pb (0-0,3%)	*
	Sherwood <i>et al.</i> (2010)	*	*	*	*	~3,5 pb (0-0,5%)	~2,1 pb (0-0,3%)
	Clarkston & Saunders (2010)		29,8pb (> 4.5%)	2,9-23 pb (0.8- 6.2%.)	*	0-5,9 pb (0-0.9%)	0-1,0 pb (0-0,27%)
	Robba (2006)	*	28 - 48pb (5,2-27,7%)	*	*	0 - 4pb (0-0,7%)	*

* indica dados não apresentados nas referências.

As análises filogenéticas para as sequências de *rbcl* mostram que os espécimes brasileiros estão espalhados nos ramos principais e tem como grupos mais proximamente relacionados espécimes da região Pacífica. Uma análise incluindo outras amostras de *Hypnea* para a região do Atlântico poderá esclarecer melhor a origem e distribuição das diferentes espécies.

5.2- *Hypnea cervicornis* X *Hypnea spinella*

Shenckman (1986) citou para o Estado de São Paulo seis espécies (Tabela 3), sendo duas delas *H. cervicornis* e *H. spinella*. A autora fala da dificuldade da separação dessas duas espécies em relação aos caracteres morfológicos e

apresentou resultados de cultura onde *H. cervicornis* cresce com talo muito semelhante à *H. spinella*, porém com sutis diferenças em relação às ramificações. A autora citou ainda o fato de que a observação dos materiais tipo (Hb. Ag.) não foi muito esclarecedora, porque os tipos encontravam-se mal herborizados e não traziam informações sobre local de coleta e coletor.

Muitos autores, também citados por Schenkman (1986), apontavam a possibilidade de estas espécies serem morfotipos da mesma espécie, sendo um presente em ambientes mais protegidos (*H. cervicornis*) e outros em locais de maior ação das ondas (*H. spinella*); ou ainda uma terceira espécie, podendo ser esta *H. divaricata* ou *H. cenomyce*. No entanto, Schenkman (1986) concluiu que a separação das espécies deveria ser mantida até que todas as possibilidades de sinonímia fossem avaliadas detalhadamente.

Haroun & Prud'Homme van Reine (1993) sugerem, como já citado, a junção de *H. cervicornis* e *H. spinella* afirmando que espécimes de morfologia intermediária haviam sido observados. A partir deste trabalho muito autores têm adotado essa sinonímia (Yamagishi 2000, Geraldino *et al.* 2006, Lucio 2009),

As amostras coletadas em diferentes pontos do litoral do estado de São Paulo nomeadas previamente, baseado na morfologia, como *H. cervicornis* ou *H. spinella* formaram, segundo as análises do marcador *cox1*, dois grupos diferentes. Essas análises do marcador *cox1*, confirmadas pelos marcadores UPA e *rbcL*, mostram que se tratam de duas espécies diferentes e não proximamente relacionadas conforme a análise do *rbcL*.

Após a observação detalhada de suas morfologias, comprando-as com literaturas e descrições originais das espécies, os dois grupos foram nomeados *H. cervicornis* e *H. spinella*, corroborando com Abbot (1999) e Guimarães (2006). Sendo que *H. spinella* apresenta talo em forma de tapete emaranhado, sem um eixo principal distinto, com anastomoses abundantes, enquanto *H. cervicornis* apresenta um eixo principal distinto e ramificações levemente curvadas em relação ao ramo principal e anastomoses raras ou ausentes. Nenhum espécime intermediário foi encontrado e pudemos observar a presença de *H. cervicornis* em ambientes de maior ação de ondas e em locais mais protegidos.

Na comparação com as sequências disponíveis de *rbcL* no banco de dados, *H. spinella* de São Paulo não correspondeu ao espécime nomeado no banco como *H. spinella*, proveniente do Japão, sendo que a amostra brasileira foi mais proximamente relacionada com *Hypnea* sp. IzuH1 e *Hypnea valentiae* (97% de identidade). O mesmo aconteceu com as sequências de *cox1* e UPA de *H. spinella*, todas da região do Oceano Pacífico.

A localidade tipo de *H. spinella*, referida como “*India Occidentalis*”, é vaga e não indica a região específica do local onde foi coletada. O termo é normalmente associado à região do Caribe, logo sugerimos que o nosso espécime designado de *H. spinella* estaria mais próximo da localidade tipo do que as demais amostras do Japão. Além disso, sugerimos que um estudo detalhado dos documentos e espécimes de herbários referentes à localidade tipo deva ser realizado, a fim de estabelecer corretamente esta localidade.

Para *H. cervicornis* não existiam sequências nos bancos de dados para *rbcl*, apenas para *cox1* e UPA, ambas para o Havaí, e que não se agruparam com as *H. cervicornis* coletadas no Brasil. A localidade tipo de *H. cervicornis* é desconhecida. Alguns autores citam que a probabilidade de que essa localidade seja Ilhas Maurício, mas não existem comprovações em relação a isso.

5.3- *Hypnea musciformis* X *Hypnea nigrescens*

Outra espécie controversa, citada por Schenkman (1986) foi *H. nigrescens*, que no referido trabalho teve sua primeira citação para o Brasil e para o Oceano Atlântico. No Estado de São Paulo, Schenkman (1986) cita espécimes coletados em Peruíbe, Itanhaém, Ilha do Cardoso e Ubatuba. No presente estudo somente em Itanhaém foram encontrados espécimes que correspondiam à morfologia citada por Schenkman como *H. nigrescens*. Estas amostras (SPF56891), provenientes da Praia dos Sonhos, segundo as análises moleculares de *cox1* e *rbcl* foram identificadas como *H. musciformis*. Apesar de não apresentar a morfologia externa típica dos outros espécimes de *H. musciformis* (cor esverdeada, epífita e com gavinhas abundantes) (Fig.18 e 19), em corte transversal, essas amostras possuem a mesma anatomia de *H. musciformis*. Além disso, em alguns dos espécimes coletados, foram observadas algumas gavinhas que são tipicamente encontradas em *H. musciformis*. Estes espécimes com morfologia do tipo “*nigrescens*” foram encontrados em um habitat onde existe grande impacto das ondas e da maré, fixo à rocha por apressórios resistentes e expostos à grande radiação solar. Após a análise morfológica e molecular, concluímos que a amostras identificadas como *H. nigrescens* para o estado de São Paulo são uma variação morfológica de *H. musciformis*. Segundo o Algaebase, *H. nigrescens* ocorre somente na região da Índia.

Em relação a *H. musciformis*, em nossas análises com os três marcadores, os espécimes de *H. musciformis* coletados no Brasil aparecem como grupo irmão de *H. musciformis* de outras regiões, incluindo amostras do Pacífico (Havaí) e do Atlântico

Norte. A divergência encontrada entre as sequências brasileiras de *H. musciformis* e as sequências de outras regiões (0,1 – 1,9 % para o *rbcL* do Atlântico Norte; 1,4 – 1,7% para o UPA; e 4,3 – 4,6% para o *cox1*) pode indicar que essa espécie é na verdade um complexo, que necessita maiores estudos avaliando sua variação intraespecífica.

5.4- *Hypnea flexicaulis*

H. flexicaulis foi descrita como uma espécie nova por Yamagishi & Masuda (2000) em estudo com espécimes de *Hypnea* do complexo *charoides-valentiae* no Japão. Yamagishi & Masuda (2000) afirmam que a alga por eles coletada teria morfologia semelhante à alga que chamavam de *H. cervicornis* no Japão. Porém, adotando a sinonímia proposta por Haroun & Prud'homme van Reine (1993) e afirmando que a nova espécie também não se encaixava na descrição original de *Hypnea spinella* C. Agardh (1822) nem de *H. cervicornis* J. Agardh (1852), Yamagishi & Masuda (2000) determinaram, assim, uma nova espécie, *Hypnea flexicaulis*.

O espécime coletado no município de Paraty (SPF56540), Rio de Janeiro (Brasil) foi separado das demais amostras coletadas para o Estado de São Paulo pelas sequências de *cox1* e UPA. O marcador *rbcL* corroborou este resultado e, na comparação com o banco de dados, este espécime obteve alta identidade (99%) com três espécies de ocorrência na Ásia: *Hypnea boergesenii*, *Hypnea flexicaulis* e *Hypnea japonica*. Após um estudo mais detalhado de sua morfologia, observamos que o aspecto geral do espécime coletado diferia de *H. boergesenii* (Masuda 1997) pelo aspecto do talo e disposição dos ramos. Ainda, em corte transversal, nossa amostra não apresentou espessamentos lenticulares como *H. boergesenii*. Em relação à *H. japonica* a morfologia externa também diferia pelo fato de nosso espécime possuir eixo central distinguível, contrário à espécie *H. japonica*; em relação ao corte transversal do eixo central, a conformação de suas células diferiam das de *H. japonica*, onde células centrais e pericentrais possuem espessamentos lenticulares e são distribuídas de forma descentralizada, não podendo ser distinguidas. Após a corroboração da semelhança morfoanatômica entre o espécime estudado e *H. flexicaulis* descrita por Yamagishi & Masuda (2000) o nome atribuído a este espécime foi *H. flexicaulis*; sendo assim a primeira citação dessa espécie para a região do Oceano Atlântico, assim como para o Brasil.

Na filogenia a partir do marcador *rbcL*, *H. flexicaulis* do Japão e Filipinas apresentaram uma divergência de 3 a 12 pb (0,2 – 0,9%) em relação à *H. flexicaulis*

de Paraty (RJ). Essa divergência é relativamente baixa corroborando a identificação específica pela morfologia. Na análise filogenética para o *rbcL* (Figura 5) o exemplar sequenciado por nós é o único para a região do Atlântico, sendo todos os demais de ocorrência no Pacífico. A ocorrência desta espécie no Brasil precisa ser melhor investigada para uma avaliação da possibilidade de que seja uma alga introduzida no país a partir da Ásia.

5.5- *Hypnea* sp.1 e *Hypnea* sp.2

Os dois espécimes (SPF57044 e SPF57045) identificados como *Hypnea* sp.1 foram coletados no litoral norte do estado de São Paulo, ambos em Ubatuba. Suas sequências determinadas pelo marcador *cox1*, se mostraram diferentes das outras espécies e este resultado foi corroborado pelos marcadores *rbcL* e UPA. Na comparação com o banco de dados suas sequências não apresentaram uma afinidade próxima com nenhuma das sequências disponíveis. Os estudos morfoanatômicos dos espécimes coletados mostraram uma grande semelhança destes com *Hypnea cenomyce* J.Agardh (1851). Esta espécie, *H. cenomyce*, foi citada para o Brasil por Yoneshigue (1985), Nunes (2005) e Guimarães (2006), respectivamente, para os estados do Rio de Janeiro, Bahia e Espírito Santo. Apesar das semelhanças, não podemos afirmar que as amostras de *Hypnea* sp.1 sejam, de fato, *Hypnea cenomyce*, devido ao limitado número de amostras e locais de coleta e à falta de confirmação com o as sequências disponíveis no banco de dados.

O espécime *Hypnea* sp.2 também possui apenas uma amostra (SP390803), mantida em cultura no Instituto de Botânica. Os espécimes coletados na natureza que deram origem à cultura, mantidos em formol, foram avaliados morfológicamente, mas sua identificação não pôde ser confirmada.

Uma vez que, temos disponíveis poucos exemplares destas duas espécies, achamos necessário obter e estudar mais materiais, afim de que estudos morfológicos e moleculares mais completos possam ser realizados e as espécies descritas.

6- Conclusão

Schenkman (1986) aponta a presença de seis espécies para o Estado de São Paulo: *H. cervicornis*, *H. cornuta*, *H. nigrescens*, *H. musciformis*, *H. spinella* e *H. valentiae* (Tabela 4). Das espécies citadas por Schenkman (1986) para o estado de São Paulo, não foram coletadas as espécies *H. valentiae* e *H. cornuta* no presente estudo. Estas espécies apresentam morfologias bem definidas e distintas, portanto seriam de fácil identificação dentre as amostras coletadas. No presente estudo, os espécimes identificados como *H. nigrescens* pelas suas características morfológicas apresentaram sequências idênticas a *H. musciformis*, indicando que *H. nigrescens* não ocorre no estado de São Paulo. Estudos detalhados da morfologia e dos dados moleculares de *H. nigrescens* provenientes de outros estados do litoral brasileiro são necessários para confirmar a existência desta entidade taxonômica no Brasil. As espécies de *H. cervicornis* e *H. spinella* não devem ser colocadas em sinonímia uma vez que suas características morfológicas e as diferenças nas sequências obtidas através dos três marcadores utilizados mostram que são duas espécies distintas. Citamos pela primeira vez a ocorrência da espécie *Hypnea flexicaulis* para o Oceano Atlântico. Por fim nossos dados apontam ainda para a existência de duas outras espécies de *Hypnea* ainda não identificadas. Os nossos resultados e os de Schenkman (1986) apontam, portanto, para a ocorrência de pelo menos sete espécies de *Hypnea* para o estado de São Paulo: *H. cervicornis*, *H. cornuta*, *H. musciformis*, *H. spinella*, *H. valentiae*, *Hypnea* sp.1 e *Hypnea* sp.2.

O gênero *Hypnea* possui uma plasticidade fenotípica muito grande e sua identificação através dos caracteres morfológicos vegetativos é, de fato, bastante problemática. Ainda mais quando somada às dúvidas apresentadas na literatura em relação ao local de coleta e descrição original dos tipos para as espécies. A utilização do *cox1* como um marcador para a separação das espécies do gênero (“DNA barcoding”) juntamente com as observações morfológicas é uma ferramenta poderosa que deve ser utilizada a fim de ajudar nas resoluções taxonômicas para este complexo grupo. Além do *cox1*, o UPA também se mostrou adequado para a distinção das espécies brasileiras de *Hypnea* analisadas e também pode ser utilizado como “DNA barcode”.

A utilização do marcador *rbcL* para inferir a filogenia no gênero *Hypnea*, também mostrou ser uma ferramenta bastante útil e complementar para confirmação da identidade das amostras analisadas. Além de permitir a detecção de alguns complexos específicos que devem ser analisados com maior cobertura geográfica.

Sugerimos ainda que, revisões regionais minuciosas unindo a taxonomia molecular e morfológica, a fim de estabelecer corretamente as espécies para o gênero *Hypnea*, seus caracteres morfológicos, assim como suas variações morfológicas e seus limites geográficos, ajudando, dessa forma, a solucionar os problemas de identificação. Por fim, os resultados desse trabalho corroboram que marcadores *cox1* e UPA são adequados para a separação a nível específico e que essa abordagem é indicada para a resolução dos problemas do gênero *Hypnea*.

Referências

- Abbott, I.A., 1999.** Marine red algae of the Hawaiian Islands. xv + 477 pp. Honolulu Museum Press, Honolulu, Hawaii.
- Agardh, J.G., 1851.** *Species genera et ordines algarum... Volumen secundum: algas florideas complectens*. Lundae [Lund]. XII+ 1291 pp. part 2, fasc.1, pp. 337-504.
- Agardh, J. G. 1852.** Algas florideas complectens. Part 2. In *Species genera et ordines algarum*. Vol. 2. Gleerup, Lund, pp. 337–720.
- 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 Research* 25:3389-3402.
- Bhattacharya, D. & Medlin, L. 1995.** The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* 31:489–98.
- Bhattacharya, D., Yoon, H. S. & Hackett, J. D. 2004.** Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays* 26:50–60.
- Berchez, F. A.S. & Oliveira, E.C. 1989.** Maricultural essays with the carragenophyte *Hypnea musciformis* in S.Paulo, Brazil. *Int.Foudation so science “cultivation of seaweed in Latin America”*, April 2-8, 1989.
- Bravin.I.C. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2002.** Influência de fatores ambientais sobre o crescimento *in vitro* de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta) *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.4, p.469-474, dez. 2002.
- Cavalier-Smith, T., 1998.** A revised six-Kingdom syste of life. *Biological Reviews* 73: 203-266.
- Chase M.W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar N. & Savolainen V. 2005.** Land plants and DNA barcoding: short-term and long-term goals. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360.
- Chiovitti A., Kraft, G.T., Bacic, A., Craik, D.J., Munro, S.L.A., & Liao, M.-L. 1998.** Carrageenans from Australian representa tives of the family Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), with description of *Calliblepharis celatospora* sp. nov., and transfer of *Austroclonium* to the family Areschougiaceae. *J. Phycol.* 34: 515–535.
- Clarkston B.E. & Saunders G.W. 2010.** A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, lorideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* 88: 119–131 (2010).
- Crichley, A.T. & Ohno, M. 1998.** Seaweed resources of the world. Japan International Cooperation Agency, Nagai, 431 pp.
- Delwiche, C. F., Kuhsel, M. & Palmer, J. D. 1995.** Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4:110–28.
- Delwiche, C. E, Kuhsel, M, & PALMER, J.D. 1995.** Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4: 110-128.
- De Salle, R., Egan, M.G. & Siddall M. 2005.** The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360(1462): 1905 -1916
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994.** DNA “primers”for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Fredericq, S., & Hommersand, M.H. 1989.** Proposal of the Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *J. Phycol.* 25: 213–227.

- Fredericq, S., Hommersand, M.H. & Freshwater, D.W. 1996.** The molecular systematics of some agar- and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327: 125-135.
- Fredricq, S. & Hommersand, M.H. 2003.** Biogeography of the marine red algae of the South African West Coast: a molecular approach. *Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium*. Oxford University Press, pg325-340.
- 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.
- Fujii, M.T., Barata, D., Chiracava, S. & Guimarães, S.M.P.B. 2008.** Anais do 99º Congresso Nacional de Botânica. Mesa-Redonda 29- Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável das Macroalgas p371.
- Garbary D. J. & P. W. Gabrielson 1990.** Taxonomy and evolution. *In* K. M. Cole and R. G. Sheath [eds.], *Biology of the red algae*, 477–498. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Geraldino, P.J.L., Yang, E.C. & Boo, S.M. 2006.** Morphology and Molecular Phylogeny of *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea *Algae Volume* 21(4): 417-423.
- Geraldino, P.J.L., Yang, E.C, Kim, M.S. & Boo, S.M. 2009.** Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU, plastid *rbcL*, and mitochondrial *cox1*. *TAXON* 58(2). 606-616.
- Geraldino, P.J.L., Riosmena-Rodriguez, R., Liao, L.M. & Boo, S.M. 2010.** Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta), with a description of *H.caespitosa* sp. nov. *J. Phycol.* 46, 336-345.
- Goff L.J., Moon D.A. & Coleman A.W. 1994.** Molecular delineation of species and species relationship in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology* 30:521-537.
- Graham, L.E. & Wilcox, L.W., 2009.** *Algae*. Prentice-Hall, New Jersey. 640 pp
- Greer, C.W., Shomer, I., Goldstein, M.E., & Yaphe, W. 1984.** Analysis of the carrageenan from *Hypnea musciformis* by using - and -carrageenases and ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 129: 189–196.
- Guimarães. S.M.P.B. 2006.** A revised checklist of benthic Rhodophyta from the State of Espírito Santo, Brazil. – *Boletim do Instituto de Botânica* Nº 17: 143 - 194
- Hagopian, J.C., Reis, M., Kitajima, J.P., Bhattacharya, D. & Oliveira, M.C. 2004.** Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights on the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *Journal of Molecular Evolution* 59(4): 464-477.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. & Hickey, D.A. 2007.** DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics* Vol.23 No.4.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Haroun, R.J. e Prud'Homme van Reine, W.F. 1993.** A Biogeographical study of Laurencia and *Hypnea* species of the Macaronesian Region. *Courier Forsch –Inst. Senckenberg* 159:119-125.
- Harper, J. T. & Saunders, G. W., 2001.** Molecular systematics of the Florideophycieae (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data. *Journal of Phycology* 37 (6): 1073-1082.

- Herbert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & deWaard J.R. 2003.** Biological identifications through DNA barcoding. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 270: 313-322.
- Hommersand, M.H., Fredericq, S. & Freshwater, D.W. 1994.** Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on sequence analysis of rbcL. *Botanica Marina* 1994, vol. 37, n 3, pp. 193-203.
- Hommersand, M.H. & Fredericq, S. 2003.** Biogeographical of the marine red algae of the South African West Coast: a molecular approach. *Seventeenth International Seaweed Symposium: Proceedings of the Seventeenth International Seaweed Symposium* pp 325-336.
- Horta P.A., Amancio E., Coimbra C.S. & Oliveira E.C. 2001.** Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas Brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265
- Huelsenbeck, J.P., & Ronquist, F.R. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Hughey, J. R., Silva, P. C. & Hommersand, M. H. 2001.** Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinaceae (Rhodophyta) using DNA from type material. *J. Phycol.* 37, 1091-1109. (doi:10.1046/j.1529 - 8817.2001.01048.x.)
- John, D.M., Prud'homme van Reine, W.F., Lawson, G.W., Kostermans, T.B. & Price, J.H., 2004.** A taxonomic and geographical catalogue of the seaweeds of the western coast of Africa and adjacent islands. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 127: 1-339, 1 fig.
- Kraft, G.T. & Robins, P.A., 1985.** Is the Order Cryptonemiales (Rhodophyta) defensible? *Phycologia* 24: 67-77.
- Knowlton, N. & Weigt, L. A. 1998.** New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 2257-2263. (DOI 10.1098/rspb.1998.0568.)
- Knutsen, S.H., Murano, E., D'Amato, M., Toffanin, R., Rizzo, R. & Paoletti, S. 1995.** Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*. *J. Appl. Phycol.* 7: 565-576.
- Kützting, F.T. 1849.** *Species Algarum*, Lipsidae [Leipzig]. VI + 922 pp.
- Kylin, H. 1930.** Über die entwicklungsgeschichte der Florideen. *Lunds Univ. Årsskr. N.F. Avd. 2*, 24: 1-127.
- Kylin, H. 1932.** Die Florideenordnung Gigartinales. *Lunds Univ. Årsskr. N.F. Avd. 2*, 28: 1-88, Plates 1-28.
- Kylin, H. 1956.** Die Gattungen der Rhodophyceen. C. W. K. Gleerups Förlag, Lund.
- Lamouroux, J.V. 1813.** Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulées. *Annales du Muséum d'Histoire Naturelle* [Paris] 20: 21-47, 115-139, 267-293, pls. 7-13.
- 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. Phylogenet. Evol.* 43(3): 1118-1130. doi:10.1016/j.ympev.2006.11.012. PMID:17197199.
- Littler, D.S. & Littler, M.M., 2000.** *Caribbean reef plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico.* Offshore Graphics, Washington. 542 pp.
- Lucio, A.M. 2006.** El género *Hypnea* Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta) em las costas Del Océano Atlántico. Tese Doctoral. Universidad Complutense de Madrid- Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Biología Vegetal I.
- Maggs, C.A., & Pueschel, C.M. 1989.** Morphology and development of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta): proposal of Ahnfeltiales ord. nov. *J. Phycol.* 25: 333-351.
- Maggs C.A., Douglas S.E., Fenety J. & Bird C. J. 1992.** A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214-232.
- Martins, A. P., Necchi O.J, Colepicolo, P. & Yokoya. N.S. 2011.** Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta).

Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 21(2): 340-348, Mar./Apr. 2011.

Masuda, M., Yamagishi, Y., Chiang, Y.-M., Lewmanomont, K. & Xia, B. 1997. Overview of *Hypnea* (Rhodophyta, Hypneaceae). In Abbott, I. A. (Ed.) Taxonomy of Economic Seaweeds, Vol. 6. California Sea Grant College System, La Jolla, pp. 127–33.

McFadden, G. I. 1999. Plastids and protein targeting. J. Eukar. Microbiol. 46:339–46.

Min-Thein, U. & Womersley, H.B.S. 1976. Studies on the southern Australia taxa of Solieriaceae, Rhabdoniaceae and Rhodophyllidaceae (Rhodophyta). Aust. J. Bot. 24.

Mshigeni, K. E. 1978a. The biology and ecology of benthic marine algae with special reference to *Hypnea* (Rhodophyta, Gigartinales). A review of the literature. Bibl. Phycol. 37: 1–168.

Mshigeni, K.E., 1978b. Taxonomic studies on the Hawaiian Hypneaceae with special reference to the genus *Hypnea* Lamouroux (Rhodophyta). *Nova Hedwigia* 29: 859-894. Mshigeni, K.E. and D.J. Chapman. 1994. *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta). In: (I.katsuka, ed.). *Biology of Economic Algae*. SPB Academic Publishing bv, The Hague. pp. 245–281.

Mshigeni, K.E. & Chapman, D.J. 1994. *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta). In: (I. Katsuka , ed.). *Biology of Economic Algae*. SPB Academic Publishing bv, The Hague. 245 - 281

Norton T.A, Melkonian M. & Andersen R.A. 1996. Algal biodiversity. Phycologia 35: 308-326.

Nylander, J.A.A. 2004. Bayesian phylogenetics and the evolution of gall wasps. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and

Technology, 34p.

Papenfuss, G.F., 1968. A history, catalogue, and bibliography of the Red Sea benthic algae. Israel Journal of Botany 17: 1-118.

Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome—implications for DNA barcoding and biological function. Can. J. Bot. 84:1434–43.

Pueschel, C.M., & Cole, K.M. 1982. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. Am. J. Bot. 69: 703–720.

Ragan M.A., Bird C.J., Rice E.L., Gutell R.R., Murphy C.A. & Singh R.K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 7276-80.

Ratnasinghan, S. & Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodingoflife.org). Molecular Ecology Notes.

Reis, R. P., Caldeira, A.Q., Miranda, A.N.S., Barros-Barreto, M.B. 2006. Mariculture potential of carragenophyta *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour (Gigartinales - Rhodophyta) on Marambaia Island, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro State, Brazil. *Acta Bot. Bras.*, 763-769.

Robba, L., Russel, S.J., Barker, G.L. & Brodie, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of Red Algae (Rhodophyta) American Journal of Botany 93(8):1101-1108.

Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J., Philippe, H. & Lang, B. F. 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. Curr.Biol. 15:1325–30.

Ross, P. J., Donaldson, S. L. & Saunders, G. W. 2003. A molecular investigation of *Mazzaella* (Gigartinales Rhodophyta) morphologically intermediate between *Mazzaella linearis* and *M. splendens*. Bot. Mar. 46, 202–213. (doi:10.1515/BOT.2003.020.).

Saito, R.S. & Oliveira, E.C. 1990. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. Hydrobiologia 2: 204/205 : 585-588, 1990.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 3 vol. Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.

- Saunders, G.W., Chiovitti, A. & Kraft, G.T. 2004** Small-subunit rDNA sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 3. Delineating the Gigartinales sensu stricto. *Can. J. Bot.* Vol. 82, 2004
- Saunders, G.W., & Kraft, G.T. 1994.** Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). I. Evidence for the Plocamiales ord. nov. *Can. J. Bot.* 72: 1250–1263.
- Saunders, G.W., & Kraft, G.T. 1996.** Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). II. Recognition of the Halymeniales ord. nov. *Can. J. Bot.* 74: 694–707.
- Saunders, G.W., & Kraft, G.T. 2002.** Two new Australian species of *Predaea* (Nemastomataceae, Rhodophyta), with taxonomic recommendations for an emended Nemastomatales and expanded Halymeniales. *J. Phycol.* 38: 1245–1260.
- Saunders, G.W., Chiovitti, A. & Kraft, G.T. 2004.** Small-subunit rDNA sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 3. Delineating the Gigartinales sensu stricto. *Can. J. Bot.* 82: 43–74.
- Saunders, G.W. & Hommersand, M.H., 2004.** Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany* 91 (10): 1494-1507.
- Saunders G.W. 2005.** Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2005) 360, 1879–1888.
- Schenkman, R. P. F. 1980.** Biomassa, crescimento, reprodução e ficocolóide de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) no litoral do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP, 73 p.
- Schenkman, R.P.F. 1986.** Cultura de *Hypnea* (Rhodophyta) in vitro como subsídio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 81 pp.
- Schmitz, F. 1892.** [6. Klasse Rhodophyceae] 2. Unterklasse Florideae. *In* Syllabus der Vorlesungen über spezielle und medicinisch-pharmaceutische Botanik...Grosse Ausgabe. Edited by A. Engler. Gebr. Borntraeger, Berlin. pp. 16–23.
- Sherwood, A.R., and Presting, G.G. 2007.** Universal “primers” amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 43(3): 605–608. doi:10.1111/j.1529-8817.
- Sherwood, A.R, Kurihara, A., Conklin, K.Y., Sauvage, T. & Presting, G.G. 2010.** The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings *BMC Plant Biology* 2010, 10:258.
- Silva, P.C. & Johansen, H.W. 1986.** A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). *Br. Phycol. J.* 21: 245–254.
- Stoeckle M. 2003.** Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience*, 53: 796-797
- Swofford, D.L. 2002.** PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.08a. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill.
- Tai, V., Lindstrom, S.C. & Saunders, G.W. 2001.** Phylogeny of the Dumontiaceae (Gigartinales, Rhodophyta) and associated families based on small-subunit rDNA and internal transcribed spacer sequence data. *J. Phycol.* 37: 184–196.
- Womersley, H.B.S. 1994.** The marine benthic flora of southern Australia. Rhodophyta. Part IIIA, Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetiales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales sensu lato). Australian Biological Resources Study, Canberra.
- Wynne, M. J., 2005.** A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. *Beiheft Nova Hedwigia* 129: 1-152.

- Wynne, M.J. 2011.** A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. *Nova Hedwigia Beihefte* 140: [1-6], 7-166.
- Yamagishi, Y & Masuda, M. 2000.** A taxonomic revision of a *Hypnea* charoides-valentiae complex (Rhodophyta, Gigartinales) in Japan, with a description of *Hypnea flexicaulis* sp. nov. *Phycol. Res.* 48:27-35.
- Yamagishi, Y., Masuda, M., Abe, T., Uwai, S., Kogami, K., Kawagushi, S. & Phang, S.M. 2003.** Taxonomic Notes on Marine Algae from Malaysia. XI. Four Species of Rhodophyceae1.
- Yoon, H.S, Müller, K.M., Sheat, R.G., Ott, F.D. & Bhattacharya, D. 2006.** Defining the Major Lineages of Red Algae (Rhodophyta). *J. Phycol.* 42, 482–492.
- Zhang, D.X. & Hewitt, G. M. 1997** Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial “primers” in insects. *Insect Mol. Biol.* 6, 143–150.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 1997.** Hybridization studies in *Bostrychia*. 2: Correlation of crossing data and plastid DNA sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Rhodophyta, Ceramiales). *Phycologia* 36: 293 – 304.
- Zuccarello, G.C., West, J. A. & King, R. J. 1999.** A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* (1999) 8: 1443–1447
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2002.** Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41(1): 49-60.

ANEXO I - Matriz de sequências de *cox1* das espécies de *Hypnea* sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5.

	10	20	30	40	50	60
						
BOT0001	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
BOT0002	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
BOT0005	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0040	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0067	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0089	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0098	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0123	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0137	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0138	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0174	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0185	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0187	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0188	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0189	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0196	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0199	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0202	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0244	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
IBC0252	TACACTATATCTTGTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTGGGAGGATGTATGTCGATGCT					
BOT0004	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0028	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0051	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0064	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0139	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0186	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0194	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0195	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0197	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0200	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0201	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0204	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0205	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0210	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0213	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0214	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0216	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0217	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0242	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0245	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0246	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0247	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0248	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0249	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0250	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0251	TACATTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTTCAGGTATTCTAGGAGGGTGTATGTCATGTT					
IBC0041	TACACTATATCTTATTTTTTGGTGCAATTTTCTGGTATTTTAGGAGGTTGTATGTCAATGTT					
IBC0129	TACACTATATCTTATTTTTTGGTGCAATTTTCTGGTATTTTAGGAGGTTGTATGTCAATGTT					
IBC0184	TACACTATATCTTATTTTTTGGTGCAATTTTCTGGTATTTTAGGAGGTTGTATGTCAATGTT					
IBC0198	TACACTATATCTTATTTTTTGGTGCAATTTTCTGGTATTTTAGGAGGTTGTATGTCAATGTT					
IBC0203	TACACTATATCTTATTTTTTGGTGCAATTTTCTGGTATTTTAGGAGGTTGTATGTCAATGTT					
BOT0003	TACTCTATATCTTATTTTTTGGCGCTTTTTCTGGTATTTTGGGTGGTTGTATGTCATGTT					
IBC0190	TACACTATATCTTATTTTTTGGAGCTTTTTTCAGGTATTTTAGGAGGGTGTATGTCAATGCT					
IBC0211	TACTTTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTCTGGTATTTTAGGAGGCTGTATGTCAATGTT					
IBC0212	TACTTTATATCTTATTTTTTGGTGCTTTTTCTGGTATTTTAGGAGGCTGTATGTCAATGTT					

610
|....|....|..
 BOT0001 TTTTAAACACATCTTTTT
 BOT0002 TTTTAAACACATCTTTTT
 BOT0005 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0040 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0067 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0089 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0098 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0123 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0137 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0138 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0174 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0185 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0187 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0188 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0189 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0196 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0199 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0202 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0244 TTTTAAACACATCTTTTT
 IBC0252 TTTTAAACACATCTTTTT
 BOT0004 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0028 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0051 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0064 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0139 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0186 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0194 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0195 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0197 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0200 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0201 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0204 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0205 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0210 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0213 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0214 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0216 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0217 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0242 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0245 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0246 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0247 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0248 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0249 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0250 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0251 TTTTAAACACTTCTTTTT
 IBC0041 TTTTAAATACATTTT
 IBC0129 TTTTAAATACATTTT
 IBC0184 TTTTAAATACATTTT
 IBC0198 TTTTAAATACATTTT
 IBC0203 TTTTAAATACATTTT
 BOT0003 TTTTAAATACATTTCT
 IBC0190 TTTTAAATACATTTT
 IBC0211 TTTTAAATACATTTCT
 IBC0212 TTTTAAATACATTTCT

ANEXO II - Matriz de sequências de UPA das espécies de *Hypnea* sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5.

	10	20	30	40	50	60
IBC28		CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATACTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA				
IBC64	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATACTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC247	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATACTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC40	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGGATTTGGGTATGCTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC98	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGGATTTGGGTATGCTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC185	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGGATTTGGGTATGCTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC129	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATACTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC190	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATGCTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
BOT003	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATACTTTTCGCGAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
IBC212	CTTTACTGTAGCTTGGAAATTGAATTTGGGTATATTTTGTGCAGTATAGGTGGGAGGCCAAA					
	70	80	90	100	110	120
IBC28		AATAATATATTTGCGGATATATAGTAGCCAATAGTGAGATACCACCTCTAAATATACTAGA				
IBC64	AATAATATATTTGCGGATATATAGTAGCCAATAGTGAGATACCACCTCTAAATATACTAGA					
IBC247	AATAATATATTTGCGGATATATAGTAGCCAATAGTGAGATACCACCTCTAAATATACTAGA					
IBC40	GATAATATATTTGCGGATATATATTTAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAGTATACTAGA					
IBC98	GATAATATATTTGCGGATATATATTTAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAGTATACTAGA					
IBC185	GATAATATATTTGCGGATATATATTTAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAGTATACTAGA					
IBC129	GATTATATATTTGTGGATATATAGGAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAATTATACTAGG					
IBC190	GATAATATATTTGCGGATATATGGGAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAGTATACTAGG					
BOT003	GATAATATATTTGTGGATATATAGGAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAGTATACTAGA					
IBC212	GATCATATATTTGCGGATATATAGGAGCCAACAGTGAGATACCACCTCTAAATATGCTAGG					
	130	140	150	160	170	180
IBC28		ATTCTAACTTTGAAGCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG				
IBC64	ATTCTAACTTTGAAGCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC247	ATTCTAACTTTGAAGCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC40	ACTCTAACTTTGAAGCCGTTAACAGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC98	ACTCTAACTTTGAAGCCGTTAACAGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC185	ACTCTAACTTTGAAGCCGTTAACAGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC129	ATTCTAACTTTGAAGTCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC190	ATTCTAACTTTGAAGTCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
BOT003	ATTCTAACTTTGATAGCCGTTAACCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
IBC212	ATTCTAACTTTGAAGCCGTTAGCCGGCCAAAGAACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
	190	200	210	220	230	240
IBC28		GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA				
IBC64	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC247	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC40	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC98	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC185	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC129	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC190	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
BOT003	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					
IBC212	GGGCGGTTCGCTCCCTAAAAAGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCCTTCAGACTGGTTCGGAA					

```

                250      260      270      280      290      300
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC28  ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCAAAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC64  ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCAAAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC247 ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCAAAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC40  ATCAGTCTCAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC98  ATCAGTCTCAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC185 ATCAGTCTCAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC129 ATCAGTCATAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC190 ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
BOT003 ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG
IBC212 ATCAGTCTTAGAGTATAAAAGGCATAAAGAAGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG

                310      320      330      340      350      360
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC28  AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC64  AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC247 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC40  AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC98  AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC185 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC129 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTGTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC190 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTCCGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
BOT003 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA
IBC212 AGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCCGACAGTTCTGAGTGGAAAGGCTGTCGCTCAACGGA

      ....|....
IBC28  TAAAAAGTTA
IBC64  TAAAAAGTTA
IBC247 TAAAAAGTTA
IBC40  TAAAAAGTTA
IBC98  TAAAAAGTTA
IBC185 TAAAAAGTTA
IBC129 TAAAAAGTTA
IBC190 TAAAAAGTTA
BOT003 TAAAAAGTTA
IBC212 TAAAAAGTTA

```

ANEXO III - Matriz de seqüências de rbcL das espécies de *Hypnea* sequenciadas neste estudo. As amostras estão identificadas de acordo com a Tabela 5.

	10	20	30	40	50	60
IBC0028		GCC	TATTT	CGT	GTG	ACTCC
IBC0064		GCC	TATTT	CGT	GTG	ACTCC
IBC0245		GCC	TATTT	CGT	GTG	ACTCC
IBC0040		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
IBC0098		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
IBC0185		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
IBC0129		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
BOT0003		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
IBC0212		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
IBC0190		GCT	TATTT	CGT	GTA	ACTCC
	70	80	90	100	110	120
IBC0028		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0064		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0245		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0040		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0098		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0185		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0129		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
BOT0003		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0212		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
IBC0190		GCT	GGT	GAA	TCA	TCT
	130	140	150	160	170	180
IBC0028		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0064		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0245		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0040		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0098		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0185		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0129		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
BOT0003		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
IBC0212		GAT	TTT	TAT	ACAG	AGCT
IBC0190		GAC	TTA	TAT	AGAG	CTAA
	190	200	210	220	230	240
IBC0028		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0064		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0245		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0040		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0098		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0185		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0129		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
BOT0003		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0212		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC
IBC0190		TTT	GCT	TTT	TAT	TGC

```

                250      260      270      280      290      300
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0064 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0245 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0040 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0098 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0185 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0129 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
BOT0003 GCTTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0212 GCGTCAATTATTGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTAAAAGCTTTACGTTTAGAAGAT
IBC0190 GCTTCAATTATCGGTAATGTTTTTGGTTTTAAAGCTGTCAAAGCTCTACGTTTAGAAGAT

                310      320      330      340      350      360
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGTATTGTTTCT
IBC0064 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGTATTGTTTCT
IBC0245 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGTATTGTTTCT
IBC0040 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGGATTGTTTCT
IBC0098 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGGATTGTTTCT
IBC0185 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGGATTGTTTCT
IBC0129 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGGCCAGCAACAGGTATTGTTCTCT
BOT0003 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGTATTGTTTCT
IBC0212 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAAACTTTCCAAGGACCAGCAACAGGTATCGTATCT
IBC0190 ATGCGTATACCAGTTGCTTATTTAAAGACTTTCCAGGGACCAGCAACAGGTATTATTCT

                370      380      390      400      410      420
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GAACGTGAACGTATGGACAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0064 GAACGTGAACGTATGGACAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0245 GAACGTGAACGTATGGACAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0040 GAACGTGAACGTATGGATAAAATTTGGTCGTCCATTCCTTGGTGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0098 GAACGTGAACGTATGGATAAAATTTGGTCGTCCATTCCTTGGTGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0185 GAACGTGAACGTATGGATAAAATTTGGTCGTCCATTCCTTGGTGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0129 GAACGTGAACGTATGGATAAAATTTGGACGACCATTCCTTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
BOT0003 GAGCGTGAACGTATGGATAAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0212 GAGCGTGAACGTATGGATAAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA
IBC0190 GAGCGTGAGCGTATGGATAAAATTTGGACGTCCATTCCTTGGAGCAACTGTAAAACCTAAA

                430      440      450      460      470      480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 TTAGGTTTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTCTA
IBC0064 TTAGGTTTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTCTA
IBC0245 TTAGGTTTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTCTA
IBC0040 TTAGGTTTATCTGGAAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGACTA
IBC0098 TTAGGTTTATCTGGAAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGACTA
IBC0185 TTAGGTTTATCTGGAAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGACTA
IBC0129 CTAGGTCTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTCTA
BOT0003 CTAGGTCTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTCTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTCTA
IBC0212 CTGGGTTTATCTGGTAAAAACTATGGTCGTGTAGTTTACGAAGGCTTTAAGGGTGGTCTA
IBC0190 TTAGGTTTATCAGGAAAAAATTACGGTCGTGTAGTTTATGAAGGCTTTAAAGGTGGTTTA

```

```

      490      500      510      520      530      540
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GATTTCTTAAAAGATGATGAAAAATATTAACCTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAGAGA
IBC0064 GATTTCTTAAAAGATGATGAAAAATATTAACCTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAGAGA
IBC0245 GATTTCTTAAAAGATGATGAAAAATATTAACCTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAGAGA
IBC0040 GATTTCTTAAAGGATGATGAGAAATATCAATTCTCAACCATTCATGCGTTGGAAAGAAAAGA
IBC0098 GATTTCTTAAAGGATGATGAGAAATATCAATTCTCAACCATTCATGCGTTGGAAAGAAAAGA
IBC0185 GATTTCTTAAAGGATGATGAGAAATATCAATTCTCAACCATTCATGCGTTGGAAAGAAAAGA
IBC0129 GATTTCTTAAAGGATGATGAGAAATATTAACCTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAAAAGA
BOT0003 GATTTCTTAAAGGATGATGAAAAATATTAATTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAAAAGA
IBC0212 GATTTCTTAAAGGATGATGAAAAATATTAATTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAAAAGA
IBC0190 GATTTCTTAAAGGATGATGAAAAATATCAATTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAAAGAAAAGA

      550      560      570      580      590      600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 TTTTATATACGCAATGGAAGGGGTAAATAGATCTGTTGCAGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0064 TTTTATATACGCAATGGAAGGGGTAAATAGATCTGTTGCAGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0245 TTTTATATACGCAATGGAAGGGGTAAATAGATCTGTTGCAGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0040 TTCTATATTTCTATGGAAGGTGTAATAGATCTGTTGCTGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0098 TTCTATATTTCTATGGAAGGTGTAATAGATCTGTTGCTGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0185 TTCTATATTTCTATGGAAGGTGTAATAGATCTGTTGCTGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0129 TTTTATATACGCAATGGAAGGGCTAAATAGATCTGTTGCAGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA
BOT0003 TTTTATATACGCAATGGAAGGGCTCAATAGGTCTGTTGCAGCGACAGGTGAAGTTAAAGGA
IBC0212 TTTTATATTTCAATGGAAGGGCTAAATAGATCTGTTGCAGCGACAGGTGAAGTTAAAGGC
IBC0190 TTTCTGTATTTCAATGGAGGGAGTAAATAGATCTGTTGCAGCAACAGGTGAAGTTAAAGGA

      610      620      630      640      650      660
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 CATTATCTGAATGTAAACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTACGAAAGAGCTGAATTTGCA
IBC0064 CATTATCTGAATGTAAACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTACGAAAGAGCTGAATTTGCA
IBC0245 CATTATCTGAATGTAAACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTACGAAAGAGCTGAATTTGCA
IBC0040 CATTATTTTAAATGTAACTGCTGCTACAATGGAAAAATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCT
IBC0098 CATTATTTTAAATGTAACTGCTGCTACAATGGAAAAATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCT
IBC0185 CATTATTTTAAATGTAACTGCTGCTACAATGGAAAAATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCT
IBC0129 CATTATTTTGAATGTGACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCA
BOT0003 CATTATTTTGAATGTAAACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCA
IBC0212 CATTATTTTGAATGTAAACAGCAGCTACAATGGAAGATATGTACGAAAGAGCTGAATTTGCA
IBC0190 CATTACTTAAATGTAAACAGCTGCTACAATGGAAGATATGTATGAAAGAGCTGAATTTGCA

      670      680      690      700      710      720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0064 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0245 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0040 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0098 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0185 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0129 AAACAGCTTGGAGTATTATTATCATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
BOT0003 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACCTGCTATTCAA
IBC0212 AAACAGCTTGGAGTATTATTATTATGATTGACCTTGTAATTGGTTATACAGCTATCCAA
IBC0190 AAACAGCTTGGAGTATTATTATCATGATTGACCTTGTAATTGGTTACACTGCTATTCAA

```

```

      730      740      750      760      770      780
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028  ACTATGGGAACTCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCAGGTAAT
IBC0064  ACTATGGGAACTCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCAGGTAAT
IBC0245  ACTATGGGAACTCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCAGGTAAT
IBC0040  ACTATGGCAATCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCCTGGTAAT
IBC0098  ACTATGGCAATCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCCTGGTAAT
IBC0185  ACTATGGCAATCTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCCTGGTAAT
IBC0129  ACTATGGGAATTTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCAGGTAAT
BOT0003  ACTATGGGAATTTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACATCGTGCAGGTAAT
IBC0212  ACTATGGGAATTTGGGCACGTAAAAATGATATGATCTTACATTTACACCGTGCAGGTAAC
IBC0190  ACTATGGCAATTTGGGCACGTAAAAATGATATGATTTTACATTTACACCGTGCCTGGTAAT

      790      800      810      820      830      840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028  TCTACATACTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGTGTTATCTGTAAGTGGATG
IBC0064  TCTACATACTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGTGTTATCTGTAAGTGGATG
IBC0245  TCTACATACTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGTGTTATCTGTAAGTGGATG
IBC0040  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGAGTAATTTGTAAGTGGATG
IBC0098  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGAGTAATTTGTAAGTGGATG
IBC0185  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGAGTAATTTGTAAGTGGATG
IBC0129  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGCATGAAC TTCGTGTTATCTGTAAGTGGATG
BOT0003  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAAC TTCGTGTTATCTGTAAATGGATG
IBC0212  TCTACATAATTCTCGTCAAAAAATTCATGGTATGAAC TTCGTGTTATTTGTAAATGGATG
IBC0190  TCTACATAATTCTCGTCAGAAAAATTCATGGTATGAATTTCCGTGTAATTTGTAAGTGGATG

      850      860      870      880      890      900
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028  CGTATGGCTGGCGTAGATCATATTCATGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTAGAAGGTGAT
IBC0064  CGTATGGCTGGCGTAGATCATATTCATGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTAGAAGGTGAT
IBC0245  CGTATGGCTGGCGTAGATCATATTCATGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTAGAAGGTGAT
IBC0040  CGTATGTCCTGGTGTAGATCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGAGAT
IBC0098  CGTATGTCCTGGTGTAGATCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGAGAT
IBC0185  CGTATGTCCTGGTGTAGATCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGAGAT
IBC0129  CGTATGGCTGGTGTAGACCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTGGAAGGTGAT
BOT0003  CGTATGGCTGGTGTAGACCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGTGAT
IBC0212  CGTATGGCTGGTGTAGACCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGTGAT
IBC0190  CGTATGTCCTGGTGTAGATCATATTCATGCAGGTACTGTAGTAGGTAAATTTAGAAGGTGAC

      910      920      930      940      950      960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028  CCTTTAATGATTAGAGGATTTTACAACACTTTATTACTACCATATTTAGAAGTTAATCTA
IBC0064  CCTTTAATGATTAGAGGATTTTACAACACTTTATTACTACCATATTTAGAAGTTAATCTA
IBC0245  CCTTTAATGATTAGAGGATTTTACAACACTTTATTACTACCATATTTAGAAGTTAATCTA
IBC0040  CCTTTAATGATTAAAGGTTTCTATAATACTTTATTATTACCATATCTAGAAATTAATTTA
IBC0098  CCTTTAATGATTAAAGGTTTCTATAATACTTTATTATTACCATATCTAGAAATTAATTTA
IBC0185  CCTTTAATGATTAAAGGTTTCTATAATACTTTATTATTACCATATCTAGAAATTAATTTA
IBC0129  CCTTTAATGATTAGAGGATTTTATAATACTTTATTATTACCATATTTAGAAGTTAATTTA
BOT0003  CCTTTAATGATTAAAGGATTCATAAATACTTTATTGCTACCATATTTAGAAGTTAACCTA
IBC0212  CCTCTAATGATTAGAGGATTCATAAATACTTTATTATTACCATATTTAGAGATTAATCTA
IBC0190  CCTTTAATGATTAAAGGTTTTTACAATACTTTATTATTACCGTATTTAGAAAAGAATCTA

```



```

          970          980          990          1000          1010          1020
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 CCTCAAGGTATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCA
IBC0064 CCTCAAGGTATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCA
IBC0245 CCTCAAGGTATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCA
IBC0040 CCTCAAGGAATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT
IBC0098 CCTCAAGGAATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT
IBC0185 CCTCAAGGAATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT
IBC0129 CCTCAAGGTATCTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCA
BOT0003 CCGCAAGGTATTTTCTTTGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT
IBC0212 CCTCAAGGTATTTTCTTTGAACAAGACTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT
IBC0190 CCTCAAGGTATTTTCTTCGAACAAGATTGGGCATCTTTACGTAAAGTTACTCCAGTTGCT

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 TCTGGTGGTATTCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTACTTGATTATCTAGGTAATGATGTT
IBC0064 TCTGGTGGTATTCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTACTTGATTATCTAGGTAATGATGTT
IBC0245 TCTGGTGGTATTCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTACTTGATTATCTAGGTAATGATGTT
IBC0040 TCTGGTGGTATCCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTTCTTGATTATTTAGGCAATGATGTT
IBC0098 TCTGGTGGTATCCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTTCTTGATTATTTAGGCAATGATGTT
IBC0185 TCTGGTGGTATCCACTGTGGTCAAAATGCACCAACTTCTTGATTATTTAGGCAATGATGTT
IBC0129 TCTGGTGGTATTCACTGTGGTCAAAATGCATCAACTTCTTGATTATTTGGGTAATGACGTT
BOT0003 TCTGGTGGTATTCAATTGTGGTCAAAATGCATCAACTTCTTGATTACCTAGGTAATGACGTT
IBC0212 TCTGGTGGTATTCAATTGTGGTCAAAATGCATCAACTTCTTGATTACCTAGGTAATGACGTT
IBC0190 TCTGGTGGTATTCAATTGTGGTCAAAATGCACCAACTTCTTGATTATTTAGGCAATGATGTT

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GTACTTCAATTTGGAGGTGGTACTATTGGGCATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0064 GTACTTCAATTTGGAGGTGGTACTATTGGGCATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0245 GTACTTCAATTTGGAGGTGGTACTATTGGGCATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0040 GTACTTCAGTTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0098 GTACTTCAGTTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0185 GTACTTCAGTTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0129 GTACTTCAATTTGGTGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
BOT0003 GTACTTCAATTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACG
IBC0212 GTACTTCAGTTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATTCAAGCTGGTGCAACA
IBC0190 GTACTTCAATTTGGAGGTGGTACTATTGGACATCCTGATGGTATCCAAGCTGGTGCAACA

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GCTAATAGAGTAGCTCTAGAAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGATTATGTT
IBC0064 GCTAATAGAGTAGCTCTAGAAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGATTATGTT
IBC0245 GCTAATAGAGTAGCTCTAGAAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGATTATGTT
IBC0040 GCTAATAGGGTAGCTTTTAGAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGACTATGTT
IBC0098 GCTAATAGGGTAGCTTTTAGAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGACTATGTT
IBC0185 GCTAATAGGGTAGCTTTTAGAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGCCGTGACTATGTT
IBC0129 GCTAATAGAGTAGCTCTAGAGTCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGTCGTGATTATGTT
BOT0003 GCTAATAGAGTAGCTCTAGAGTCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGTCGTGATTATGTT
IBC0212 GCTAACAGAGTAGCTCTAGAAATCAATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGTCGTGATTATGTT
IBC0190 GCTAATAGGGTTGCTTTAGAAATCTATGGTTATGGCTCGTAATGAAGGTCGTGATTATGTT

```

```

          1210      1220      1230      1240      1250      1260
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
IBC0028 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0064 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0245 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0040 GCTGAAGGCCCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0098 GCTGAAGGCCCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0185 GCTGAAGGCCCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0129 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
BOT0003 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0212 GCTGAAGGACCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA
IBC0190 GCTGAAGGCCCAAAAATTTTACAAGATGCAGCAAAAACATGTGGTCCTCTACAAACAGCA

          1270      1280      1290      1300      1310
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
IBC0028 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0064 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0245 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0040 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0098 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0185 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTTAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0129 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTCAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
BOT0003 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTCAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0212 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTCAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC
IBC0190 TTAGATTTATGGAAAGATATTACTTTCAACTATACCTTCTACAGATACAGCTGATTTTC

```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
EU345983-1	ID	3	62	64	3	3	9	55	55	57	53	64	61	64	57	61	57	3	55	62	63	67	59	61	61	67	61	59	60	57	66	67	65	55	66	13	62
HQ422674-2	99,3	ID	62	63	0	0	10	55	54	55	53	63	60	63	55	60	57	0	54	61	62	66	58	60	60	66	60	58	59	57	65	66	64	54	65	61	61
EU240822-3	86,6	86,6	ID	60	62	62	64	63	59	60	61	72	69	72	57	60	59	62	58	73	59	54	60	60	60	54	60	60	61	60	59	60	58	46	53	67	61
HQ422721-4	86,2	86,4	87,1	ID	63	63	61	55	60	60	61	59	55	59	63	57	60	63	59	58	62	67	57	57	57	67	57	65	66	65	64	65	63	55	66	68	60
EF136611-5	99,3	100	86,6	86,4	ID	0	10	55	54	55	53	63	60	63	55	60	57	0	54	61	62	66	58	60	60	66	60	58	59	57	65	66	64	54	65	61	61
EF136601 -6	99,3	100	86,6	86,4	100	ID	10	55	54	55	53	63	60	63	55	60	57	0	54	61	62	66	58	60	60	66	60	58	59	57	65	66	64	54	65	61	61
EF136591-7	98,0	97,8	86,2	86,9	97,8	97,8	ID	54	54	57	55	63	62	63	57	57	59	10	57	61	65	68	60	57	57	68	57	58	59	57	68	69	67	58	63	18	58
EU345989-8	88,1	88,1	86,4	88,1	88,1	88,1	88,4	ID	62	63	55	57	55	57	57	61	59	55	61	55	61	60	62	61	61	60	61	68	69	66	60	59	59	57	63	57	61
HQ422876-9	88,1	88,4	87,3	87,1	88,4	88,4	88,4	86,6	ID	64	57	67	65	67	64	61	52	54	63	67	65	63	62	61	61	63	61	20	21	20	66	67	65	61	71	57	62
HQ422683-10	87,9	88,1	87,1	87,1	88,1	88,1	87,7	86,4	86,2	ID	64	59	62	59	59	53	63	55	2	59	48	50	45	53	53	50	53	65	66	66	52	53	51	50	64	58	57
FJ694913-11	88,6	88,6	86,9	86,9	88,6	88,6	88,1	88,1	87,7	86,2	ID	48	45	48	58	63	66	53	63	46	59	66	62	63	63	66	63	60	61	59	68	69	67	53	65	55	63
FJ694912-12	86,2	86,4	84,5	87,3	86,4	86,4	86,4	87,7	85,6	87,3	89,6	ID	61	0	67	68	58	63	59	2	64	65	58	68	68	65	68	68	69	69	73	74	72	58	68	63	70
FJ694892-13	86,9	87,1	85,1	88,1	87,1	87,1	86,6	88,1	86,0	86,6	90,3	96,9	ID	61	64	65	57	60	60	16	63	63	59	65	65	63	65	67	68	68	71	72	70	59	67	62	65
FJ694910-14	86,2	86,4	84,5	87,3	86,4	86,4	86,4	87,7	85,6	87,3	89,6	100	96,9	ID	67	68	58	63	59	2	64	65	58	68	68	65	68	68	69	69	73	74	72	58	68	63	70
EU240818-15	87,9	88,1	87,7	86,4	88,1	88,1	87,7	87,9	86,2	87,3	87,5	85,6	86,2	85,6	ID	46	66	55	58	65	50	59	58	46	46	59	46	66	67	65	54	55	53	47	64	58	44
HQ422681-16	86,9	87,1	87,1	87,7	87,1	87,1	87,7	86,9	86,9	88,6	86,4	85,4	86,0	85,4	90,1	ID	59	60	52	68	53	55	57	0	0	55	0	64	65	65	58	59	57	53	59	61	6
EU345985-17	87,7	87,9	87,3	87,1	87,9	87,9	87,3	87,3	88,8	86,4	85,8	87,5	87,7	87,5	85,8	87,3	ID	57	62	59	71	69	67	59	59	69	59	52	53	52	68	69	67	67	71	61	63
HQ422901-18	99,3	100	86,6	86,4	100	100	97,8	88,1	88,4	88,1	88,6	86,4	87,1	86,4	88,1	87,1	87,9	ID	54	61	62	66	58	60	60	66	60	58	59	57	65	66	64	54	65	61	61
HQ422680-19	88,1	88,4	87,5	87,3	88,4	88,4	87,9	86,9	86,4	99,5	86,4	87,3	87,1	87,3	87,5	88,8	86,6	88,4	ID	59	46	48	44	52	52	48	52	64	65	65	50	51	49	51	62	59	55
FJ694908-20	86,6	86,9	84,3	87,5	86,9	86,9	86,9	88,1	85,6	87,3	90,1	99,5	96,5	99,5	86,0	85,4	87,3	86,9	87,3	ID	62	65	57	68	68	65	68	68	69	67	71	72	70	57	68	61	70
EU345981-21	86,4	86,6	87,3	86,6	86,6	86,6	86,0	86,9	86,0	89,6	87,3	86,2	86,4	86,2	89,2	88,6	84,7	86,6	90,1	86,6	ID	44	55	53	53	44	53	68	69	67	51	52	50	52	61	63	55
HQ422958-22	85,6	85,8	88,4	85,6	85,8	85,8	85,4	87,1	86,4	89,2	85,8	86,0	86,4	86,0	87,3	88,1	85,1	85,8	89,6	86,0	90,5	ID	57	55	55	0	55	68	69	68	52	53	51	58	64	65	57
HQ422951-23	87,3	87,5	87,1	87,7	87,5	87,5	87,1	86,6	86,6	90,3	86,6	87,5	87,3	87,5	87,5	87,9	85,6	87,5	90,5	87,7	88,1	87,9	ID	57	57	57	57	61	62	61	60	61	59	53	54	57	55
HQ422905-24	86,9	87,1	87,1	87,7	87,1	87,1	87,7	86,9	86,9	88,6	86,4	85,4	86,0	85,4	90,1	100	87,3	87,1	88,8	85,4	88,6	88,1	87,9	ID	0	55	0	64	65	65	58	59	57	53	59	61	6
HQ422821-25	86,9	87,1	87,1	87,7	87,1	87,1	87,7	86,9	86,9	88,6	86,4	85,4	86,0	85,4	90,1	100	87,3	87,1	88,8	85,4	88,6	88,1	87,9	100	ID	55	0	64	65	65	58	59	57	53	59	61	6
HQ422821-26	85,6	85,8	88,4	85,6	85,8	85,8	85,4	87,1	86,4	89,2	85,8	86,0	86,4	86,0	87,3	88,1	85,1	85,8	89,6	86,0	90,5	100	87,9	88,1	ID	55	68	69	68	52	53	51	58	64	65	57	
HQ422812-27	86,9	87,1	87,1	87,7	87,1	87,1	87,7	86,9	86,9	88,6	86,4	85,4	86,0	85,4	90,1	100	87,3	87,1	88,8	85,4	88,6	88,1	87,9	100	100	88,1	ID	64	65	65	58	59	57	53	59	61	6
BOT0001-28	87,3	87,5	87,1	86,0	87,5	87,5	87,5	85,4	95,7	86,0	87,1	85,4	85,6	85,4	85,8	86,2	88,8	87,5	86,2	85,4	85,4	85,4	86,9	86,2	86,2	85,4	86,2	ID	1	2	70	71	69	63	72	60	64
IBC0185 -29	87,1	87,3	86,9	85,8	87,3	87,3	87,3	85,1	95,4	85,8	86,9	85,1	85,4	85,1	85,6	86,0	88,6	87,3	86,0	85,1	85,1	85,1															

Anexo IV. Matriz de identidade do marcador *cox1* das sequências obtidas neste e estudo e das sequências retiradas do banco de dados. Amostras numeradas de acordo com as Tabelas 5, 8 e 9.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
EU346010	- 1	ID	9,2	71,1	82,9	76,3	75	69,8	79,0	3,9	3,9	79,0	2,6	77,7
AF3856841	- 2	99,3%	ID	79,0	90,8	84,2	84,2	77,7	84,2	11,8	11,8	84,2	10,5	85,6
EU240843	- 3	94,6%	94,0%	ID	63,2	75,0	63,2	63,2	77,7	73,7	71,1	59,2	72,4	76,3
ABO33159	- 4	93,7%	93,1%	95,2%	ID	84,2	75,0	75,0	92,1	82,9	82,9	69,8	84,2	84,2
ABO33160	- 5	94,2%	93,6%	94,3%	93,6%	ID	46,0	42,1	14,4	73,7	73,7	81,6	75,0	48,7
EU345993	- 6	94,3%	93,6%	95,2%	94,3%	96,5%	ID	6,5	43,4	72,4	72,4	65,8	73,7	46,0
ABO95912	- 7	94,7%	94,1%	95,2%	94,3%	96,8%	99,5%	ID	40,8	67,1	67,1	65,8	67,1	47,4
ABO33162	- 8	94,0%	93,3%	94,1%	93,0%	98,9%	96,7%	96,9%	ID	76,3	76,3	84,2	77,7	46,0
EF136632	- 9	99,7%	99,1%	94,4%	93,7%	94,4%	94,5%	94,9%	94,2%	ID	2,6	79,0	1,3	75,0
ABO33163	- 10	99,7%	99,1%	94,6%	93,7%	94,4%	94,5%	94,9%	94,2%	99,8%	ID	80,3	1,3	75,0
EU346002	- 11	94,0%	93,6%	95,5%	94,7%	93,8%	95,0%	95,0%	93,6%	94,0%	93,9%	ID	79	75,0
DQO95823	- 12	99,8%	99,2%	94,5%	93,6%	94,3%	94,4%	94,9%	94,1%	99,9%	99,9%	94,0%	ID	75,0
EU346014	- 13	94,1%	93,5%	94,2%	93,6%	96,3%	96,5%	96,4%	96,5%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%	ID
UO4179	- 14	94,0%	93,6%	94,1%	93,6%	96,2%	96,5%	96,3%	96,5%	94,3%	94,3%	94,3%	94,2%	99,9%
FJ694932	- 15	93,6%	93,0%	95,1%	96,3%	93,8%	94,5%	94,5%	93,9%	93,7%	93,7%	94,6%	93,6%	93,6%
FJ694947	- 16	93,2%	92,6%	94,1%	94,3%	93,1%	93,8%	93,8%	92,8%	93,3%	93,3%	95,8%	93,2%	93,6%
FJ694959	- 17	94,5%	93,9%	95,8%	95,5%	94,7%	95,8%	95,8%	94,5%	94,7%	94,7%	96,5%	94,6%	94,6%
ABO33165	- 18	93,3%	92,7%	94,3%	94,4%	93,3%	94,0%	94,0%	93,0%	93,4%	93,4%	95,8%	93,3%	93,8%
FJ604935	- 19	93,7%	93,1%	95,3%	94,4%	93,2%	93,9%	94,0%	93,3%	93,7%	93,7%	94,1%	93,6%	93,0%
EU240849	- 20	93,6%	93,0%	96,3%	95,5%	94,3%	94,8%	94,8%	94,2%	93,7%	93,7%	95,2%	93,6%	94,1%
AO33166	- 21	93,5%	92,9%	96,2%	95,5%	94,3%	94,7%	94,7%	94,1%	93,6%	93,6%	95,2%	93,6%	94,0%
EU346004	- 22	94,0%	93,3%	94,6%	93,6%	95,3%	96,8%	96,9%	95,5%	94,0%	94,0%	93,8%	94,0%	95,4%
FJ694934	- 23	98,8%	98,2%	94,1%	93,7%	94,0%	94,0%	94,3%	93,7%	98,7%	98,7%	93,9%	98,8%	93,7%
FJ694933	- 24	94,4%	93,8%	96,0%	95,6%	93,8%	94,5%	94,8%	93,9%	94,4%	94,4%	95,1%	94,3%	93,8%
FJ694930	- 25	94,0%	93,4%	95,3%	95,1%	94,0%	95,2%	95,2%	93,9%	94,3%	94,3%	96,4%	94,2%	93,9%
EU345998	- 26	93,6%	93,0%	95,1%	99,6%	93,4%	94,1%	94,1%	92,9%	93,6%	93,6%	94,6%	93,5%	93,5%
ABO33167	- 27	94,2%	93,6%	96,2%	95,8%	94,3%	95,2%	95,2%	94,0%	94,3%	94,3%	94,9%	94,3%	94,3%
FJ694945	- 28	93,6%	93,0%	95,6%	94,6%	93,4%	94,2%	94,2%	93,2%	93,8%	93,8%	95,7%	93,7%	93,3%
FJ694944	- 29	93,6%	93,0%	95,6%	94,6%	93,4%	94,2%	94,2%	93,2%	93,8%	93,8%	95,7%	93,7%	93,3%
IBC0028	- 30	93,8%	93,2%	95,5%	96,5%	94,1%	94,6%	94,6%	93,8%	94,0%	94,0%	95,3%	93,9%	94,0%
IBC0064	- 31	93,8%	93,2%	95,5%	96,5%	94,1%	94,6%	94,6%	93,8%	94,0%	94,0%	95,3%	93,9%	94,0%
IBC0245	- 32	93,4%	92,8%	95,1%	96,0%	93,7%	94,2%	94,2%	93,4%	93,5%	93,6%	94,9%	93,5%	93,6%
IBC0040	- 33	94,5%	93,9%	94,2%	94,0%	96,7%	96,7%	96,7%	96,8%	94,7%	94,7%	94,5%	94,6%	98,2%
IBC0098	- 34	94,4%	93,8%	94,1%	93,9%	96,6%	96,6%	96,6%	96,7%	94,6%	94,6%	94,4%	94,6%	98,1%
IBC0185	- 35	94,5%	93,9%	94,2%	94,0%	96,7%	96,7%	96,7%	96,8%	94,7%	94,7%	94,5%	94,6%	98,2%
IBC0129	- 36	94,0%	93,3%	96,1%	95,8%	93,6%	94,0%	94,2%	93,4%	94,1%	94,1%	94,8%	94,0%	93,5%
IBC0190	- 37	99,0%	98,4%	94,4%	93,3%	94,2%	94,2%	94,3%	93,8%	99,1%	99,1%	93,6%	99,2%	94,0%
IBC0212	- 38	93,3%	92,7%	95,7%	95,3%	93,4%	94,3%	94,3%	93,3%	93,5%	93,5%	94,6%	93,4%	93,3%
BOT0003	- 39	93,9%	93,3%	96,2%	95,7%	94,1%	94,6%	94,6%	94,0%	94,0%	94,0%	94,8%	94,0%	93,7%

Anexo V. Matriz de identidade do marcador *rbcl* das sequências obtidas neste estudo e das sequências retiradas do banco de dados. Amostras numeradas de acordo com as Tabelas 5, 8 e 9.

		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
EU346010 -	1	79,0	84,2	89,5	72,4	84,2	82,9	84,2	85,6	79,0	15,8	73,7	79,0	84,2	76,3	84,2
AF3856841 -	2	84,2	92,1	97,4	80,3	96,1	90,8	92,1	93,5	84,2	23,7	81,6	86,9	92,1	84,2	92,1
EU240843 -	3	77,7	64,5	77,7	55,3	75,0	61,8	48,7	50,0	71,1	77,7	0,96	61,8	64,5	50,0	57,9
AB033159 -	4	84,2	48,7	75,0	59,2	73,7	73,7	59,2	59,2	84,2	82,9	57,9	64,5	5,2	55,3	71,1
AB033160 -	5	50,0	81,6	90,8	69,8	84,2	89,5	75,0	75,0	61,8	79,0	81,6	79,0	86,9	75,0	86,9
EU345993 -	6	46,0	72,4	81,6	55,3	79,0	80,3	68,4	69,8	42,1	79,0	72,4	63,2	77,7	63,2	76,3
AB095912 -	7	48,7	72,4	81,6	55,3	79,0	79,0	68,4	69,8	40,8	75,0	68,4	63,2	77,7	63,2	76,3
AB033162 -	8	46,0	80,3	94,8	72,4	92,1	84,2	76,3	77,7	59,2	82,9	80,3	80,3	93,5	79,0	89,5
EF136632 -	9	75,0	82,9	84,2	69,8	86,9	82,9	82,9	84,2	79,0	13,17	73,7	75,0	84,2	75,0	81,6
AB033163 -	10	75,0	82,9	84,2	69,8	86,9	82,9	82,9	84,2	79,0	13,17	73,7	75,0	84,2	75,0	81,6
EU346002 -	11	75,0	71,1	55,3	46,0	55,3	77,7	63,2	63,2	81,6	80,3	64,5	47,4	71,1	67,1	56,6
DQ095823 -	12	76,3	84,2	89,5	71,1	84,2	84,2	84,2	84,2	79,0	15,8	75,0	76,3	85,6	75,0	82,9
EU346014 -	13	1,3	84,2	84,2	71,1	81,6	92,1	77,7	79,0	60,5	82,9	81,6	80,3	85,6	75,0	84,2
UO4179 -	14	ID	84,2	84,2	71,1	82,9	93,5	79,0	79,0	61,8	84,2	82,9	81,6	86,9	76,3	89,5
FJ694932 -	15	93,6%	ID	85,6	60,5	84,2	65,8	63,2	64,5	84,2	85,6	56,6	65,8	50,0	55,3	72,4
FJ694947 -	16	93,6%	93,5%	ID	60,5	2,6	85,6	76,3	77,7	89,5	86,9	76,3	63,2	77,7	81,6	65,8
FJ694959 -	17	94,6%	95,4%	95,4%	ID	59,2	67,1	50,0	50,0	75,0	73,7	59,2	13,17	60,5	55,3	47,4
AB033165 -	18	93,7%	93,6%	99,8%	95,5%	ID	84,2	75,0	75,0	84,2	84,2	75,0	63,2	75,0	79,0	63,2
FJ604935 -	19	92,9%	95,0%	93,5%	94,9%	93,6%	ID	64,5	65,8	92,1	84,2	57,9	72,4	75,0	61,8	79,0
EU240849 -	20	94,0%	95,2%	94,2%	96,2%	94,3%	95,1%	ID	1,3	79,0	84,2	46,0	59,2	60,5	43,4	64,5
AB033166 -	21	94,0%	95,1%	94,1%	96,2%	94,3%	95,0%	99,9%	ID	79,0	85,6	47,4	60,5	61,8	44,7	65,8
EU346004 -	22	95,3%	93,6%	93,2%	94,3%	93,3%	93,0%	94,0%	94,0%	ID	80,3	73,7	80,3	86,9	75	84,2
FJ694934 -	23	93,6%	93,5%	93,4%	94,4%	93,6%	93,3%	93,6%	93,5%	93,9%	ID	75	77,7	84,2	79,0	86,9
FJ694933 -	24	93,7%	95,7%	94,2%	95,5%	94,3%	95,6%	96,5%	96,4%	94,4%	94,3%	ID	67,1	59,2	35,5	71,1
FJ694930 -	25	93,8%	95,0%	95,2%	98,7%	95,2%	94,5%	95,5%	95,4%	93,9%	94,1%	94,9%	ID	67,1	63,2	48,7
EU345998 -	26	93,4%	96,2%	94,1%	95,4%	94,3%	94,3%	95,4%	95,3%	93,4%	93,6%	95,5%	94,9%	ID	57,9	73,7
AB033167 -	27	94,2%	95,8%	93,8%	95,8%	94,0%	95,3%	96,7%	96,6%	94,3%	94,0%	97,3%	95,2%	95,6%	ID	65,8
FJ694945 -	28	93,2%	94,5%	95,0%	96,4%	95,2%	94,0%	95,1%	95,0%	93,6%	93,4%	94,6%	96,3%	94,4%	95,0%	ID
FJ694944 -	29	93,2%	94,5%	95,0%	96,4%	95,2%	94,0%	95,1%	95,0%	93,6%	93,4%	94,6%	96,3%	94,4%	95,0%	1
IBC0028 -	30	94,0%	97,0%	94,1%	96,0%	94,3%	95,2%	95,7%	95,6%	93,7%	94,0%	96,2%	95,5%	96,3%	96,3%	95,2%
IBC0064 -	31	94,0%	97,0%	94,1%	96,0%	94,3%	95,2%	95,7%	95,6%	93,7%	94,0%	96,2%	95,5%	96,3%	96,3%	95,2%
IBC0245 -	32	93,5%	96,5%	93,7%	95,6%	93,9%	94,9%	95,2%	95,2%	93,3%	93,6%	95,8%	95,2%	95,8%	95,8%	94,8%
IBC0040 -	33	98,1%	94,0%	93,3%	94,9%	93,5%	93,1%	94,1%	94,0%	95,7%	94,3%	93,9%	94,2%	93,8%	94,1%	93,6%
IBC0098 -	34	98,1%	94,0%	93,3%	94,9%	93,4%	93,0%	94,0%	94,0%	95,6%	94,3%	94,0%	94,1%	93,7%	94,0%	93,5%
IBC0185 -	35	98,1%	94,0%	93,3%	94,9%	93,5%	93,1%	94,1%	94,0%	95,7%	94,3%	93,9%	94,2%	93,8%	94,1%	93,6%
IBC0129 -	36	93,4%	95,6%	93,9%	95,4%	94,0%	95,1%	96,6%	96,5%	93,9%	94,0%	97,5%	95,1%	95,7%	97,4%	94,9%
IBC0190 -	37	94,0%	93,3%	92,9%	94,3%	93,0%	93,2%	93,5%	93,4%	93,7%	98,4%	93,9%	93,7%	93,2%	94,0%	93,6%
IBC0212 -	38	93,3%	94,8%	93,6%	95,0%	93,8%	94,6%	96,9%	96,8%	93,6%	93,3%	96,2%	94,6%	95,2%	96,2%	94,3%
BOT0003 -	39	93,6%	95,8%	93,9%	95,5%	94,0%	95,3%	96,6%	96,5%	94,1%	93,9%	96,8%	95,0%	95,5%	96,8%	94,7%

		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
EU346010	- 1	84,2	81,6	81,6	86,9	72,4	73,7	72,4	79,0	13,1	84,2	80,3
AF3856841	- 2	92,1	89,5	89,5	94,8	80,3	81,6	80,3	84,2	21,0	96,1	84,2
EU240843	- 3	57,9	59,2	59,2	64,5	76,3	77,7	76,3	51,3	73,7	56,6	50,0
AB033159	- 4	71,1	46,0	46,0	0,96	79,0	80,3	79,0	55,3	84,2	61,8	56,6
AB033160	- 5	86,9	77,7	77,7	82,9	43,4	44,7	43,4	84,2	76,3	86,9	77,7
EU345993	- 6	76,3	71,1	71,1	76,3	43,4	44,7	43,4	79,0	76,3	75,0	71,1
AB095912	- 7	76,3	71,1	71,1	76,3	43,4	44,7	43,4	76,3	75,0	75,0	71,1
AB033162	- 8	89,5	81,6	81,6	86,9	42,1	43,4	42,1	86,9	81,6	84,2	79,0
EF136632	- 9	81,6	79,0	79,0	85,6	69,8	71,1	69,8	77,7	11,8	85,6	79,0
AB033163	- 10	81,6	79,0	79,0	84,2	69,8	71,1	69,8	77,7	11,8	85,6	79,0
EU346002	- 11	56,6	61,8	61,8	67,1	72,4	73,7	72,4	68,4	84,2	71,1	68,4
DQ095823	- 12	82,9	80,3	80,3	85,6	71,1	71,1	71,1	79,0	10,5	86,9	79,0
EU346014	- 13	84,2	79,0	79,0	84,2	23,7	25,0	23,7	85,6	79,0	84,2	82,9
U04179	- 14	89,5	79,0	79,0	85,6	25,0	25,0	25,0	86,9	79,0	84,2	84,2
FJ694932	- 15	72,4	39,5	39,5	46,0	79,0	79,0	79,0	57,9	84,2	68,4	55,3
FJ694947	- 16	65,8	77,7	77,7	82,9	84,2	84,2	84,2	80,3	93,5	84,2	80,3
FJ694959	- 17	47,4	39,5	39,5	57,9	67,1	67,1	67,1	60,5	75,0	65,8	59,2
AB033165	- 18	63,2	75,0	75,0	80,3	85,6	86,9	85,6	79,0	92,1	81,6	79,0
FJ604935	- 19	79,0	63,2	63,2	67,1	90,8	92,1	90,8	64,5	89,5	71,1	61,8
EU240849	- 20	64,5	56,6	56,6	63,2	77,7	79,0	77,7	44,7	85,6	40,8	44,7
A033166	- 21	65,8	57,9	57,9	63,2	79,0	79,0	79,0	46,0	86,9	42,1	46,0
EU346004	- 22	84,2	82,9	82,9	84,2	56,6	57,9	56,6	80,3	82,9	84,2	77,7
FJ694934	- 23	86,9	79,0	79,0	84,2	75,0	75,0	75,0	79,0	21,0	84,2	80,3
FJ694933	- 24	71,1	50,0	50,0	55,3	80,3	79,0	80,3	32,9	80,3	50,0	42,1
FJ694930	- 25	48,7	59,2	59,2	63,2	76,3	77,7	76,3	64,5	82,9	71,1	65,8
EU345998	- 26	73,7	48,7	48,7	55,3	81,6	82,9	81,6	56,6	89,5	63,2	59,2
AB033167	- 27	65,8	48,7	48,7	55,3	77,7	79,0	77,7	34,2	79,0	50,0	42,1
FJ694945	- 28	0	63,2	63,2	68,4	84,2	85,6	84,2	67,1	84,2	75,0	69,8
FJ694944	- 29	ID	63,2	63,2	68,4	84,2	85,6	84,2	67,1	84,2	75,0	69,8
IBC0028	- 30	95,2%	ID	0	6,5	75,0	75,0	75,0	47,4	82,9	61,8	50,0
IBC0064	- 31	95,2%	100,0%	ID	6,5	75,0	75,0	75,0	47,4	82,9	61,8	50,0
IBC0245	- 32	94,8%	99,5%	99,5%	ID	80,3	81,6	80,3	65,8	84,2	67,1	56,6
IBC0040	- 33	93,6%	94,3%	94,3%	93,9%	ID	1,3	0	84,2	73,7	84,2	82,9
IBC0098	- 34	93,5%	94,3%	94,3%	93,8%	99,9%	ID	1,3	84,2	72,4	84,2	84,2
IBC0185	- 35	93,6%	94,3%	94,3%	93,9%	100,0%	99,9%	ID	84,2	73,7	84,2	82,9
IBC0129	- 36	94,9%	96,4%	96,4%	95,9%	93,6%	93,6%	93,6%	ID	82,9	55,3	42,1
IBC0190	- 37	93,6%	93,7%	93,7%	93,3%	94,4%	94,5%	94,4%	93,7%	ID	84,2	81,6
IBC0212	- 38	94,3%	95,3%	95,3%	94,9%	93,3%	93,3%	93,3%	95,8%	93,3%	ID	42,1
BOT0003	- 39	94,7%	96,2%	96,2%	95,7%	93,7%	93,6%	93,7%	96,8%	93,8%	96,8%	ID