Lígia Maria Ayres-Ostrock

Versão corrigida

**“Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae*
e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta):
aspectos fenológicos, fisiológicos e
moleculares”**

“Population studies in *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): phenological, physiological and molecular aspects”

**São Paulo
2014**

Lígia Maria Ayres-Ostrock

**“Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae*
e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta):
aspectos fenológicos, fisiológicos e
moleculares”**

“Population studies in *Gracilaria birdiae* and *G.*
caudata (Gracilariales, Rhodophyta): phenological,
physiological and molecular aspects”

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências Biológicas,
na área de Botânica.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Estela Maria Plastino
Co-orientador(a): Prof. Dr. Christophe Destombe

**São Paulo
2014**

Ayres-Ostrock, Lígia Maria

Estudos populacionais de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*:
abordagens fenológicas, fisiológicas e moleculares. 201 páginas.

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

1. *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*; 2 – genética de população; 3 –
filogeografia

I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador (a)

Ao meu grande amor Guilherme Henrique por todo o
amor, paciência, carinho e compreensão; e por todos
os momentos maravilhosos.

Aos meus queridos pais, Neusa Maria e Paulo por
todo o incentivo, com carinho.

À Polly, Napoleão, Buffy, Darwin, Shaggy, Meggie
e Café por tornarem minha vida especial.

*Les opiniâtres sont les sublimes. Qui n'est que
brave n'a qu'un accès, qui n'est que vaillant n'a
qu'un tempérament, qui n'est que courageux n'a
qu'une vertu; l'obstiné dans le vrai a la grandeur.
Presque tout le secret des grands coeurs est dans
ce mot : Perseverando. La persévérance est au
courage ce que la roue est au levier; c'est le
renouvellement perpétuel du point d'appui... ..*

*Ne pas laisser discuter sa conscience
ni désarmer sa volonté, c'est ainsi qu'on obtient
la souffrance et le triomphe. Dans l'ordre des
faits moraux, tomber n'exclut point planer. De la
chute sort l'ascension. Les médiocres se laissent
déconseiller par l'obstacle spécieux; les forts,
non. Périr est leur peut-être, conquérir est leur
certitude... ..*

*Le dédain des objections
raisonnables enfante cette sublime victoire
vaincue... ..*

Victor Hugo - Travailleurs du mer

“Just as the polymerase chain reaction leveled the genetic playing field at the end of the 20th century by providing easy access to the genes of all organisms, so the 21st century promises to sweep away the technological privileges of classic model organisms and democratize genomic exploration.”

Camille Bonneaud *et al.* (2008)

“There is abundant geographical variation in both morphology and gene frequency in most species. The extent of geographic variation results from a balance of forces tending to produce local genetic differentiation and forces tending to produce genetic homogeneity.”

Montgomery Slatkin (1987)

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Estela Plastino, pela orientação, pela amizade e pela paciência.

À Prof^o. Dr Christophe Destombe et à Dra. Myriam Valero, pour tout le soutien et l'hospitalité pendant mon séjour à Roscoff. Par la critiques et suggestions lors de la préparation de ce travail.

À Prof^a. Dr^a. Mariana Cabral de Oliveira, pela indelével contribuição na realização desse trabalho.

Ao Rosário Petti, pela amizade e ajuda em inúmeras ocasiões. Aos técnicos William Silva Oliveira e André Nakasato, pela ajuda e compreensão em inúmeras ocasiões.

À Tatiana C Silveira Corrêa, pela paciência e boa vontade para acompanhar os procedimentos de sequenciamento.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida (no. 2011/10189-8 e 2010/50175-3).

Aos LAMigos, Beatriz (e Alberta), Mariana, Janaína, Fernando, Milena, Rafaela, Rossi, Talita, Karoline (e Helena), Vanessa, Fabiana, André, Alexandre, Fábio, Cíntia e Carol, por muitos momentos agradáveis e inesquecíveis passados juntos. Em especial para as minhas meninas e para meu grande amigo Carlos Eduardo (lagosta).

A todos os professores e funcionários do Depto. de Botânica (IB/USP) que estiveram presentes em diferentes etapas desse trabalho.

À Marcela Amaral Carneiro, por sua ajuda durante a coleta realizada em Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.

Ao Toivi Masih Neto por sua ajuda durante a coleta realizada em Paracurú, Ceará.

À Prof Dra. Sonia Maria Barreto Perreira (Universidade Federal de Pernambuco), à Maria de Fátima e Maria Elizabeth por sua ajuda durante as coletas realizadas em Pernambuco.

Ao Prof Dr. José Marcos de Castro Nunes do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) da Universidade Federal da Bahia, à Goya, Priscila e João, por sua ajuda durante as coletas realizadas no Estado da Bahia.

À Prof^a. Dra. Ana Paula Valentim Pereira por sua ajuda durante as coletas realizadas no Estado do Espírito Santo.

To all the friends I made during my internship in France, specially, Adriana, Gregory, Catherine, Lesley, Elizabeth, Aga, Daniel, James and Angélique. I miss you all.

À tous mes collègues de la Station Biologique de Roscoff (UMI 3614). À Stéphane Mauger, pour toute l'aide et la compréhension au cours de mon travail dans le laboratoire. À Denis Roze, Jérôme Coudret, Camille Gervais, Marie Rescan, Alejandro Montecinos, Aliou Dia, Lucie Couceiro, Claire Daguin-Thiébaud et Charlotte Roby, pour tous les moments inoubliables et de nombreux gâteaux.

À Daiana Sanches pela ajuda na edição das imagens.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais, Neusa Maria e Paulo, por viverem comigo todas as alegrias e problemas relacionados à confecção desse trabalho. Por serem meus maiores incentivadores, pelo enorme apoio ao longo de toda a minha vida e por tanto investimento e amor.

Ao meu grande amor Guilherme Henrique, por seu carinho, amor e compreensão em todas as etapas desse trabalho, e por sempre estar ao meu lado....

Índice

Capítulo 1 – Introdução geral	11
Capítulo 2 – <i>Gracilaria birdiae</i> e <i>G. caudata</i> (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos de populações da costa brasileira	26
Introdução	27
Materiais e métodos	30
Material biológico	30
Amostragem populacional	32
Análises estatísticas	32
Resultados	32
<i>G. birdiae</i>	32
<i>G. caudata</i>	37
<i>Gracilaria birdiae</i> X <i>G. caudata</i>	42
Discussão	44
Capítulo 3 – <i>Gracilaria birdiae</i> e <i>G. caudata</i> (Gracilariales, Rhodophyta): respostas fotossintetizantes em populações da costa brasileira	50
Introdução	52
Materiais e métodos	56
Material biológico	56
Cálculo do coeficiente de Absortância	56
Fluorescência <i>in vivo</i> da clorofila <i>a</i>	58
Resultados	59
<i>G. birdiae</i>	59
<i>G. caudata</i>	66
<i>Gracilaria birdiae</i> X <i>G. caudata</i>	73
Discussão	81
Capítulo 4 – Development and characterization of microsatellite markers in <i>Gracilaria birdiae</i> and <i>G. caudata</i> (Gracilariales, Rhodophyta) using 454 sequencing data	92

Introduction	94
Materials and methods	96
Data pre-processing and microsatellite discovery	96
Test for polymorphism and PCR amplification	96
Sampling and DNA extraction for population analyses	98
Data analyses within populations	98
Results	99
Development of microsatellite	99
Genotypic and genetic diversity within the Ceará state	100
Discussion	101

Capítulo 5 – *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): diversidade genética em populações da costa brasileira 111

Introduction	114
Materials and methods	118
Biological material	118
DNA extraction	119
Agarose gel electrophoresis	121
PCR reactions	121
Microsatellites	122
Purification of the PCR product	122
DNA quantification	123
Sequencing	123
Assembly and analysis of the sequences for plastidial, mitochondrial, and nuclear markers	123
Phylogenetic analyses	123
Analysis of population structure	123
Development of <i>cox1</i> primers specific for <i>G. birdiae</i> and <i>G. caudata</i>	124
Microsatellites data analysis	124
Results	125
Plastidial, mitochondrial, and nuclear molecular markers	125
Microsatellites	137
Discussion	166
Plastidial, mitochondrial, and nuclear molecular markers	166

Microsatellites	168
Capítulo 6 – Conclusões finais	174
Resumo	179
Abstract	181
Referências bibliográficas	183

Capítulo 1 - Introdução geral

1. Diversidade intraespecífica

A diversidade intraespecífica compreende todo o conjunto de expressões fenotípicas em indivíduos de uma determinada espécie, decorrentes tanto de processos de aclimação quanto de processos de adaptação (Plastino & Guimarães, 2001). A detecção e quantificação da variabilidade genética intraespecífica é essencial para elucidar fatores-chave que afetam a especiação e a extinção (Wattier *et al.*, 1997; Guo, 2012). Além disso, avaliando-se a diversidade genética, é possível estimar aspectos relacionados à variação intra-populacional, fluxo gênico e recrutamento (Zuccarello *et al.*, 1999b; Engel *et al.*, 2004).

Variações genotípicas intraespecíficas podem ocorrer em uma mesma população ou entre populações distintas. Essas variações são denominadas de polimorfismo, quando em um mesmo habitat ocorrem, simultaneamente, duas ou mais formas descontínuas de determinada espécie, em tais frequências que a mais rara delas não pode ser meramente mantida por mutação recorrente ou imigração (Ford, 1964). Assim, o polimorfismo é decorrente de processos adaptativos em uma mesma população, e as variantes são denominadas de morfos ou morfotipos (Plastino & Guimarães, 2001). No entanto, quando as variações genotípicas estão relacionadas a adaptações dos organismos a ambientes distintos, resultando em populações de uma mesma espécie geneticamente diferentes, utiliza-se o termo ecótipo (Innes, 1984).

A ocorrência de ecótipos em macroalgas marinhas tem sido relatada para algumas espécies como *Delesseria sanguinea* e *Membranoptera alata* (Rietema, 1991), cujas populações provenientes do Atlântico norte e do Mar Báltico apresentavam adaptações a diferentes salinidades. Em *Valonia utricularis*, ecótipos relacionados à temperatura foram identificados após a comparação entre indivíduos provenientes de populações do Mar Mediterrâneo, adaptados a baixas temperaturas, e indivíduos provenientes de populações do Mar Índico, adaptados a temperaturas elevadas (Eggert *et al.*, 2003). No gênero *Gracilaria*, ecótipos relacionados a diferentes condições de irradiância foram identificados entre os indivíduos de *G. birdiae* provenientes das populações dos Estados do Ceará e Espírito Santo (Ursi *et al.*, 2003, 2013; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a e b), e em *G. caudata* entre os indivíduos provenientes das populações dos Estados do Ceará e São Paulo (Araújo *et al.*, 2014).

As características genéticas de uma população são determinadas pelo equilíbrio entre mecanismos evolutivos, como seleção natural, deriva genética e fluxo gênico (Eckert *et al.*, 2008). A seleção natural promove a transmissão diferenciada de alelos específicos para a próxima geração. Indivíduos, cujos genótipos permitem um aumento na sua capacidade de sobrevivência e reprodução, têm maior probabilidade de transmitir seus alelos para a próxima geração. Em cada geração, apenas uma fração dos gametas produzidos são selecionados. Essa flutuação randômica da frequência dos genes é denominada de deriva genética (Valero *et al.*, 2001). O fluxo gênico é o processo migratório de alelos que ocorre preferencialmente entre populações adjacentes (Billot *et al.*, 2003). Entretanto, a descontinuidade de habitats, tais como a presença de desembocaduras de rios e trechos de substrato impróprio, entre outros, pode criar barreiras para o fluxo gênico e favorecer a diferenciação genética (Kimura & Weiss, 1964; Faugeron *et al.*, 2001; Billot *et al.*, 2003). Estudos indicam que para as algas a diferenciação genética pode ocorrer a partir de distâncias relativamente curtas, maiores que um metro e menores que 10 km (Billot *et al.*, 2003). Além disso, modos de dispersão distintos para gametas e/ou esporos podem resultar em variações na estrutura genética (Sosa & Lindstrom, 1999; Valero *et al.*, 2001). Tanto a seleção natural, como a deriva genética e o fluxo gênico, são fortemente influenciados pelo tamanho e distribuição das populações, além de variações em fatores bióticos e abióticos que podem afetar a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos (Eckert *et al.*, 2008).

A filogeografia é estudo dos processos históricos que podem ser responsáveis pela distribuição geográfica contemporânea de indivíduos (Avise, 2004). Visa identificar os componentes espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolucionários responsáveis. Dentre as macroalgas, algumas espécies têm sido alvo de estudos filogenéticos, como *Porphyra umbilicalis*, em que a diversidade genética foi relacionada a um evento de recolonização das populações da América do Norte a partir de populações doadoras da Europa, após as populações originais terem sido eliminadas durante a última glaciação (Teasdale & Klein, 2010). Já em *Fucus distichus*, verificou-se que a diversidade genética estava relacionada a pelo menos dois eventos distintos de colonização a partir da população do Atlântico Norte. Esses eventos provavelmente ocorreram entre o período da abertura do Estreito de Bering e a última glaciação. A presença da espécie no Atlântico Central sugere a colonização a partir de outros refúgios que atualmente são muito quentes para abrigar a espécie (Coyer *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos filogeográficos baseia-se na hipótese de distribuição “centro de abundância”, a qual pressupõe que as espécies apresentem um maior nível de diversidade no centro de sua distribuição geográfica, com as populações tornando-se progressivamente menos diversas e mais isoladas à medida que se aproximam do limite dessa distribuição (Vucetich & Waite, 2003; Eckert *et al.*, 2008). Esse efeito foi observado para as algas vermelhas *Chondrus crispus* (Provan *et al.*, 2012), *Grateloupia lanceola* (Maneiro *et al.*, 2011) e *Ahnfeltiopsis pusilla* (Couceiro *et al.*, 2011), cujas populações mais distantes apresentaram uma maior diferenciação genética, porém menos diversas.

A distribuição latitudinal do gradiente de diversidade deve também ser considerada quando a espécie estudada apresenta uma ampla distribuição geográfica, e cujas populações estão expostas a diferentes pressões seletivas (Guo, 2012). A latitude não está apenas relacionada à diversidade das espécies; ela pode influenciar também processos relacionados ao fluxo gênico, migrações e posições relativas das diferentes populações dentro da distribuição de uma espécie, bem como a distância entre elas (Pianka, 1966; Gaston, 2009). Martin & McKay (2004) verificaram que populações marginais de organismos distintos localizadas em latitudes menores apresentavam uma maior diversidade genética quando comparadas a populações marginais localizadas em maiores latitudes. Esse efeito foi também observado em algas vermelhas como *Mazzaella laminarioides*, cuja análise de diversas populações ao longo da costa do Chile demonstrou uma tendência para a redução da diversidade genética nas populações localizadas em latitudes mais elevadas (Montecinos *et al.*, 2012). Entretanto, na alga parda *Lessonia nigrescens* uma maior diversidade genética foi observada em populações localizadas em latitudes elevadas, provavelmente devido à existência de barreiras geográficas capazes de impedir o fluxo gênico entre as populações (Tellier *et al.*, 2009).

Até o presente momento não existem trabalhos que abordem a filogeografia e genética de populações de macroalgas marinhas da costa brasileira.

2. Aspectos fenológicos

O gênero *Gracilaria* apresenta um histórico de vida do tipo-*Polisiphonia*. Esse histórico é trifásico, constituído por uma fase haplóide, o gametófito; e duas fases diplóides, o tetrasporófito e o carposporófito (Kain & Destombe, 1995). O gametófito feminino de vida livre é fertilizado *in situ* e o zigoto dá origem ao carposporófito diplóide, uma geração produtora de carpósporos e parasita do gametófito feminino. Os

carpósporos dão origem a tetrasporófitos diplóides de vida livre, cujos esporângios sofrem meiose produzindo e liberando tetrásporos haplóides, que germinam e originam gametófitos dióicos.

Estudos realizados em populações naturais de algas gracilarióides sugerem que variações na frequência de indivíduos diplóides e haplóides estão relacionadas a diferenças na fertilidade e sobrevivência de ambos os estádios (Richerd *et al.*, 1993). Tais diferenças foram observadas em *G. domingensis* cultivadas em condições de laboratório, cujos tetrasporófitos tornaram-se férteis em um tempo menor que os gametófitos (Guimarães *et al.*, 1999). Em *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) a sobrevivência de plântulas tetrasporofíticas, quando sob condições artificiais, mostrou-se superior à das plântulas gametofíticas (Destombe *et al.*, 1993). Entretanto, a predominância de indivíduos tetrasporofíticos, observada na natureza em diversas espécies do gênero *Gracilaria*, sugere uma maior aptidão da fase diplóide (Destombe *et al.*, 1989). Além disso, fatores ambientais como sazonalidade, temperatura e variações nos regimes das chuvas e ventos podem afetar desde a adesão dos esporos e sobrevivência das plântulas, até a sua reprodução (Kain & Destombe, 1995).

Estudos que avaliem a frequência dos diferentes estádios reprodutivos em populações naturais são fundamentais, quando se pretende interpretar possíveis vantagens na manutenção de um histórico de vida complexo, como o observado em espécies do filo Rhodophyta.

3. Fotossíntese

A fotossíntese é o único processo biológico capaz de aproveitar a energia proveniente do sol (Taiz & Zeiger, 2006). A faixa do espectro solar utilizada pelas plantas para a fotossíntese, conhecida como “PAR” (Photosynthetically Active Radiation), correspondente ao intervalo de 400nm a 700nm (região visível do espectro) (Hollosoy, 2001).

Análises comparativas de características fisiológicas realizadas entre espécies diferentes ou dentro de uma mesma espécie, como em populações distintas, possibilitam o conhecimento da diversidade funcional das algas (Enriquez & Borowitzka, 2010). As Rhodophyta podem ocorrer em um limite variável de irradiância, sendo que muitas espécies crescem em níveis relativamente baixos de iluminação. A maioria apresenta características de “algas de sombra”, com baixos valores de saturação luminosa e fotossíntese máxima, e valores maiores para a eficiência fotossintetizante, quando

comparada a “algas de sol” (Gantt, 1990). As exceções são para aquelas da região entre-marés que sobrevivem a níveis de irradiância muito elevados, cujos valores podem atingir $2.500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nos tr\u00f3picos (Luning, 1990).

A energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes pode ser direcionada de tr\u00eas maneiras: i, utilizada em processos fotoqu\u00edmicos (fotoss\u00edntese), que podem ser entendidos como a transfer\u00eancia da energia dos f\u00f3tons da luz para o transporte de el\u00e9trons da fase “clara” da fotoss\u00edntese; ii, dissipada na forma de calor (via n\u00e3o fotoqu\u00edmica); e iii, reemitida como fluoresc\u00eancia (Maxwell & Johnson, 2000). A fluoresc\u00eancia, emitida principalmente pelo fotossistema II (PSII), \u00e9 a capacidade que os el\u00e9trons possuem de excitar-se ao receberem a energia trazida pela luz. Os centros de rea\u00e7\u00e3o (PSII e fotossistema I - PSI) recebem a energia de excita\u00e7\u00e3o da clorofila *a* (Schreiber *et al.*, 1994), e as rea\u00e7\u00f5es fotoqu\u00edmicas criam um fluxo de el\u00e9trons na forma de NADPH, os quais est\u00e3o relacionados \u00e0 forma\u00e7\u00e3o de ATP, fixa\u00e7\u00e3o de CO₂ pela Rubisco e ainda \u00e0 oxida\u00e7\u00e3o da \u00e1gua formando O₂ (Taiz & Zeiger, 2006).

Existem alguns m\u00e9todos para avaliar a fotoss\u00edntese, como t\u00e9cnicas de oxig\u00eanio dissolvido, assimila\u00e7\u00e3o de carbono e fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a*. Dentre eles, destaca-se o m\u00e9todo da fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a*, por ser n\u00e3o invasivo e de r\u00e1pida resposta. Esse m\u00e9todo mostrou-se uma ferramenta poderosa na avalia\u00e7\u00e3o fisiol\u00f3gica de organismos fotossintetizantes considerando-se varia\u00e7\u00f5es sazonais, temporais e geogr\u00e1ficas (Schreiber *et al.*, 1994). Curvas r\u00e1pidas de luz (RLC) constru\u00eddas a partir de medidas de fluoresc\u00eancia s\u00e3o caracterizadas por uma sucess\u00e3o de pulsos luminosos crescentes produzidos por uma fonte externa de luz act\u00ednica e intercalados por pulsos de luz saturante (Maxwell & Johnson, 2000). Diversos par\u00e2metros podem ser obtidos e avaliados a partir dessa t\u00e9cnica, como o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo e/ou efetivo e a taxa de transporte de el\u00e9trons.

Nas macroalgas, a t\u00e9cnica de fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a* vem sendo principalmente empregada nos \u00faltimos anos para avaliar o efeito de fatores abi\u00f3ticos, como temperaturas extremas, radia\u00e7\u00e3o ultravioleta, salinidade e condi\u00e7\u00f5es nutricionais. Al\u00e9m disso, os par\u00e2metros relacionados \u00e0 fotoss\u00edntese t\u00eam sido utilizados em avalia\u00e7\u00f5es intraespec\u00edficas, principalmente em diferentes popula\u00e7\u00f5es de esp\u00e9cies que apresentam uma ampla distribui\u00e7\u00e3o geografia, como *Gracilaria chorda*, que ocorre ao longo da costa do Jap\u00e3o (Terrada *et al.*, 2013). Em *G. vermiculophylla*, as diferen\u00e7as fisiol\u00f3gicas observadas entre tr\u00eas popula\u00e7\u00f5es amostradas no Jap\u00e3o, e evidenciadas pelos diferentes par\u00e2metros da fotoss\u00edntese, sugerem a ocorr\u00eancia de adapta\u00e7\u00f5es a condi\u00e7\u00f5es ambientais

específicas (Phooprong *et al.*, 2008). Os parâmetros da fotossíntese foram úteis para evidenciar diferenças fisiológicas entre indivíduos de *G. birdiae* provenientes das populações dos Estados do Ceará e do Espírito Santo (Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a, 2014b) e entre os indivíduos de *G. caudata* dos Estados do Ceará e de São Paulo (Araújo *et al.*, 2014); esses resultados sugerem a ocorrência de adaptações a condições ambientais específicas a que estão submetidas essas populações.

4. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares, que são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Avise, 2004; Ferreira & Grattapaglia, 1998), vêm sendo amplamente empregados nos estudos sobre diversidade genética. A utilização desses marcadores para esses estudos tem produzido informações valiosas sobre o fluxo gênico, estrutura populacional, relações filogeográficas, biogeografias e análises de parentesco e paternidade (Féral, 2002).

O uso de técnicas moleculares na avaliação da diversidade intraespecífica teve início na década de 60 com estudos sobre o polimorfismo de isoenzimas (Avise, 2004). Entretanto, dúvidas em relação à subestimação da variabilidade, além de dificuldades técnicas associadas à presença de ficocolóides, são algumas das razões para existirem poucos estudos em algas utilizando-se isoenzimas (Sosa & Lindstrom, 1999). Um dos primeiros trabalhos realizados com algas vermelhas utilizando-se da técnica de isoenzimas analisou uma população natural e dois cultivos de *Porphyra yezoensis* na costa do Japão (Gil-Kodaka *et al.*, 1988). Esse estudo observou uma maior diversidade genética na população natural, quando comparada ao cultivo, principalmente devido ao método de propagação vegetativa empregado nesses cultivos.

Posteriormente, a avaliação da diversidade passou a empregar o polimorfismo determinado pelo uso de enzimas de restrição ou RFLP. Essa técnica baseia-se no padrão de fragmentos produzidos pela digestão de um determinado DNA com uma endonuclease específica. Padrões diferentes nos tamanhos de fragmentos podem ser encontrados entre os diferentes indivíduos (Avise, 2004). Um dos primeiros estudos em macroalgas empregando a técnica de RFLP foi realizado por Goff & Coleman (1988), no qual foi possível identificar espécies de algas vermelhas, como *Gracilariopsis andersoni*, entre outras Florideophyceae.

O surgimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction) aumentou muito a eficiência na detecção de polimorfismos em nível de DNA e RNA, com a redução do tempo de execução, custo e complexidade dos experimentos (Avise, 2004). Essa técnica possibilita a obtenção de quantidades muito grandes de fragmentos específicos de DNA. Inicialmente utilizada em conjunto com a técnica de RFLP, a técnica de PCR possibilitou o surgimento de outras técnicas moleculares como RAPD, ou DNA polimórfico amplificado ao acaso. O RAPD foi utilizado na avaliação da diversidade intraespecífica de *Mazzaella laminarioides*, relacionando o aumento do isolamento genético ao aumento da distância geográfica (Faugeron *et al.*, 2001). Em *Gracilaria changii*, a técnica de RAPD permitiu a distinção dos sexos e dos diferentes estádios reprodutivos em duas populações amostradas na Malásia, a partir da identificação de marcadores específicos para gametófitos masculinos e femininos (Sim *et al.*, 2007). Posteriormente, surgiram técnicas semelhantes, como a reação de amplificação com um único “primer”, SPAR ou ISSR, na qual se amplifica o fragmento que existe entre duas regiões repetitivas, ou ainda a técnica do polimorfismo do tamanho de fragmento amplificado ou AFLP (Avise, 2004).

Recentemente, a avaliação da diversidade genética de macroalgas vem sendo incrementada devido aos avanços na tecnologia de marcadores moleculares, bem como de equipamentos relacionados. Nas últimas décadas, essas técnicas têm sido empregadas na identificação de diferentes Gracilariaceae (Bellorin *et al.*, 2002, 2004, 2008; Guillermin *et al.*, 2008; Gurgel *et al.*, 2004, 2008; Destombe *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012).

Entre os marcadores plastidiais, o gene da subunidade grande da enzima ribulose 1, 5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) (*rbcL*) e a região espaçadora entre os genes *rbcL* e *rbcS* mostraram-se eficientes na separação de espécies proximalmente relacionadas como, *Gracilariopsis mclachlanii* e *G. persica* (Bellorin *et al.*, 2008).

O DNA nuclear ribossomal (SSU e LSU) e seus espaçadores foram utilizados com sucesso na separação de diferentes espécies de *Gracilaria* (Harper & Saunders, 2001, 2002; Bellorin *et al.*, 2002). Além dele, o marcador molecular para a região do espaçador transcrito interno dos genes ribossomais ITS (Internal Transcribed Spacer) mostrou-se útil na identificação de espécimes de *G. chilensis* provenientes de populações amostradas no Chile e na Nova Zelândia (Cohen *et al.*, 2004).

O marcador molecular para a região espaçadora dos genes mitocondriais para a citocromo oxidase subunidades 2 e 3 (*cox2-3*) mostrou-se variável para populações de

Gracilaria changii amostradas ao longo da costa da Malásia (Yow *et al.*, 2013). Foi também empregado com sucesso na distinção de espécies proximamente relacionadas, como *G. gracilis* e *G. dura* (Destombe *et al.*, 2010).

Conhecido como o principal marcador proposto para o “DNA barcode”, o *cox1* corresponde a região 5’ do gene mitocondrial que codifica para a enzima citocromo *c* oxidase 1. Inicialmente empregado na identificação de espécies animais (Herbert *et al.*, 2003a e b), esse marcador vem sendo utilizado com sucesso na identificação de diferentes espécies de algas. O *cox1* foi primeiramente empregado na identificação de algas vermelhas por Saunders (2005), possibilitando também o reconhecimento da estrutura populacional e da diversidade intraespecífica em *Gracilaria gracilis* (Robba *et al.*, 2006).

Os microssatélites, conhecidos também como “Simple Sequence Repeats” (SSR) ou “Short Tandem Repeats” (STR) (Rice & Bird, 1990), possibilitam determinar a diversidade genética em nível do indivíduo, população ou espécie (Wattier *et al.*, 1997). São regiões repetitivas de DNA compostas por motivos curtos (de um a dez nucleotídeos repetidos lado a lado), dispersos no genoma de eucariotos e procariotos (Field & Wills, 1996; Tóth *et al.*, 2000). Muitos microssatélites apresentam taxas mutacionais elevadas (entre 10^{-2} e 10^{-6} mutações por *locus* por geração), gerando um alto nível de diversidade alélica, ideal para estudos genéticos que visem avaliar processos evolutivos (Schlötterer, 2000). O uso de microssatélites mostrou-se eficiente como marcador de genótipos distintos dentro de uma mesma população de *G. gracilis* (Wattier *et al.*, 1997). Em *G. changii*, microssatélites foram utilizados na distinção entre populações amostradas ao longo da costa da Malásia (Song *et al.*, 2013). Esse estudo também foi capaz de identificar três espécies de *Gracilaria*: *G. changii*, proveniente da Malásia; *G. manilaensis*, proveniente das Filipinas; e *G. fisheri*, proveniente da Tailândia.

Não foram observados até o momento estudos com macroalgas marinhas da costa brasileira que utilizem a técnica de microssatélites para avaliar a diversidade genética em diferentes populações de uma mesma espécie.

5. *G. birdiae* e *G. caudata*

A expressão “algas gracilarióides” tem sido empregada na literatura para designar espécies da família Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta), pertencentes aos gêneros *Gracilaria* Greville, *Gracilariopsis* E. Y. Dawson e *Hydropuntia* Montagne

(= *Polycavernosa* C. F. Chang & B. M. Xia). Esses gêneros ocorrem predominantemente nas regiões tropicais (Oliveira & Plastino, 1994) e incluem espécies consideradas importantes fontes de ágar (Oliveira *et al.*, 2000).

Gracilaria birdiae Plastino & E. C. Oliveira e *G. caudata* J. Agardh são algas típicas de regiões entremarés com ampla distribuição na costa brasileira, cujas populações de diferentes latitudes estão expostas a distintas irradiâncias e temperaturas. *G. birdiae* ocorre desde a costa do Estado do Ceará, até a costa do Estado do Espírito Santo (Plastino & Oliveira, 2002), enquanto que *G. caudata* apresenta uma distribuição mais ampla, ocorrendo desde o Caribe, até a costa do Estado de Santa Catarina (Plastino e Oliveira, 1997). As variações ambientais, decorrentes das diferentes latitudes, entre outros fatores, podem ter selecionado adaptações locais, como por exemplo, adaptações a altas intensidades luminosas em populações localizadas em áreas próximas ao Equador (Plastino, 2004). *G. birdiae* apresenta indivíduos mais robustos, quando comparados a indivíduos de *G. caudata*, que são de aspecto mais delicado. Além disso, a distinção dessas espécies é possível por meio de análise das estruturas reprodutivas: i, em *G. birdiae* os espermatângios são do tipo *henriquesiana*, já em *G. caudata* os mesmos são predominantemente do tipo *verrucosa*; ii, os cistocarpos apresentam uma constrição basal em *G. birdiae*, sendo essa ausente em *G. caudata*; iii, o pericarpo é mais espesso em *G. birdiae*, quando comparado ao observado em *G. caudata*; e, iv, cistocarpos apresentam células tubulares nutritivas em *G. caudata*, ausentes em *G. birdiae* (Plastino & Oliveira, 2002).

Variantes pigmentares de *Gracilaria birdiae* foram encontradas em populações naturais ou obtidas espontaneamente em laboratório (Costa & Plastino, 2001, 2011; Plastino *et al.*, 2004). A partir do isolamento e cultivo desses indivíduos, vários experimentos foram delineados, testando-se condições abióticas possíveis de serem simuladas em laboratório. Resultados prévios com linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas de diferentes colorações de talo sugerem diversidade quanto às taxas de crescimento e fotossíntese (Costa, 2000; Costa & Plastino, 2001; Ursi *et al.*, 2003, 2013; Barufi, 2004; Donato, 2005; Plastino *et al.*, 2004; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a, 2014b).

Além da diversidade verificada entre diferentes estádios reprodutivos e também entre variantes de cor, foram analisados comparativamente indivíduos de linhagens selvagens de *Gracilaria birdiae* procedentes dos Estados do Ceará e do Espírito Santo. Essas análises mostraram diferenças quanto às curvas de fotossíntese e seus parâmetros.

Tanto a irradiância de compensação quanto a saturação luminosa foram menores em indivíduos do sudeste, enquanto que a eficiência fotossintetizante foi maior para esses mesmos indivíduos (Ursi *et al.*, 2003). Essas observações parecem estar de acordo com as condições de irradiância presentes nos dois locais de origem, sugerindo uma maior sensibilidade à luz para populações do Sudeste. Outro aspecto a ser considerado quanto às propriedades relacionadas à fotossíntese diz respeito às diferenças também observadas entre essas linhagens, quando submetidas a temperaturas diversas. A fotossíntese de ambas foi limitada a 20° C. Entretanto, a fotossíntese de indivíduos do sudeste foi superior em 25° C, quando comparada à verificada em 30° C. No entanto, o desempenho fotossintetizante de indivíduos do nordeste foi o mesmo em 25° e 30° C, sugerindo que estes últimos estão adaptados a temperaturas superiores, o que parece compatível com o ambiente em que ocorrem (Ursi *et al.*, 2003).

Em *G. caudata*, tetrasporófitos e gametófitos femininos derivados de plantas dos Estados do Ceará e de São Paulo foram comparados quanto às taxas de crescimento, conteúdo pigmentar e fotossíntese, após serem submetidos à radiação UV-B. Os tetrasporófitos apresentaram taxas de crescimento, conteúdo pigmentar e parâmetros da fotossíntese superiores aos observados para os gametófitos femininos, independentemente da população avaliada e da exposição à UV-B (Araújo *et al.*, 2014). Além disso, a exposição a essa radiação promoveu quedas nas taxas de crescimento mais acentuadas em indivíduos da população de São Paulo, quando comparadas às observadas em indivíduos do Ceará. Indivíduos de *G. birdiae* do nordeste e sudeste foram também comparados quando submetidos à radiação UV-B (Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a e b). Curvatura acentuada dos ápices e mudanças na coloração foram observadas, principalmente na linhagem do Sudeste, cujos ápices adquiriram aspecto espiralado; além disso, houve um aumento no número de grãos de amido, tanto para a linhagem do Sudeste como para as do Nordeste, o que sugere danos metabólicos e impossibilidade de utilizar reservas para a manutenção do organismo.

Em síntese, as respostas diferenciadas, obtidas para as linhagens selvagens do nordeste e do sudeste de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*, são, possivelmente, decorrentes de alterações genéticas ocorridas ao longo da evolução das populações submetidas a pressões ambientais distintas. Esses dados sugerem diferenciações ecótípicas entre as populações e estimulam novas investigações sobre o tema.

6. Justificativa

Este trabalho integra uma linha de pesquisa iniciada no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (LAM – IBUSP), bem como em âmbito nacional, relacionada à seleção e caracterização de linhagens de espécies de maior potencial econômico. Dentre estas, destacam-se as do gênero *Gracilaria*, que constituem o recurso brasileiro mais importante para a produção de ágar e têm sido objeto de vários estudos no país, sendo a maioria deles desenvolvidos pela equipe do LAM (Plastino, 2008). Esses estudos permitiram a seleção e caracterização de linhagens de cor de *G. birdiae* e possibilitaram análises fisiológicas comparativas entre indivíduos procedentes de populações distantes cerca de 17° de latitude (Estados do Ceará e Espírito Santo). Em *G. caudata* foram selecionadas linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas que possibilitaram análises fisiológicas comparativas entre indivíduos procedentes de populações dos Estados do Ceará e São Paulo. Dentre os aspectos analisados para ambas espécies, destacam-se: i, o conteúdo pigmentar (Ursi *et al.*, 2003; Barufi, 2004; Plastino *et al.*, 2004; Donato, 2005; Ursi, 2005; Costa & Plastino, 2010; Araújo *et al.*, 2014); ii, o crescimento em diferentes condições abióticas (Ursi, 2000; Ursi & Plastino, 2001; Barufi, 2004; Plastino *et al.*, 2004; Costa, 2005; Donato, 2005; Ursi, 2005; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014b; Araújo *et al.*, 2014); iii, o aproveitamento do nitrato e o metabolismo do nitrogênio (Costa, 2005; Donato, 2005); iv, a fotossíntese (Ursi *et al.*, 2003; Donato, 2005; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a; Araújo *et al.*, 2014); v, a ultraestrutura (Plastino & Costa, 1999; 2001; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014b); vi, a composição polissacarídica (Ursi *et al.*, 2013); e vii, os efeitos da radiação ultravioleta (Araújo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a e b). As respostas obtidas nesses trabalhos sugerem que algumas dessas linhagens apresentam genótipos distintos.

Este trabalho pretende avaliar a estrutura genética de populações de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*. Essa abordagem inédita para algas marinhas da costa brasileira deve contribuir para a compreensão da diversidade genética presente nas espécies e fornecer subsídios para interpretações sobre a distribuição geográfica. Esses dados serão acrescidos de informações fisiológicas, não somente das populações amostradas, como também dos estádios reprodutivos dos indivíduos que compõem cada população.

O emprego de técnicas moleculares relacionadas aos marcadores moleculares plastidiais (*rbcL*), mitocondriais (*cox1* e *cox2-3*) e nucleares (SSU e ITS) contou com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Mariana Cabral de Oliveira (LAM, IBUSP). Os estudos de filogeografia contaram com a colaboração do Prof. Dr. Christophe Destombe

(Universite' Pierre et Marie Curie - Paris 6, França) e da Dr^a. Myriam Valero (Station Biologique de Roscoff, França). O Dr. Destombe e a Dra Valero destacam-se no cenário internacional pelos estudos sobre a filogeografia e genética de populações de algas marinhas, incluindo espécies de *Gracilaria*.

7. Objetivos

7.1. Objetivos gerais

Considerando-se a importância de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*, como as principais agarófitas coletadas no nordeste brasileiro, e o conhecimento já obtido com relação às diferenças fisiológicas entre indivíduos de suas populações, foram avaliadas as características fenológicas, a diversidade genética e os parâmetros relacionados à fotossíntese de populações selecionadas ao longo da costa brasileira, para ambas espécies.

A diversidade genética foi acessada por meio de marcadores plastidiais (*rbcL*), mitocondriais (*cox1* e *cox2-3*), nucleares (SSU) e microssatélites; e a fotossíntese foi avaliada a partir de dados coletados na natureza. O conjunto dos resultados foi analisado considerando-se possíveis descontinuidades de habitat. Esses dados devem contribuir para uma melhor interpretação das possíveis relações evolutivas entre as diferentes populações distribuídas ao longo da costa brasileira.

7.2. Hipóteses

- A abordagem fenológica permitiu testar as seguintes hipóteses: i, a predominância de indivíduos tetrasporofíticos em populações naturais, tanto de *G. birdiae* como de *G. caudata*; e ii, a ocorrência de uma maior proporção de tetrasporófitos em *G. caudata* para as populações da região Nordeste, quando comparadas às populações da região Sudeste. Presume-se que a fase tetrasporofítica seja mais resistente e, portanto, com mais condições de sobreviver em ambientes adversos (região entre-marés). Como na região Sudeste as condições de irradiâncias são mais amenas, a sobrevivência de gametófitos poderia ser favorecida.
- A análise de parâmetros da fotossíntese permitiu testar a hipótese de que diferentes populações, estádios reprodutivos e linhagens de cor

apresentam adaptações fisiológicas frente às condições a que são submetidos no ambiente. Foram avaliados: i, populações de *G. caudata* das regiões Nordeste e Sudeste da costa brasileira, sujeitas, entre outros fatores, a distintas condições de irradiância; ii, diferentes estádios reprodutivos de cada uma das populações de *G. birdiae* e *G. caudata* amostradas ao longo da costa brasileira; e iii, linhagens cromáticas de uma mesma população de *G. birdiae*.

- A abordagem genética possibilitou testar a hipótese da existência de uma diversidade intraespecífica em *G. birdiae* e *G. caudata*, considerando-se populações distribuídas ao longo da costa. Foi avaliada por meio de marcadores moleculares citoplasmáticos, nucleares e microssatélites. Essa análise permite testar se as variações fisiológicas observadas previamente em estudos de laboratório são passíveis de serem corroboradas por meio de marcadores genéticos.

8. Materiais e métodos

8.1. Material biológico

Durante a realização desse trabalho, foram amostradas quatro populações de *Gracilaria birdiae* e sete populações de *G. caudata*, selecionadas ao longo da costa brasileira (Tabela 1).

8.2. Método amostral

As amostras foram obtidas utilizando-se três transecções de 20 metros de comprimento, posicionadas na região entre-marés, de forma perpendicular à linha da costa, para cada uma das espécies analisadas, após a localização das populações. Entretanto, em alguns locais a extensão do banco não permitia esse posicionamento; nesses casos as transecções acompanharam o eixo de maior extensão do banco. Foi o caso da população amostrada no Estado do Espírito Santo. Além disso, a população de *G. caudata* do Município de São Sebastião estava limitada a um trecho pequeno do substrato no qual não foi possível a realização de transecções; essa amostragem foi feita de maneira aleatória.

Trinta e cinco indivíduos foram amostrados por transecção, totalizando 105 indivíduos por população. Os pontos de coleta em cada uma das transecções foram determinados a partir de tabelas de números aleatórios, preparadas em sorteios realizados pelo programa Excell (2010). Apenas um ramo foi removido por indivíduo amostrado, visando à identificação do estágio reprodutivo. Os ramos selecionados foram armazenados em embalagens individuais confeccionadas de tela tipo “sombrite” para a análise posterior e identificação dos diferentes estádios reprodutivos (gametófitos femininos com cistocarpos, gametófitos masculinos e tetrasporófitos). Os gametófitos femininos foram identificados a olho nu pela presença de cistocarpos no talo. Os gametófitos masculinos e os tetrasporófitos foram identificados por meio de microscópio estereoscópico (American Optical FORTY) logo após a coleta. Talos sem tetrasporângios ou criptas espermatângiais foram considerados inférteis. As medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas com representantes dos diferentes estádios reprodutivos (capítulo 3). A partir dos mesmos indivíduos amostrados para os estudos fenológicos (capítulo 2), foram selecionados ápices de indivíduos tetrasporofíticos para a amostragem destinada aos estudos genéticos (capítulos 4 e 5). Os ramos que não exibiam danos morfológicos ou a presença de epífitos foram selecionados, limpos com o auxílio de papel absorvente, acondicionados em frascos de polipropileno tipo “falcon”, devidamente etiquetados e armazenados em sílica gel até a extração do DNA.

Parte do material de *Gracilaria birdiae* coletado já se encontra depositado no Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo: Rio do Fogo (RN) SPF 57393 – 57399, 57401, 57403; Paracurú (CE) SPF 57369 – 57374; Parati (ES) SPF 57349 – 57354. Os exemplares de *G. birdiae* provenientes de Ipojuca (PE) e os de *G. caudata*, provenientes de todas as localidades amostradas encontram-se em processamento de inclusão.

Tabela 1. Localização das populações de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* ao longo da costa brasileira selecionadas para a realização deste trabalho.

Região (Estado)	Município	Local (Praia)	Coordenadas (GPS)		Data da amostragem	
					<i>G. birdiae</i>	<i>G. caudata</i>
Ceará	Paracurú	Pedra Rachada	03°23'87.0"S	39°00'67.0"W	08/02/2012	-
		Naufrágio	03°23'50.5"S	39°00'38.8"W	-	09/02/2012
Rio Grande do Norte	Rio do Fogo	Rio do Fogo	05°15'41.0"S	35°23'11.0"W	27/09/2011	28/09/2011
Paraíba	Conde	Carapibus	07°17'62.9"S	34°48'08.5"W	-	21/07/2012
Pernambuco	Ipojuca	Muro Alto	08°26'13.0"S	34°58'47.0"W	12/03/2013	-
	Recife	Boa Viagem	08°07'58.9"S	34°53'57.3"W	-	14/03/2013
Bahia	Arembepe	Emissário	12°44'28.0"S	38°09'01.0"W	14/10/2012	15/10/2012
Espírito Santo	Anchieta	Parati	20°48'31.0"S	40°36'39.0"W	-	05/05/2012
São Paulo	São Sebastião	Cigarras	23°55'01.0"S	46°19'16.8"W	-	03/10/2013

Capítulo 2 - *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos de populações da costa brasileira.

1. Abstract

The frequency of different reproductive stages (tetrasporophytes, male gametophytes and female gametophytes with cystocarps) was evaluated for populations of *Gracilaria birdiae* (CE, RN, PE, and BA) and *G. caudata* (CE, RN, PB, PE, BA, ES, and SP) selected along the Brazilian coast. This approach allows us to test the assumptions: i, the predominance of tetrasporophytes in natural populations of *G. birdiae* and *G. caudata*; and ii, the existence of a higher proportion of tetrasporophytes in *G. caudata* for the Northeast populations, when compared to the Southeast populations. The samples were obtained using three 20 meters transects, positioned in the intertidal region, perpendicular to the shore during low tide. Thirty-five individuals were sampled by transect, totaling 105 individuals per population. Tetrasporophytes were found in greater numbers in all sampled populations. In *G. caudata*, a higher proportion of tetrasporophytes was observed for the Northeast populations, compared to the Southeast populations. The frequency of female gametophyte with cystocarps (♀) and male gametophytes (♂) varied among different populations: *G. birdiae*, from 3.81% (♀ PE) to 28.58% (♀ BA) and from 2.80% (♂ CE) to 13.34% (♂ RN); *G. caudata*, from 1.91% (♀ PB) to 21.91% (♀ ES) and from 2.86% (♂ CE) to 37.14% (♂ ES). In the current study, ♀ gametophytes were found in greater numbers for the CE populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, and for the BA population of *G. birdiae*, whose samples were taken during the summer and spring, respectively. The highest frequency of ♂ gametophytes was observed in *G. caudata* for the populations of PB and ES, sampled during winter. Although a larger amount of ♂ gametophytes were observed in the RN populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, and in the PE population of *G. birdiae*, it was not possible to relate these results to abiotic factors, since our sample were punctual, held in early spring (RN) and late summer (PE). The absence of infertile plants sampled in most populations, or its low frequency, 4% (RN) in *G. birdiae*, and 0.95% (RN and PE) and 8.57% (SP) for *G. caudata* indicate the high fertility of the species. The presence of epiphytic gametophytes in tetrasporophytes was observed in both species studied, however, they were prevalent in *G. caudata*. A comparative analysis of *G. birdiae* and *G. caudata* held for the populations sampled within the same State (RN, CE, and PE) showed no difference in the proportions of reproductive stages between species. Variations in the proportions of reproductive stages observed for *G. birdiae* and *G. caudata*, and previously reported for various species of *Gracilaria* is attributed to environmental changes, which include, among others, seasonality, precipitation and nutrient concentration.

2. Resumo

A frequência dos diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos, gametófitos masculinos e gametófitos femininos com cistocarpos) em diferentes populações

distribuídas ao longo da costa brasileira foi avaliada para *Gracilaria birdiae* (CE, RN, PE e BA) e *G. caudata* (CE, RN, PB, PE, BA, ES e SP). Essa abordagem permitiu testar os seguintes pressupostos: i, a predominância de indivíduos tetrasporófitos em populações naturais tanto de *G. birdiae* como de *G. caudata*; e ii, a existência de uma maior proporção de tetrasporófitos em *G. caudata* para as populações avaliadas da região Nordeste, quando comparadas às populações da região Sudeste da costa brasileira. As amostras foram obtidas utilizando-se três transecções de 20 metros de comprimento, posicionadas na região entre-marés, de forma perpendicular à linha da costa, durante a maré baixa. Trinta e cinco indivíduos foram amostrados por transecção, totalizando 105 indivíduos por população. Tetrasporófitos foram encontrados em maior número em todas as populações amostradas, como esperado. Em *G. caudata*, uma maior proporção de tetrasporófitos foi observada para as populações da região Nordeste, quando comparada às populações da região Sudeste. A frequência de gametófitos femininos com cistocarpos (♀) e gametófitos masculinos (♂) variou nas diferentes populações: *G. birdiae*, 3,81% (♀ PE) a 28,58% (♀ BA) e 2,80% (♂ CE) a 13,34% (♂ RN); *G. caudata*, 1,91% (♀ PB) a 21,91% (♀ ES) e 2,86% (♂ CE) a 37,14% (♂ ES). No atual estudo, gametófitos ♀ foram encontrados em maior número nas populações de *G. birdiae* e *G. caudata* do CE e na população de *G. birdiae* da BA, cujas amostragens foram realizadas durante o verão e primavera, respectivamente. A maior frequência de gametófitos ♂ foi observada em *G. caudata* para as populações de PB e ES que foram amostradas durante inverno. As demais amostragens foram pontuais, realizadas no início da primavera (RN) e fim do verão (PE). A ausência de plantas inférteis na maioria das populações amostradas, ou a baixa frequência, 4% (RN) em *G. birdiae* e 0,95% (RN e PE) e 8,57% (SP) para *G. caudata*, indicam a elevada fertilidade das espécies. A presença de gametófitos epífitas em tetrasporófitos foi observada em ambas espécies estudadas, entretanto, eles foram predominantes em *G. caudata*, da região nordeste. As variações na proporção dos diferentes estádios reprodutivos observadas para *G. birdiae* e *G. caudata*, e previamente relatada para diversas espécies de *Gracilaria* é atribuída a variações ambientais, que incluem, entre outras, sazonalidade, precipitação e concentração de nutrientes.

3. Introdução

O gênero *Gracilaria* apresenta um histórico de vida do tipo-*Polisiphonia*. Esse histórico é trifásico, constituído por uma fase haplóide, o gametófito; e duas fases diplóides, o tetrasporófito e o carposporófito (Kain & Destombe, 1995). O gametófito feminino é fertilizado *in situ* e o zigoto dá origem ao carposporófito diplóide, uma geração produtora de esporos e parasita do gametófito feminino. Os carpósporos dão origem a tetrasporófitos diplóides que sofrem meiose produzindo tetrásporos haplóides (Figura 1).

Esse histórico de vida foi completado em laboratório para diversas espécies, como *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) (Ogata *et al.*, 1972), *G. caudata* (como *Gracilaria* sp., Oliveira & Plastino, 1984) *G. chilensis* (como *Gracilaria* sp.) (Plastino & Oliveira, 1988), *G. birdiae* (Costa, 2000), *G. domingensis* (Guimarães *et al.*, 1999) e

G. tenuistipitata (Barufi *et al.*, 2010). A proporção de 1:1 entre as plantas masculinas e femininas observada *in vitro* pode variar em populações naturais em decorrência das diferenças fisiológicas existentes entre os sexos (Kain & Destombe, 1995).

Figura 1. Histórico de vida de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*. Modificado de Oliveira & Plastino, 1994.

Estudos realizados em populações naturais de algas gracilarióides sugerem que variações na frequência de indivíduos diplóides e haplóides estão relacionadas a diferenças na fertilidade e sobrevivência de ambos os estádios (Richerd *et al.*, 1993). Tais diferenças foram observadas em *G. domingensis*, cultivadas em condições de laboratório, cujos tetrasporófitos tornaram-se férteis em um tempo menor que os gametófitos (Guimarães *et al.*, 1999). Em *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) a sobrevivência de plântulas tetrasporofíticas quando sob condições artificiais mostrou-se

superior à das plântulas gametofíticas (Destombe *et al.*, 1993). Na natureza, a predominância de indivíduos tetrasporofíticos, observada em diversas espécies do gênero *Gracilaria*, sugere uma maior aptidão da fase diplóide (Destombe *et al.*, 1989). Entretanto, fatores ambientais como sazonalidade, temperatura e variações nos regimes das chuvas e ventos podem afetar desde a adesão dos esporos e sobrevivência das plântulas, até a sua reprodução (Kain & Destombe, 1995).

Alterações sazonais na proporção de plantas férteis, previamente observadas para espécies de *Gracilaria*, demonstram uma correlação entre fertilidade e a ocorrência de elevadas temperaturas (verão), principalmente em regiões não tropicais (Guillemin *et al.*, 2008). Nos trópicos, no entanto, a maioria das plantas encontra-se fértil ao longo de todo o ano (Kain & Destombe, 1995; Orduña-Rojas & Robledo, 2002).

A ocorrência de diferentes estruturas reprodutivas em um mesmo talo, como a presença de estruturas masculinas e femininas, e a germinação de tetrásporos *in situ*, originando pequenos talos gametofíticos, que se desenvolvem como epífitas dos tetrasporófitos são comuns em diversas espécies de *Gracilaria* (Kain & Destombe, 1995). Essas estruturas foram previamente observadas na natureza para *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) (Destombe *et al.*, 1989), e em laboratório para *G. birdiae* (Costa & Plastino, 2001), *G. caudata* (como *Gracilaria* sp., Oliveira & Plastino, 1984) e *G. domingensis* (Guimarães *et al.*, 1999).

Variantes pigmentares já foram relatadas na literatura para várias espécies de *Gracilaria* que ocorrem na costa brasileira: *G. domingensis* (Plastino *et al.*, 1999), *G. birdiae* (Costa & Plastino, 2001; Plastino *et al.*, 2003) e *G. cornea* (Ferreira *et al.*, 2006). Esses variantes com diferentes composições pigmentares podem apresentar características fisiológicas distintas (Ursi *et al.*, 2003, 2013; Costa & Plastino, 2011) o que resulta em um aumento nos espectros de aclimatação possíveis para a espécie, otimizando o processo fotossintetizante e possibilitando uma maior distribuição espacial (Guimarães, 2000).

Gracilaria birdiae Plastino & E. C. Oliveira e *G. caudata* J. Agardh são algas típicas de regiões entremarés com ampla distribuição na costa brasileira, cujas populações de diferentes latitudes estão expostas a distintas irradiâncias e temperaturas. *G. birdiae* ocorre desde a costa do Estado do Ceará, até a costa do Estado do Espírito Santo (Plastino & Oliveira, 2002), enquanto que *G. caudata* apresenta uma distribuição mais ampla, ocorrendo desde o Caribe, até a costa do Estado de Santa Catarina (Plastino & Oliveira, 1997). O amplo espectro de variáveis ambientais a que essas espécies estão

submetidas na natureza, bem como as diferentes posições que cada espécie ocupa no perfil vertical do substrato, podem influenciar o seus históricos de vida.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a frequência dos diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos, gametófitos masculinos e gametófitos femininos com cistocarpos) de populações de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* localizadas ao longo da costa brasileira. Essa abordagem permitiu testar os seguintes pressupostos: i, a predominância de indivíduos tetrasporofíticos em populações naturais, tanto de *G. birdiae* como de *G. caudata*; e ii, a ocorrência de uma maior proporção de tetrasporófitos em *G. caudata* para as populações da região Nordeste, quando comparadas às populações da região Sudeste. Presume-se que a fase tetrasporofítica seja mais resistente e, portanto, com mais condições de sobreviver em ambientes adversos (região entre-marés). Como na região Sudeste as condições de irradiâncias são mais amenas, a sobrevivência de gametófitos poderia ser favorecida.

4. Materiais e Métodos

4.1. Material biológico

Foram avaliadas distintas populações naturais de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* localizadas nos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Pernambuco (PE) e Bahia (BA). Além dessas, foram avaliadas populações naturais de *G. caudata* dos Estados da Paraíba (PB), Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP), como apresentado no item 8 do capítulo 1 (Figura 2).

Figura 2. Mapa da costa brasileira indicando os pontos de coleta de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*. Os pontos foram plotados de acordo com as coordenadas de GPS. Seguem as coordenadas e as datas de coletas: **A.** *G. birdiae*: Praia da Pedra Rachada (03°23'87.0"S 39°00'67.0"W), 08/02/2012, Município de Paracurú, Ceará (CE). **B.** *G. caudata*: Praia do Naufrágio (03°23'50.5"S 39°00'38.8"W), 09/02/2012, Município de Paracurú, Ceará (CE). **C.** *G. birdiae* e *G. caudata*: Praia do Rio do Fogo (05°15'41.0"S 35°23'11.0"W), 27 e 28/09/2011, Município do Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN). **D.** *G. caudata*: Praia de Carapibús (07°17'62.9"S 34°48'08.5"W), 21/07/2012, Município de Conde, Paraíba (PB). **E.** *G. caudata*: Praia de Boa Viagem (08°07'58.9"S 34°53'57.6"W), 14/03/2013, Município de Recife, Pernambuco (PE). **F.** *G. birdiae*: Praia de Muro Alto (08°26'13.1"S 34°58'47.1"W), 12/03/2013, Município de Ipojuca, Pernambuco (PE). **G.** *G. birdiae* e *G. caudata*: Praia do Emissário (12°44'28.0"S 38°09'01.0"W), 14 e 15/10/2012, Município de Arembépe, Bahia (BA). **H.** *G. caudata*: Praia de Parati (20°48'31.0"S 40°36'39.0"W), 05/05/2012, Município de Anchieta, Espírito Santo (ES). **I.** *G. caudata*: Praia das Cigarras (23°55'01.0"S 46°19'16.8"W), 03/10/2013, Município de São Sebastião, São Paulo (SP). Mapa elaborado no site Online Map Creations, www.aquarius.geomar.de/omc/.

4.2. Amostragem populacional

As amostras foram obtidas utilizando-se três transecções de 20 metros de comprimento, posicionadas na região entre-marés, de forma perpendicular à linha da costa para cada uma das espécies analisadas, após localização das populações. Entretanto, em alguns casos a extensão do banco não permitia esse posicionamento. Na população de *G. caudata* amostrada na praia de Parati, Anchieta (ES), as transecções acompanharam o eixo de maior extensão do banco, que se estendia paralelamente à linha de costa. Na população de *G. caudata* da Praia das Cigarras, São Paulo (SP), não foi possível a extensão de transecções, e a coleta foi realizada ao acaso.

Trinta e cinco indivíduos foram amostrados por transecção, totalizando 105 indivíduos por população. Os pontos de coleta em cada uma das transecções foram determinados a partir de tabelas de números aleatórios, preparadas em sorteios realizados pelo programa Excell (2010). Apenas um ramo foi removido por indivíduo amostrado, visando à identificação do estágio reprodutivo. Os ramos selecionados foram armazenados em embalagens individuais confeccionadas de tela tipo “sombrite” para a análise posterior e identificação dos diferentes estádios reprodutivos (gametófitos femininos com cistocarpos, gametófitos masculinos e tetrasporófitos). Os gametófitos femininos foram identificados a olho nu pela presença de cistocarpos no talo. Os gametófitos masculinos e os tetrasporófitos foram identificados por meio de microscópio estereoscópico (American Optical FORTY) logo após a coleta. Talos sem tetrasporângios ou criptas espermatângiais foram considerados inférteis. Representantes das diferentes populações foram depositados no herbário SPF do IBUSP.

4.3. Análises estatísticas

O teste do χ^2 de Pearson foi utilizado para comparar as proporções encontradas dos diferentes estádios (gametófitos x tetrasporófitos) entre as espécies estudadas. Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do módulo “Pearson & M-L Chi-square” do programa “Statística” (versão 12.0).

5. Resultados

5.1. *Gracilaria birdiae*

5.1.1. Município de Paracurú - CE (Praia da Pedra Rachada)

Foram amostrados 105 indivíduos, tanto de coloração vermelha (total: 78) como de coloração esverdeada (total: 27) em três transecções. Foram coletados indivíduos de

coloração esverdeada apenas entre gametófitos femininos com cistocarpos e tetrasporófitos. Foram reconhecidos: 18 gametófitos femininos com cistocarpos (17,14%), sendo 9 de coloração esverdeada; três gametófitos masculinos (2,85%); e 84 tetrasporófitos (80%), sendo 16 de coloração esverdeada. Não foram encontrados indivíduos inférteis. No total, foram amostrados 74,3% de indivíduos de coloração vermelha e 25,7% de indivíduos de coloração esverdeada (Figura 3 e Tabela 1).

Figura 3. *G. birdiae*. **A.** Aspecto geral das plantas do banco de *G. birdiae* da praia da Pedra Rachada, Município de Paracurú (CE) em 08/02/2012, mostrando os indivíduos de coloração vermelha e esverdeada; **B.** Detalhe dos indivíduos de coloração vermelha e esverdeada. Fotos: E. M. Plastino e L. M. Ayres-Ostrock, 2012.

5.1.2. Município de Rio do Fogo - RN (Praia do Rio do Fogo)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos 8 gametófitos femininos com cistocarpos (7,62%), 14 gametófitos masculinos (13,34%), 80 tetrasporófitos (75,24%) e 3 indivíduos inférteis (3,81%) (Figura 4 e Tabela 1).

Figura 4. *G. birdiae*. **A.** Aspecto panorâmico do banco de *G. birdiae* da praia de Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo (RN) em 27/09/2011; **B.** Detalhe do banco; **C.** Aspecto geral das plantas do banco; **D.** Ramo de gametófito feminino com cistocarpos; **E.** Detalhe da superfície de um ramo tetrasporofítico vista em microscópio estereoscópico (American Optical FORTY). Fotos: M. A. Carneiro, 2011.

5.1.3. Município de Ipojuca - PE (Praia de Muro Alto)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos quatro gametófitos femininos com cistocarpos (3,81%), 9 gametófitos masculinos (8,57%) e 92 tetrasporófitos (87,62%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 5 e Tabela 1).

Figura 5. *G. birdiae*. A. Aspecto panorâmico do banco de *G. birdiae* da Praia de Muro Alto, Município de Ipojuca (PE) em 12/03/2013; B - C. Detalhes do banco; D. Aspecto geral das plantas. Fotos: E. M. Plastino, 2013.

5.1.4. Município de Arembepe - BA (Praia do Emissário)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos 30 gametófitos femininos com cistocarpos (28,58%), 23 gametófitos masculinos (21,90%) e 52 tetrasporófitos (49,52%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 6 e Tabela 1).

Figura 6. *G. birdiae*. **A.** Aspecto panorâmico do banco de *G. birdiae* da Praia do Emissário, Município de Arembepe (BA) em 14/10/12 (notar manchas avermelhadas); **B.** Detalhe do banco; **C - D.** Aspecto geral das plantas. Fotos: E. M. Plastino, 2012.

5.2. *Gracilaria caudata*

5.2.1. Município de Paracurú - CE (Praia do Naufrágio)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Foram observados indivíduos de coloração esverdeada, no entanto, eles não foram contabilizados nas transecções. Foram reconhecidos 7 gametófitos femininos com cistocarpos (6,67%), 3 gametófitos masculinos (2,86%) e 95 tetrasporófitos (90,47%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 7 e Tabela 1).

Figura 7. *G. caudata*. **A - B.** Aspectos panorâmicos do banco de *G. caudata* da praia do Naufrágio, Município de Paracurú (CE) em 09/02/2012; **C - D.** Detalhes do banco. Fotos: E. M. Plastino, L. M. Ayres-Ostrock e T. N. Masih 2012.

5.2.2. Município de Rio do Fogo - RN (Praia do Rio do Fogo)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Foram observados indivíduos de coloração esverdeada, no entanto eles não foram contabilizados nas transecções. Foram reconhecidos cinco gametófitos femininos com cistocarpos (4,76%), 7 gametófitos masculinos (6,67%), 92 tetrasporófitos (87,62%) e um indivíduo infértil (0,95%) (Figura 8 e Tabela 1).

Figura 8. *G. caudata*. **A.** Aspecto panorâmico do banco de *G. caudata* da praia de Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo (RN) em 28/09/2011; **B.** Detalhes do banco. Fotos: M. A. Carneiro, 2011.

5.2.3. Município de Recife - PE (Praia de Boa Viagem)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos cinco gametófitos femininos com cistocarpos (4,76%), cinco gametófitos masculinos (4,76%), 94 tetrasporófitos (89,53%) e um indivíduo infértil (0,95%) (Tabela 1).

5.2.4. Município de Conde - PB (Praia de Carapibús)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos dois gametófitos femininos com cistocarpos (1,91%), quatro gametófitos masculinos (3,81%) e 99 tetrasporófitos (94,28%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 9 e Tabela 1).

Figura 9. *G. caudata*. **A.** Aspecto panorâmico do banco de *G. caudata* da Praia de Carapibús, Município de Conde (PB) em 20/07/2012; **B.** Aspecto geral das plantas. Fotos: E. M. Plastino, 2012.

5.2.5. Município de Arembepe - BA (Praia do Emissário)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos cinco gametófitos femininos com cistocarpos (4,76%), 9 gametófitos masculinos (8,57%) e 91 tetrasporófitos (86,67%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 10 e Tabela 1).

Figura 10. *G. caudata*. **A - B.** Aspectos panorâmicos do banco de *G. caudata* da Praia do Emissário, Município de Arembepe (BA) em 15/10/12; **C.** Detalhe do banco; **D.** Aspecto geral das plantas. Fotos: E. M. Plastino, 2012.

5.2.6. Município de Anchieta – ES (Praia de Parati)

Todos os indivíduos amostrados nas três transecções (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos 18 gametófitos femininos com cistocarpos (21,91%), 39 gametófitos masculinos (37,14%) e 43 tetrasporófitos (40,95%). Não foram encontrados indivíduos inférteis nessa população (Figura 11 e Tabela 1).

Figura 11. *G. caudata*. **A.** Aspecto panorâmico do banco de *G. caudata* da praia da Parati (ES); **B.** Detalhe do banco parcialmente coberto por areia; **C.** Aspecto geral das plantas; **D.** Detalhe das plantas. Fotos: E. M. Plastino, 2012.

5.2.7. Município de São Sebastião - SP (Praia das Cigarras)

Todos os indivíduos amostrados (total: 105) apresentavam talos de coloração vermelha (selvagem). Não foram encontrados variantes de cor. Foram reconhecidos 21 gametófitos femininos com cistocarpos (20%), 24 gametófitos masculinos (22,86%), 51 tetrasporófitos (48,57%) e 9 indivíduos inférteis (8,57%) (Tabela 1).

5.3. *Gracilaria birdiae* X *G. caudata*

Foram realizadas análises comparativas das frequências dos estádios reprodutivos em populações de *G. birdiae* e *G. caudata* amostradas em um mesmo período e dentro de um mesmo Estado: RN, CE, BA e PE (Figura 12).

Figura 12. Frequências dos diferentes estádios reprodutivos (gametófitos femininos com cistocarpos, gametófitos masculinos, e tetrasporófitos) e de indivíduos inférteis de *Gracilaria birdiae* (A) e *G. caudata* (B) encontrados nas diferentes populações amostradas em diferentes ocasiões: Praia do Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN) (27 e 28/09/2011); Praia da Pedra Rachada (08/02/2012) e Praia do Naufrágio (09/02/2012), Município de Paracurú, Ceará (CE); Praia do Emissário, Município de Arembépe, Bahia (BA) (14 e 15/10/12), Praia de Muro Alto (12/03/2013) e Praia da Boa Viagem (14/03/2013), Município de Ipojuca, Pernambuco (PE); Praia de Parati, Município de Anchieta, Espírito Santo (ES) (05/05/2012) e Praia das Cigarras, Município de São Sebastião, São Paulo (SP) (03/10/2013).

5.3.1. Estado do Ceará – CE

Não foram observadas diferenças entre as espécies, em relação às proporções dos diferentes estádios reprodutivos ($\chi^2= 5,515$; $p= 0,063$).

5.3.2. Estado do Rio Grande do Norte – RN

Não foram observadas diferenças entre as espécies, em relação às proporções dos diferentes estádios reprodutivos ($\chi^2= 3,843$; $p= 0,146$).

5.3.3. Estado de Pernambuco– PE

Não foram observadas diferenças entre as espécies, em relação às proporções dos diferentes estádios reprodutivos ($\chi^2= 0,356$; $p= 0,837$).

5.3.4. Estado da Bahia – BA

A ocorrência de gametófitos femininos com cistocapos e gametófitos masculinos foi maior em *G. birdiae* do que em *G. caudata*, entretanto, a proporção de plantas tetrasporofíticas foi maior em *G. caudata* do que em *G. birdiae* ($\chi^2= 34,618$; $p= 0.000$).

5.4. Gametófitos epífitas

Gametófitos crescendo como epífitas de tetrasporófitos, possivelmente originários da germinação de tetrásporos *in situ*, foram observados em todas as populações avaliadas de *G. birdiae* e *G. caudata*. Entretanto, eles foram predominantes nas populações de *G. caudata*, principalmente nas populações da região Nordeste.

6. Discussão

Os tetrasporófitos de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* foram encontrados em maior número em todas as populações amostradas. A predominância de indivíduos tetrasporofíticos em populações naturais já havia sido relatada para a população de *G. birdiae* do Município de Rio do Fogo (RN) (Carneiro *et al.*, 2011), também avaliada no atual estudo. Os autores avaliaram a frequência dos estádios reprodutivos mensalmente, ao longo de um ano, e tetrasporófitos foram mais frequentes em todas as amostragens realizadas.

Já em *G. caudata*, um maior número de tetrasporófitos foi previamente observado no Município de Ubatuba (SP), no entanto, populações dessa região não foram avaliadas no atual estudo (como *G. verrucosa*, Plastino, 1985). Outras espécies

do gênero apresentaram também uma maior proporção de plantas tetrasporofíticas em relação aos demais estádios reprodutivos: *G. chilensis* (Guillemin *et al.*, 2008), *G. mammillaris* e *G. cervicornis* (Plastino, 1985), *G. vermiculophylla* (Terada *et al.*, 2010), *G. gracilis* (Martín *et al.*, 2011) e *G. cornea* (Orduña-Rojas *et al.*, 2002). Uma maior quantidade de tetrasporófitos foi também observada para outras algas vermelhas: *Gelidium canariense*, *G. arbuscula*, *G. pusillum* e *Pterocladia capillacea* (Prathec *et al.*, 2009; Polifrone *et al.*, 2012). Esses resultados corroboram a hipótese de maior viabilidade da fase diplóide tetrasporofítica, decorrente da maior taxa de sobrevivência dos carpósporos e maior tolerância a variações ambientais, quando comparada à fase gametofítica (Destombe *et al.*, 1989; Hughes & Otto, 1999; Engel *et al.*, 2004). Além disso, estudos anteriores em *G. chilensis* (Guillemin *et al.*, 2008) e *G. gracilis* (Martín *et al.*, 2011) sugerem que a predominância da fase tetrasporofítica está relacionada a sua maior capacidade de fragmentação e possível recolonização do substrato. A adesão de fragmentos ao substrato foi observada em condições de laboratório apenas para *G. caudata* (Plastino & Oliveira, 1997) e não para *G. birdiae*; entretanto, não existem evidências de que esse fenômeno ocorra na natureza para ambas espécies.

Em *G. caudata*, foram observadas variações na proporção dos diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos x gametófitos), quando comparamos as populações das regiões Nordeste e Sudeste. As populações de *G. caudata* dos Estados do Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP) (Sudeste) apresentaram uma maior proporção de gametófitos, quando comparadas às populações dos Estados do Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Bahia (BA) (Nordeste). Esses resultados poderiam ser parcialmente explicados pelas diferenças nas taxas de dispersão dos esporos e sobrevivência das plântulas dos diferentes estádios reprodutivos, como já referido para outras espécies (Kain & Destombe, 1995). Estudos anteriores observaram que em *G. pacifica*, tetrásporos apresentavam taxas de sobrevivências superiores durante o inverno, quando em condições adversas (Garza-Sánchez *et al.*, 2000). Em *G. chilensis*, plântulas gametofíticas apresentaram uma maior tolerância a baixas salinidades e elevadas irradiâncias, quando comparadas às tetrasporofíticas (Guillemin *et al.*, 2013). Os carpósporos de *G. verrucosa*, *G. tenuifrons* e *G. caudata* (como *Gracilaria* sp.), em condições de laboratório, apresentaram diferentes graus de tolerância a variações de salinidade, e os tetrásporos de *G. verrucosa* mostraram-se mais sensíveis a variações de temperatura e salinidade (Yokoya & Oliveira, 1993). Indivíduos de *G. chilensis*, *G. cornea*, *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) e *G. caudata* (como *G. aff*

verrucosa) apresentaram tolerância a uma ampla variação de temperatura (18-30 ° C) em condições de laboratório (Yokoya & Oliveira, 1992a). Indivíduos de *G. caudata* (como *G. aff. verrucosa*) mostraram-se tolerantes também a uma grande variação de salinidades (Yokoya & Oliveira, 1992b).

As populações de *G. caudata* da região Sudeste (ES e SP) estão sujeitas a temperaturas e irradiâncias inferiores, se comparadas às populações do Nordeste, e essas alterações ambientais poderiam influenciar a sobrevivência dos diferentes estádios reprodutivos ainda na fase de esporos e plântulas, resultando em diferenças nas proporções dos estádios entre plantas do nordeste e sudeste.

Gametófitos epífitas de tetrasporófitos originários da germinação de tetrásporos *in situ* foram observados em ambas espécies estudadas, entretanto, eles foram predominantes em *G. caudata*, principalmente nas populações da região Nordeste (CE, RN, PB, PE e BA). Esses gametófitos são geralmente menores e se tornam férteis precocemente, resultando em um encurtamento do histórico de vida (Plastino, 1985; Destombe *et al.*, 1989). Em *G. birdiae*, esta estratégia não foi observada em condições de laboratório, uma vez que, embora tenha ocorrido germinação *in situ* de tetrásporos, apenas os gametófitos destacados do talo tetrasporofítico diferenciaram estruturas reprodutivas (Costa, 2000). A ocorrência de germinação de tetrásporos *in situ* foi também verificada para *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) (Destombe *et al.*, 1989) e *G. dominguensis* (Guimarães *et al.*, 1999).

Gametófitos femininos com cistocarpos (♀) e gametófitos masculinos (♂) mostraram uma variação em frequência nas diferentes populações de ambas espécies avaliadas. Em *G. birdiae*, essa variação foi de 3,81% (♀ PE) a 28,58% (♀ BA), e 2,80% (♂ CE) a 13,34% (♂ RN). Já em *G. caudata*, essa variação foi de 1,91% (♀ PB) a 21,91% (♀ ES), e 2,86% (♂ CE) a 37,14% (♂ ES). Essas variações na proporção desses estádios foram previamente relatadas para diversas espécies de *Gracilaria* e atribuídas a variações ambientais, que incluem, entre outras, sazonalidade, precipitação e concentração de nutrientes (Kain & Destombe, 1995; Espinoza-Avalos, 2005; Muñoz *et al.*, 2012). Carneiro *et al.* (2011) em análises populacionais mensais por um período de 1 ano observaram em *G. birdiae* (Praia de Rio do Fogo, RN) um maior número de plantas tetrasporofíticas, seguido de gametófitos femininos, gametófitos masculinos e plantas inférteis; contudo, apenas os gametófitos masculinos e as plantas inférteis apresentaram variações em frequência ao longo do ano. Nesse caso, verificou-se que a ocorrência de plantas inférteis estava sincronizada quinzenalmente após a suposta

liberação dos esporos, indicando a presença de plântulas de outros estádios reprodutivos.

No atual estudo um maior número de gametófitos femininos com cistocarpos foi observado para as populações de *G. birdiae* e *G. caudata* do CE e na população de *G. birdiae* da BA, cujas amostragens foram realizadas durante o verão e primavera, respectivamente. Gametófitos femininos com cistocarpos de *G. gracilis*, provenientes da Patagônia Argentina, foram encontrados em maior número durante o verão, quando comparados aos gametófitos masculinos (Martín *et al.*, 2011). Entretanto, em *G. cliftonii*, do oeste da Austrália, uma maior quantidade de gametófitos femininos com cistocarpos foi observada no outono, quando comparados aos gametófitos masculinos (Muñoz *et al.*, 2012). A maior frequência de gametófitos masculinos observada em *G. cliftonii* durante o inverno foi relacionada a variações no regime de chuvas, salinidade e duração do dia (Muñoz *et al.*, 2012). Um elevado número de gametófitos masculinos foi observado no atual estudo em *G. caudata* para as populações de PB, ES, RN e PE; no entanto, apenas as populações de PB e ES foram amostradas durante inverno. As demais amostragens foram pontuais, realizadas no início da primavera (RN) e fim do verão (PE).

A ausência de plantas inférteis em ambas espécies na maioria das populações amostradas, ou a baixa frequência, 4% (RN) em *G. birdiae*, e 0,95% (RN e PE) e 8,57% (SP) para *G. caudata*, indicam a elevada fertilidade das espécies. Resultados semelhantes já haviam sido relatados em *G. birdiae* (Carneiro *et al.*, 2011). Esses autores verificaram que plantas inférteis ocorriam a cada dois meses, após a suposta liberação dos esporos, indicando que se tratavam de plantas juvenis de outros estádios reprodutivos. A presença de indivíduos inférteis em decorrência de variações entre os períodos de maturação dos diferentes estádios reprodutivos já havia sido sugerida para *G. salicornia* (Terada *et al.*, 2010). Possivelmente, o mesmo pode ser assumido para o atual estudo.

No presente trabalho, não foi possível a distinção de variantes de cor nas populações de *G. birdiae* amostradas de Arembépe (BA) e Ipojuca (PE), diferentemente da população do Estado do Ceará (CE), em que plantas de coloração esverdeada foram amostradas. Alguns indivíduos de coloração esverdeada foram observados na população de *G. birdiae* do Rio do Fogo (RN), no entanto, eles não foram amostrados. Em *G. caudata* não foram observadas variantes de cor em nenhuma das transecções realizadas

nas diferentes populações. Entretanto, alguns indivíduos de coloração esverdeada foram observados nas populações de *G. caudata* do RN e CE.

Deve-se salientar que a população do CE de *G. birdiae* na qual foram amostrados variantes de cor representa o limite norte da distribuição da espécie no país, estando sujeita aos maiores índices de irradiância, quando comparada às demais populações amostradas. Variantes pigmentares de *G. birdiae* já haviam sido coletadas nesta mesma praia do Estado do Ceará, ou obtidas espontaneamente em laboratório a partir de plantas dessa localidade (Costa & Plastino, 2001, 2011). Outra variante de cor de *G. birdiae*, verde-clara, foi encontrada no limite sul da distribuição da espécie e apenas na forma de gametófitos, como epífitas de plantas tetrasporofíticas vermelhas (Plastino *et al.*, 2004).

Uma comparação nas proporções dos estádios reprodutivos entre *G. birdiae* e *G. caudata*, realizada para as populações localizadas dentro de um mesmo Estado (RN, CE, PE e BA) e amostradas numa mesma época, não mostrou diferenças para as populações do RN ($\chi^2= 3,843$; $p= 0,146$), CE ($\chi^2= 5,515$; $p= 0,063$) e PE ($\chi^2= 0,356$; $p= 0,837$), sugerindo que, mesmo ocupando diferentes pontos do substrato e submetidas a pressões ambientais distintas, a frequência nas fases reprodutivas foram semelhantes.

A nossa hipótese sobre a predominância de indivíduos tetrasporofíticos foi confirmada em todas as populações avaliadas para ambas espécies. Foi também confirmada a hipótese sobre a existência de uma maior proporção de plantas tetrasporofíticas para as populações de *G. caudata* da região Nordeste, quando comparadas às populações da região Sudeste da costa brasileira. Os resultados obtidos no atual estudo sugerem que a avaliação da fenologia de uma espécie deva ser relacionada à análise de múltiplos fatores ambientais que, em conjunto, podem influenciar a sua reprodução e o seu histórico de vida.

Tabela 1. Estádios reprodutivos de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* encontrados nas diferentes populações amostradas: gametófitos femininos com cistocarpos (GF), gametófitos masculinos (GM), tetrasporófitos (T) e indivíduos inférteis (I). As diferentes transecções estão identificadas como T₁, T₂ e T₃. Total de indivíduos (TI). A coloração verde no texto refere-se à variante de cor esverdeada (EV).

População / data da amostragem	TI	<i>G. birdiae</i>												<i>G. caudata</i>											
		GF			GM			T			I			GF			GM			T			I		
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
Praia de Rio do Fogo (RN) 27/09/2011	105	6	1	1	8	4	2	19	29	32	2	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Praia de Rio do Fogo (RN) 27/09/2011		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	0	5	2	0	27	31	34	0	0	1
Praia da Pedra Rachada (CE) 08/02/2012	78 (VM)	4	3	2	0	2	1	29	18	19	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27 (EV)	0	7	2	0	0	0	0	7	11	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Praia do Naufrágio (CE) 09/02/2012	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	4	2	1	0	31	33	31	0	0	0
Praia do Emissário (BA) 14/10/2012	105	10	10	10	6	8	9	17	19	16	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Praia do Emissário (BA) 15/10/2012	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	0	8	1	0	23	33	35	0	0	0
Praia de Muro Alto (PE) 12/03/2013	105	2	1	1	3	3	3	30	31	31	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Praia de Boa Viagem (PE) 14/03/2013	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	3	2	0	29	32	33	1	0	0
Praia de Carapibús (PB) 20/07/2012	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1	2	1	1	33	33	33	0	0	0
Praia de Parati (ES) 05/05/2012	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	6	2	11	10	10	14	19	23	0	0	0
Praia das Cigarras (SP) 03/10/2013	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21			24			51			9		

Capítulo 3 – *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): respostas fotossintetizantes em populações da costa brasileira.

1. Abstract

The photosynthetic parameters of selected populations of *G. birdiae* and *G. caudata* were evaluated from data collected in nature, with the use of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence technique, taking into account their distribution along the Brazilian coast and reproductive stages. The experimental approach of this study included standardized measures, which have been suggested when linearity is desired between the values obtained for the dissolved oxygen and the chlorophyll *a* fluorescence techniques, especially in low light intensities. This approach, based on previous knowledge regarding physiological differences between individuals and their populations for both species, allowed to test the following assumptions: i, the existence of differences in the photosynthesis parameters among populations of *G. caudata* from the North- and South-east regions of the Brazilian coast, subject to different environment conditions such as irradiance and temperature, among others; and ii, the existence of differences in the photosynthetic parameters among reproductive stages, within populations for both species. Comparing the populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, sampled in the same region, we observed that, regardless of population, *G. caudata* showed high levels of I_k and lower αETR , suggesting that *G. birdiae* presents greater sensitivity the high levels of irradiance, compared to *G. caudata*. These responses are consistent with the position they occupy relative to the shore: *G. caudata*, always in a higher position compared to *G. birdiae*. The analysis of parameters such as αETR allowed the conclusion that tetrasporophytes and female gametophytes with cystocarps of *G. birdiae* and *G. caudata* from the Ceará population are adapted to high irradiance and have mechanisms to prevent damage to the photosynthetic apparatus. In *G. caudata*, high αETR values were also found for the tetrasporophytes of the RN and SP populations. The RN population of *G. birdiae* presented a decrease in the photosynthetic rate at high light intensities (up to $500 \mu\text{mol.fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) attributed to its lower position on the shore, when compared to the populations of BA and PE, which could also indicate a greater sensitivity to irradiance. The ETR_{max} values found for *G. birdiae* (CE, BA, and PE) and *G. caudata* (RN, CE, BA, PE, ES, and SP), regardless of reproductive stage were similar to those observed for other species of *Gracilaria*. No differences were found between the ETR_{max} values of the populations of Rio Grande do Norte and Ceará States, for both species, which could be explained by their geographical proximity resulting in similar physiological responses. The highest values of ETR_{max} , $\Delta F/F_m'$ and I_k found for the PE populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, regardless of reproductive stage, may also indicate the role of other factors such as the availability of nutrients. An intra-populacional analysis showed lower values for maximum electron transport rate (ETR_{max}), photosynthetic efficiency (αETR) and light saturation (I_k), of female gametophyte with cystocarps of *G. birdiae* from CE, and *G. caudata* from CE, BA, and SP. These results suggest a greater commitment of photosynthetic resources in these individuals, compared to tetrasporophytes and male gametophytes, possibly due to the presence of the carposporophytic phase, dependent on the female gametophyte. Both

greenish tetrasporophytes and female gametophytes with cystocarps of *G. birdiae* from the CE population presented higher ETR_{max} , compared to wild-type ones (red). These results suggest a greater ability of greenish individuals to use high irradiances for maintaining their metabolism. This feature should be an adaptive advantage for *G. birdiae*, since the presence of individuals with different photosynthetic capacity may increase the possible acclimation spectra of the species. These results corroborate the hypothesis of variation in the photosynthetic parameters between the North and South-east populations of *G. caudata*; besides the existence of differences among the reproductive stages for both *G. birdiae* and *G. caudata*.

2. Resumo

Os parâmetros da fotossíntese de populações selecionadas de *G. birdiae* e *G. caudata* foram avaliados a partir de dados coletados na natureza, com o uso da técnica de fluorescência *in vivo* da clorofila *a*, levando-se em consideração a distribuição ao longo da costa brasileira e os estádios reprodutivos. A abordagem experimental contemplou medidas padronizadas, o que tem sido sugerido quando se pretende uma linearidade entre os valores obtidos para as técnicas de oxigênio dissolvido e a fluorescência da clorofila *a*, principalmente em baixas irradiancias. Essa abordagem, baseada no conhecimento prévio sobre diferenças fisiológicas entre populações de ambas espécies, permitiu testar os seguintes pressupostos: i, a existência de uma variação para os parâmetros da fotossíntese entre as populações de *G. caudata* das regiões Nordeste e Sudeste da costa brasileira, sujeitas, entre outros fatores, a diferentes condições de irradiância e temperatura; e ii, a existência de uma variação para os parâmetros da fotossíntese entre os diferentes estádios reprodutivos de uma mesma população para ambas espécies. Nos locais onde ambas espécies ocorriam, observou-se que *G. caudata* apresentou valores elevados de I_k e inferiores de αETR quando comparada a *G. birdiae*, sugerindo que essa espécie apresente maior sensibilidade a altos níveis de irradiância. Essas respostas estão de acordo com a posição que populações dessas espécies ocupam em relação ao nível de maré: *G. caudata*, sempre numa posição superior em relação à *G. birdiae*. A análise de alguns parâmetros como αETR permitiram observar que tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* e *G. caudata* do CE estão adaptados a irradiancias elevadas e apresentam mecanismos capazes de evitar danos ao aparato fotossintetizante. Em *G. caudata*, valores elevados de αETR foram também observados para os tetrasporófitos do RN e SP. A população de *G. birdiae* do RN apresentou uma diminuição das taxas fotossintetizantes em elevadas irradiancias (até $500 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) atribuída a sua posição inferior no substrato, quando comparada às populações da BA e PE, o que poderia indicar uma maior sensibilidade à irradiância em relação às demais. Os valores obtidos para ETR_{max} em *G. birdiae* (CE, BA e PE) e *G. caudata* (RN, CE, BA, PE, ES e SP), independentemente do estágio reprodutivo, foram semelhantes aos observados para outras espécies de *Gracilaria*. Não foram observadas diferenças nos valores de ETR_{max} entre as populações do RN e CE para ambas espécies estudadas, o que pode ser justificado pela proximidade geográfica. Os maiores valores de ETR_{max} , $\Delta F/F_m'$ e I_k observados para populações de PE, tanto de *G. birdiae* como de *G. caudata*, independentemente do estágio reprodutivo, podem também indicar a atuação de outros fatores, como a disponibilidade de nutrientes. Nas análises intrapopulacionais, observou-se menores valores de ETR_{max} , αETR e I_k , em gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* do CE, e de *G. caudata* do CE, BA e SP. Esses dados sugerem um maior comprometimento dos recursos destinados à fotossíntese nesses indivíduos, quando comparados aos tetrasporófitos e gametófitos

masculinos, possivelmente devido à presença da fase carposporofítica, dependente do gametófito feminino. Tetrasporófitos de *G. birdiae* de coloração esverdeada da população do CE, apresentaram maiores valores de ETR_{max} , quando comparados aos de coloração vermelha (selvagem). Esses resultados sugerem uma maior habilidade de indivíduos de coloração esverdeada em utilizar elevadas irradiâncias para a manutenção de seu metabolismo, quando comparados à linhagem selvagem. Essa característica deve representar uma vantagem adaptativa para *G. birdiae*, uma vez que a ocorrência de espécimes com capacidades fotossintetizantes distintas pode aumentar os espectros de aclimação possíveis da espécie. Esses resultados corroboraram a hipótese de diferenças nos parâmetros da fotossíntese de *G. caudata* entre as populações das regiões Nordeste e Sudeste; além da existência de uma variação para os parâmetros da fotossíntese entre os distintos estádios reprodutivos de uma mesma população, tanto para *G. birdiae* como para *G. caudata*.

3. Introdução

A fotossíntese é o único processo biológico capaz de aproveitar a energia proveniente do sol (Taiz & Zeiger, 2006). A faixa do espectro solar utilizada pelas plantas para a fotossíntese, conhecida como “PAR” (Photosynthetically Active Radiation), correspondente ao intervalo de 400nm a 700nm (região visível do espectro) (Hollisy, 2001).

A energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes pode ser direcionada de três maneiras: i, utilizada em processos fotoquímicos (fotossíntese), ou seja, na transferência da energia dos fótons de luz para o transporte de elétrons da fase “clara” da fotossíntese; ii, dissipada na forma de calor (via não fotoquímica); e iii, reemitida como fluorescência (Maxwell & Johnson, 2000). A fluorescência, emitida principalmente pelo fotossistema II (PSII), é a capacidade que os elétrons possuem de excitar-se ao receberem a energia trazida pela luz. Os centros de reação (PSII e fotossistema I - PSI) recebem a energia de excitação da clorofila *a* (Schreiber *et al.*, 1994), e as reações fotoquímicas criam um fluxo de elétrons na forma de NADPH, relacionada à formação de ATP, fixação de CO₂ pela Rubisco e ainda à oxidação da água, que resulta na formação de O₂ (Taiz & Zeiger, 2006).

Em condições de elevadas irradiâncias, os organismos fotossintetizantes utilizam a fotoinibição como mecanismo de proteção (Krause & Weis, 1991; Osmond, 1994). A fotoinibição dinâmica ocasiona o aumento da dissipação de energia não fotoquímica, eliminando de forma segura o excesso de energia absorvida como radiação térmica ou fluorescência, e resultando em uma diminuição da capacidade fotossintetizante, assim como dos parâmetros relacionados à fotossíntese (Krause & Weis 1991; Long *et al.*, 1994; Halnet, 1996). A fotoinibição crônica está relacionada à taxa de dano à proteína

D1 (centro de reação do PSII) que excede a taxa de reparo, resultando na degradação dessa proteína e posterior perda da atividade fotossintetizante (Anderson, 1992; Long *et al.*, 1994).

Análises comparativas de características fisiológicas realizadas entre espécies ou dentro de uma mesma espécie, como em populações distintas, possibilitam o conhecimento da diversidade funcional das algas (Enriquez & Borowitzka, 2010). As Rhodophyta podem ocorrer em um limite variável de irradiância, sendo que muitas espécies crescem em níveis relativamente baixos de iluminação. A maioria apresenta características de “algas de sombra”, com baixos valores de saturação luminosa e fotossíntese máxima, e valores maiores para a eficiência fotossintetizante, quando comparadas a “algas de sol” (Gantt, 1990). As exceções são para aquelas da região entre-marés que sobrevivem a níveis de irradiância muito elevados, cujos valores podem atingem $2.500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nos tr\u00f3picos (Luning, 1990).

Existem alguns m\u00e9todos para avaliar a fotoss\u00edntese, como t\u00e9cnicas de oxig\u00eanio dissolvido, assimila\u00e7\u00e3o de carbono e fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a*. Dentre eles, destaca-se a fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a*, por ser um m\u00e9todo n\u00e3o invasivo e de r\u00e1pida resposta. Esse m\u00e9todo mostrou-se uma ferramenta poderosa na avalia\u00e7\u00e3o fisiol\u00f3gica de organismos fotossintetizantes considerando-se varia\u00e7\u00f5es sazonais, temporais e geogr\u00e1ficas (Schreiber *et al.*, 1994). Curvas r\u00e1pidas de luz (RLC) constru\u00eddas a partir de medidas de fluoresc\u00eancia s\u00e3o caracterizadas por uma sucess\u00e3o de pulsos luminosos crescentes produzidos por uma fonte externa de luz act\u00ednica e intercalados por pulsos de luz saturante (Maxwell & Johnson, 2000). Diversos par\u00e2metros podem ser obtidos e avaliados a partir dessa t\u00e9cnica, como o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo e/ou efetivo e a taxa de transporte de el\u00e9trons.

Nas macroalgas, o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo e/ou efetivo, calculado a partir da fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila *a*, \u00e9 frequentemente utilizado para avaliar poss\u00edveis efeitos de fotoinibi\u00e7\u00e3o e recupera\u00e7\u00e3o (Krause & Weis, 1991). O rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo (F_v/F_m) \u00e9 calculado a partir da varia\u00e7\u00e3o entre a fluoresc\u00eancia inicial (F_o), obtida quando todos os centros de rea\u00e7\u00e3o do PSII est\u00e3o ativos (abertos), e a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m), obtida ap\u00f3s um pulso de luz saturante, quando todos os centros de rea\u00e7\u00e3o do PSII est\u00e3o fechados. Esse rendimento \u00e9 obtido a partir da f\u00f3rmula: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$. Para o rendimento qu\u00e2ntico efetivo ($\Delta F/F_m'$), a varia\u00e7\u00e3o das fluoresc\u00eancias inicial (F_o) e m\u00e1xima (F_m) \u00e9 calculada ap\u00f3s uma pr\u00e9via exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 luz, no qual F_m' \u00e9 a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima da fotoss\u00edntese aclimatada \u00e0 luz, e F_t \u00e9 a fluoresc\u00eancia obtida nos diferentes

pulsos de irradiâncias. O rendimento quântico efetivo é obtido a partir da fórmula: $\Delta F/F_m = (F_m - F_t)/F_m$. Esse rendimento pode apresentar uma grande variação dependendo da espécie, população e/ou flutuação de luz no ambiente, como observado em *Macrocystis pyrifera*, em que uma redução nos valores obtidos para $\Delta F/F_m$ foi observada em elevadas irradiâncias (Cabello-Pasini *et al.*, 2000). A inibição de $\Delta F/F_m$ em decorrência da exposição à radiação UV-B foi observada para as algas pardas *Fucus distichus* (Halnet *et al.*, 1997), *Laminaria saccharina* (Halnet *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 2007), *L. digitata*, *Alaria esculenta* (Halnet *et al.*, 1997) e *Macrocystis pyrifera* (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2000). Entre as algas vermelhas, essa inibição foi observada para *Palmaria palmata* (Halnet *et al.*, 1997; Poppe *et al.*, 2002; 2003); entretanto, a fotoinibição observada em *Chondrus crispus* e na alga verde *Ulva lactuca* resultou principalmente de níveis elevados de irradiância PAR e não da radiação UV-B (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2000).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) é obtida pela fórmula: $ETR = \Delta F/F_m \cdot PAR \cdot Abst \cdot F_{II}$. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) corresponde aos pulsos luminosos crescentes produzidos por uma fonte externa de luz actínica. O índice de absortância (Abst) é obtido considerando a eficiência de absorção do conjunto de pigmentos específicos de cada espécie (Enriquez, 2005). F_{II} determina o quanto de energia luminosa é aproveitada pelo PII em relação ao PSI (Grzymiski *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 1997). Os valores de F_{II} são distintos para os diferentes grupos de algas: 0,15 para algas vermelhas, 0,5 para algas verdes e 0,8 para algas pardas (Grzymiski *et al.*, 1997). Variações observadas em ETR podem evidenciar a influência de fatores abióticos na resposta fotossintetizante, como o observado para *Fucus vesiculosus* em que ecótipos adaptados a diferentes salinidades apresentaram diferentes valores para ETR (Gylle *et al.*, 2013).

Parâmetros como fotossíntese máxima (ETR_{max}), eficiência fotossintetizante (αETR) e índice ou irradiância de saturação luminosa (I_k) são calculados a partir de valores obtidos na curva Fotossíntese x Irradiância, aplicados a modelos matemáticos específicos, variando conforme a ocorrência ou não de fotoinibição (Frenette *et al.*, 1993).

Nas macroalgas, a técnica de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* vem sendo principalmente empregada nos últimos anos para avaliar o efeito de fatores abióticos, como temperaturas extremas, radiação ultravioleta, salinidades e condições nutricionais. Além disso, os parâmetros relacionados à fotossíntese têm sido utilizados em avaliações

intraespecíficas, principalmente em diferentes populações de espécies que apresentam uma ampla distribuição geografia, como *Gracilaria chorda* que ocorre ao longo da costa do Japão (Terrada *et al.*, 2013). Em *G. vermiculophylla*, as diferenças fisiológicas observadas entre três populações amostradas no Japão e evidenciadas pelos diferentes parâmetros da fotossíntese sugerem a ocorrência de adaptações a condições ambientais específicas (Phooprong *et al.*, 2008).

Gracilaria birdiae Plastino & E. C. Oliveira e *G. caudata* J. Agardh são algas típicas de regiões entremarés com ampla distribuição na costa brasileira, cujas populações de diferentes latitudes estão expostas a distintas irradiâncias e temperaturas, entre outros fatores. *G. birdiae* ocorre desde a costa do Estado do Ceará, até a costa do Estado do Espírito Santo (Plastino & Oliveira, 2002), enquanto que *G. caudata* apresenta uma distribuição mais ampla, ocorrendo desde o Caribe, até a costa do Estado de Santa Catarina (Plastino & Oliveira, 1997). O amplo espectro de variáveis ambientais a que essas espécies estão submetidas na natureza, bem como as diferentes posições que cada espécie ocupa no substrato, podem influenciar suas características fotossintetizantes. As populações de *G. caudata* encontram-se em pontos superiores do substrato em relação ao nível de maré, quando comparadas a populações de *G. birdiae*. Portanto, *G. caudata* está sujeita a uma maior exposição a elevadas irradiâncias do que *G. birdiae*, que ocupa uma faixa inferior do substrato. Estudos anteriores verificaram a existência de diferenças entre populações provenientes das regiões Nordeste e Sudeste da costa brasileira, de *G. birdiae* e *G. caudata*, para parâmetros como, por exemplo, fotossíntese (Ursi *et al.*, 2003) e tolerância a UV-B (Araújo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014 *a e b*), entre outros.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros da fotossíntese de populações selecionadas de *G. birdiae* e *G. caudata*, a partir de dados coletados na natureza. Essa abordagem, baseada no conhecimento já obtido com relação às diferenças fisiológicas entre os indivíduos de suas populações para ambas as espécies, permitiu testar os seguintes pressupostos: i, a existência de uma variação para os parâmetros da fotossíntese entre as populações de *G. caudata* das regiões Nordeste e Sudeste da costa brasileira, sujeitas, entre outros fatores, a diferentes condições de irradiância e temperatura; e ii, a existência de uma variação para os parâmetros da fotossíntese entre os diferentes estádios reprodutivos dentro de uma mesma população para ambas as espécies. Valores inferiores para os parâmetros da fotossíntese são esperados para os gametófitos femininos com cistocarpos, devido à presença da fase

carposporofítica e o comprometimento dos recursos destinados à fotossíntese nesses indivíduos, quando comparados aos tetrasporófitos e gametófitos masculinos.

4. Materiais e métodos

4.1. Material biológico

Foram avaliadas distintas populações naturais de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* localizadas nos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Pernambuco (PE) e Bahia (BA), além de populações de *G. caudata* dos Estados do Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP), como apresentado na Tabela 1 e no item 8 do capítulo 1.

As amostras foram obtidas utilizando-se transecções de 20 metros de comprimento, posicionadas na região entre marés, durante a maré baixa. Apenas um ramo foi removido por indivíduo amostrado, visando à identificação dos estádios reprodutivos (gametófitos femininos, gametófitos masculinos e tetrasporófitos). Os gametófitos femininos foram identificados a olho nu pela presença de cistocarpos no talo. Os gametófitos masculinos e tetrasporófitos foram identificados por meio de um microscópio estereoscópico (American Optical FORTY) logo após a coleta. As medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas com representantes dos diferentes estádios reprodutivos (Tabela 1).

4.2. Cálculo do coeficiente de Absortância

O coeficiente de absortância (Abst) foi calculado de acordo com as metodologias propostas por Barufi (2010) e Enriquez (2005).

Três indivíduos de *G. birdiae* foram cultivados separadamente em Elenmeyers contendo 400 ml de água do mar enriquecida com solução de von Stosch (Edward, 1970) modificada (Ursi & Plastino, 2001), e diluída à 12,5%, com acréscimo de nitrato (NO_3^-) na concentração de 0,250 mM (Costa, 2005), em condições de baixa Irradiância PAR (até 17 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e sem aeração por um período de quatro semanas (fotoperíodo 14h). O meio foi trocado semanalmente. Ao final desse período, ápices foram selecionados ao acaso (até 3 cm) para avaliar os índices de absortância. Parte dos ramos foi imersa em uma solução de hipoclorito de sódio e água (1:2) por 20 minutos para a remoção dos pigmentos (Enríquez, 2005). A utilização de ápices despigmentados, como referência ou base para a calibragem é indicada para a correção da absorção não

fotoquímica, já que esses apresentam a mesma espessura e anatomia interna do talo a ser avaliado (Enriquez, 2005).

4.2.1. Metodologia proposta por Barufi (2010)

Dois tipos de medidas foram obtidas a partir das plantas cultivadas nas condições descritas anteriormente: irradiância inicial (I_o) e irradiância final (I_f). Essas medidas foram realizadas com o medidor de quanta (LI-190SA Quantum Sensor) envolto por uma película plástica de coloração preta na qual foi feito um pequeno orifício (<0,5 cm de diâmetro). Esse medidor foi posicionado sobre um ponto fixo de uma bancada iluminada por uma lâmpada fluorescente “Luz do Dia” (Osram 40W). Em seguida, uma lâmina histológica com os ápices despigmentados de *G. birdiae* dispostos de maneira a não deixar espaços livres entre eles foi depositada sobre o medidor, acima do orifício. Três medidas consecutivas foram realizadas no mesmo ponto fixo, para a obtenção da irradiância inicial (I_o). A irradiância final (I_f) foi obtida nas mesmas condições descritas anteriormente, porém com a lâmina histológica contendo ápices pigmentados de *G. birdiae* dispostos de maneira a não deixar espaços livres entre eles. Os coeficientes de absorvância foram calculados a partir dos valores obtidos para I_o e I_f , de acordo com a fórmula: $Abst=1-(I_f/I_o)$. Esses dados são apresentados na Tabela 1. O índice médio de absorvância foi de 0,83.

4.2.2. Metodologia proposta por Enriquez (2005)

Essa metodologia emprega o uso de espectrofotômetro. No atual estudo, foi utilizado o espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A. A calibragem do aparelho foi realizada com a cubeta de Poliestireno de percurso óptico de 5 mm, preenchida com água do mar, na qual foram acondicionados os ápices despigmentados de *G. birdiae*. A absorvância foi então obtida a partir de medidas realizadas com ápices pigmentados de *G. birdiae*, acondicionados em uma cubeta de Poliestireno de percurso óptico de 5 mm, preenchida com água do mar. As absorvâncias foram medidas a 680 nm. Três medidas consecutivas foram realizadas para cada repetição. Os coeficientes de absorvância foram calculados a partir dos valores obtidos para a absorvância de acordo com a fórmula: $Abst=1-10^{-absorvância}$. Esses dados são apresentados na Tabela 2. O índice médio de absorvância foi de 0,91.

Os valores obtidos a partir das duas metodologias foram submetidos à análise de variância unifatorial, com intervalo de confiança de 95%.

Devido à natureza cilíndrica dos ápices de *G. birdiae*, mesmo com uma justaposição cuidadosa dos mesmos sobre a lâmina histológica, como no método proposto por Barufi (2011), ainda existe a possibilidade de que uma fração da irradiância PAR tenha atingido diretamente o sensor, alterando assim o resultado. Entretanto, no método proposto por Enriquez (2005), o arranjo dos ápices na cubeta pode resultar na sobreposição dos mesmos e na superestimação dos resultados. Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho foram recalculados levando-se em consideração o coeficiente de absorvância de 0,83.

4.3. Fluorescência *in vivo* da clorofila *a*

As medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas imediatamente após a coleta e identificação dos diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* nas distintas populações amostradas. Esses horários são apresentados na Tabela 3.

A fluorescência *in vivo* foi mensurada utilizando-se o fluorômetro sub-aquático Walz Diving-PAM (“Pulse Amplitude Modulation”). Quatro ápices de um mesmo indivíduo foram dispostos sobre a extremidade da fibra ótica (Diving-F) por meio de um “pregador magnético” (“magnetic sample holder”) e organizados de modo que não houvesse sobreposição. Foram empregados 9 níveis de irradiância (4, 13, 27, 57, 86, 116, 173, 242 e 536 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), selecionando-se a opção “light curve” do equipamento para a obtenção de “curvas rápidas de luz” (White & Critchley, 1998). O tempo de exposição dos ápices em cada irradiância foi de 20s, intercalados por pulso de saturação de 0,8s, de aproximadamente 6100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Esses dados foram utilizados para a construção de curvas Fotossíntese x Irradiância (FI).

Essas curvas foram geradas com base nos valores de ETR (taxa de transporte de elétrons), calculados a partir da fórmula: $ETR = \Delta F/F_m' * PAR * Abst * F_{II}$. O rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) foi fornecido pelo Diving-PAM, após um pulso inicial de saturação, quando as amostras encontravam-se sob uma luz azul de baixíssima intensidade (aproximadamente 0 $\mu\text{mol photons m}^{-2} s^{-1}$). O valor de absorvância adotado foi 0,83, e o fator F_{II} para algas vermelhas é de 0,15 (Grzyski *et al.*, 1997). Os parâmetros da curva: eficiência fotossintetizante (αETR), fotossíntese máxima (ETR_{max}) e saturação luminosa (I_k), foram calculados e analisados de acordo com as equações:

$P = P_{\max} \cdot \tanh(\alpha \cdot I / P_{\max})$ (Jassby & Platt, 1976), $P = P_S \cdot [1 - \exp(-\alpha \cdot I / P_S)] \cdot [\exp(-\beta \cdot I / P_S)]$ e $P_{\max} = P_S \cdot [\alpha / (\alpha + \beta)] \cdot [\beta / (\alpha + \beta)]^{\beta / \alpha}$ (Platt *et al.*, 1980); e $P = P_{\max} \cdot [1 - \exp(-\alpha \cdot I / P_{\max})]$ (Webb *et al.*, 1974).

Os parâmetros I_k , $\Delta F / F_m'$, $ETR_{\max}$ e αETR foram submetidos à análise de variância unifatorial, com intervalo de confiança de 95%, e quando necessário, a testes *à posteriori* de Newman-Keuls. Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do módulo “ANOVA” do programa “Statistica” (versão 12.0).

5. Resultados

As Figuras 1 e 3 apresentam as curvas de Fotossíntese x Irradiância (FI) de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* considerando-se os estádios reprodutivos encontrados em cada população amostrada. Essas curvas foram também organizadas de forma a permitir uma comparação visual entre o mesmo estágio reprodutivo em cada uma das espécies considerando-se as diferentes populações (Fig. 2, *G. birdiae* e Fig. 4, *G. caudata*). São apresentadas ainda curvas FI de ambas espécies por localidade amostrada (Fig. 5, CE; Fig. 6, RN; Fig. 7, PE; e Fig. 8, BA). Os parâmetros calculados a partir das curvas FI foram analisados seguindo a organização das figuras apresentadas: estádios reprodutivos em cada população amostrada; estágio reprodutivo nas distintas populações de uma mesma espécie; e espécies distintas em uma mesma localidade (Tabela 3).

5.1. *Gracilaria birdiae*

5.1.1. Município de Paracurú – CE (Praia da Pedra Rachada)

5.1.1.1. Indivíduos de coloração vermelha (selvagem)

Gametófitos femininos com cistocarpos e tetrasporófitos apresentaram valores semelhantes para $ETR_{\max}$ ($F = 3,618$ e $p = 0,081$), αETR ($F = 0,520$ e $p = 0,484$), $\Delta F / F_m'$ ($F = 1,594$ e $p = 0,230$) e I_k ($F = 0,199$ e $p = 0,663$). Não foram avaliados gametófitos masculinos, pois não foram encontrados indivíduos adequados para a realização da técnica de fluorescência (Tabela 3).

5.1.1.2. Indivíduos de coloração esverdeada

Os gametófitos femininos com cistocarpos e os tetrasporófitos apresentaram valores semelhantes para αETR ($F = 2,631$ e $p = 0,130$), $\Delta F / F_m'$ ($F = 1,914$ e $p = 0,191$) e

I_k ($F= 0,012$ e $p= 0,914$). Os tetrasporófitos apresentaram valores elevados de ETR_{max} , quando comparados aos gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 6,118$ e $p= 0,029$). Não foram avaliados gametófitos masculinos, pois não foram encontrados indivíduos adequados para a realização da técnica de fluorescência (Tabela 3).

5.1.1.3. Indivíduos de coloração vermelha X indivíduos de coloração esverdeada

Os gametófitos femininos com cistocarpos de ambas colorações apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 3,173$ e $p= 0,100$), αETR ($F= 0,196$ e $p= 0,665$), $\Delta F/F_m'$ ($F= 0,0425$ e $p= 0,840$) e I_k ($F= 3,475$ e $p= 0,087$) (Tabela 3).

Os tetrasporófitos de ambas colorações apresentaram valores semelhantes para αETR ($F= 0,119$ e $p= 0,735$), $\Delta F/F_m'$ ($F= 0,008$ e $p= 0,927$) e I_k ($F= 2,993$ e $p= 0,1093$). Os tetrasporófitos de coloração esverdeada apresentaram valores elevados para ETR_{max} , quando comparados aos tetrasporófitos de coloração vermelha ($F= 8,223$ e $p= 0,014$) (Tabela 3).

5.1.2. Município de Rio do Fogo – RN (Praia do Rio do Fogo)

Os tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos analisados apresentaram valores semelhantes para a eficiência fotossintetizante (αETR) ($F= 2,473$ e $p> 0,095$), rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) ($F= 1,660$ e $p> 0,157$) e índice de saturação luminosa (I_k) ($F= 0,131$ e $p> 0,681$) (Tabela 3).

Gametófitos masculinos e tetrasporófitos apresentaram valores elevados para a fotossíntese máxima (ETR_{max}), quando comparados aos gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 7,118$ e $p< 0,028$). Valores semelhantes de ETR_{max} foram observados entre os gametófitos masculinos e tetrasporófitos ($F= 7,118$ e $p> 0,195$).

5.1.3. Município de Ipojuca – PE (Praia de Muro Alto)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,535$ e $p> 0,393$), αETR ($F= 0,898$ e $p> 0,307$), $\Delta F/F_m'$ ($F= 1,884$ e $p> 0,196$) e I_k ($F= 1,809$ e $p> 0,201$) (Tabela 3).

5.1.4. Município de Arembepe – BA (Praia do Emissário)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,371$ e $p> 0,480$), αETR ($F= 1,416$ e $p> 0,239$), $\Delta F/F_m$ ($F= 2,637$ e $p> 0,080$) e I_k ($F= 0,340$ e $p> 0,546$) (Tabela 3).

Figura 1. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (gametófitos femininos com cistocarpos, gametófitos masculinos e tetrasporófitos) de *Gracilaria birdiae* nas quatro populações amostradas: **A.** Praia do Rio do Fogo, Município do Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN) (12h07min) em 27/09/2011, **B.** Praia da Pedra Rachada, Município de Paracurú, Ceará (CE) (14h46min) em 08/02/12, **C.** Praia do Emissário, Município de Arembepe, Bahia (BA) (11h47min) em 14/10/12 e **D.** Praia de Muro Alto, Município de Ipojuca, Pernambuco (PE) (12h01min) em 12/03/2013.

5.1.5. Comparação entre diferentes populações de *G. birdiae*

Foram comparados apenas os tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos de coloração vermelha (selvagem) das quatro populações amostradas (Figura 2). Os gametófitos masculinos foram comparados apenas para as populações dos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Bahia (BA) e Pernambuco (PE), já que não foram encontrados indivíduos adequados na população do Ceará (CE) para a realização da técnica de fluorescência (Figura 2).

5.1.5.1. Tetrasporófitos

Os indivíduos tetrasporofíticos de *G. birdiae* do RN e CE apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F= 32,219$ e $p= 0,683$). Entretanto, esses valores foram inferiores ao observados para os tetrasporófitos da BA e PE ($F= 32,219$ e $p< 0,000$). Os tetrasporófitos da BA apresentaram valores intermediários de ETR_{max} ($F= 32,219$ e $p< 0,000$). Valores elevados de ETR_{max} foram observados para os tetrasporófitos de PE, quando comparados aos das demais populações ($F= 32,219$ e $p<0,000$).

Tetrasporófitos do RN, BA e PE apresentaram valores semelhantes de αETR ($F= 17,875$ e $p> 0,077$). Entretanto, esses valores foram inferiores aos observados para os tetrasporófitos do CE ($F= 17,875$ e $p< 0,000$).

Valores elevados de $\Delta F/F_m'$ foram observados para os tetrasporófitos de PE, quando comparados aos do CE e BA ($F= 6,012$ e $p< 0,014$). Valores semelhantes de $\Delta F/F_m'$ foram observados entre os tetrasporófitos de PE e RN ($F= 6,012$ e $p= 0,108$). Os tetrasporófitos das populações do RN, CE e BA apresentaram valores semelhantes para $\Delta F/F_m'$ ($F= 6,012$ e $p> 0,072$).

Tetrasporófitos da BA e PE apresentaram valores semelhantes de I_k ($F= 10,439$ e $p= 0,399$), entretanto, esses valores foram superiores aos observados para os tetrasporófitos do RN e CE ($F= 10,439$ e $p< 0,014$). Valores semelhantes de I_k foram observados entre os tetrasporófitos do RN e CE ($F= 10,439$ e $p= 0,164$).

5.1.5.2. Gametófitos femininos com cistocarpos

Os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* apresentaram valores semelhantes para $\Delta F/F_m'$ nas quatro populações amostradas ($F= 1,438$ e $p> 0,260$).

Valores semelhantes de αETR foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos do RN, BA e PE ($F= 6,948$ e $p> 0,108$). Entretanto, esses valores foram

inferiores aos observados para os gametófitos femininos com cistocarpos do CE ($F=6,948$ e $p<0,011$).

Os gametófitos femininos com cistocarpos de PE apresentaram valores elevados de ETR_{max} ($F=14,104$ e $p<0,000$) e I_k ($F=12,453$ e $p<0,000$), quando comparados aos gametófitos femininos com cistocarpos do RN, CE e BA. Indivíduos cistocárpicos das populações do RN, CE e BA apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F=14,104$ e $p>0,243$) e I_k ($F=12,453$ e $p>0,552$).

5.1.5.3. Gametófitos masculinos

Os gametófitos masculinos de *G. birdiae* apresentaram valores semelhantes para αETR ($F=0,587$ e $p>0,376$) e $\Delta F/F_m$ ($F=0,680$ e $p>0,362$) nas três populações em que foi possível realizar essa avaliação (RN, BA e PE).

Os gametófitos masculinos de PE apresentaram valores elevados para ETR_{max} ($F=4,520$ e $p=0,020$) e I_k ($F=6,541$ e $p=0,005$), quando comparados aos gametófitos masculinos do RN. Entretanto, valores semelhantes de ETR_{max} ($F=4,520$ e $p=0,101$) e I_k ($F=6,541$ e $p=0,050$) foram observados entre os gametófitos masculinos de PE e BA. Gametófitos masculinos das populações do RN e BA apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F=4,520$ e $p=0,221$) e I_k ($F=6,541$ e $p=0,138$).

Figura 2. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** gametófitos femininos com cistocarpos, **B.** tetrasporófitos e **C.** gametófitos masculinos) de *Gracilaria birdiae* nas quatro populações amostradas: Praia do Rio do Fogo, Município do Rio Fogo, Rio Grande do Norte (RN) (12h07min) em 27/09/2011, Praia da Pedra Rachada, Município de Paracurú, Ceará (CE) (14h46min) em 08/02/12, Praia do Emissário, Município de Arembépe, Bahia (BA) (11h47min) em 14/10/12 e Praia de Muro Alto, Município de Ipojuca, Pernambuco (PE) (12h01min) em 12/03/2013. Os gametófitos masculinos foram comparados apenas para as populações dos Estados do RN, BA e PE, já que não foram encontrados indivíduos adequados na população do CE para a realização da técnica de fluorescência.

5.2. *Gracilaria caudata*

5.2.1. Município de Paracurú – CE (Praia do Naufrágio)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,758$ e $p> 0,454$), αETR ($F= 0,764$ e $p> 0,442$), $\Delta F/F_m$ ($F= 0,575$ e $p> 0,492$) e I_k ($F= 0,928$ e $p> 0,290$) (Tabela 3).

5.2.2. Município de Rio do Fogo – RN (Praia do Rio do Fogo)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,365$ e $p> 0,566$), $\Delta F/F_m$ ($F= 0,806$ e $p> 0,397$) e I_k ($F= 1,050$ e $p> 0,352$) (Tabela 3).

Tetrasporófitos e gametófitos masculinos apresentaram valores semelhantes de αETR ($F= 5,726$ e $p= 0,768$). Entretanto, eles foram superiores aos valores observados para os gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 5,726$ e $p< 0,024$).

5.2.3. Município de Recife – PE (Praia de Boa Viagem)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para αETR ($F= 3,118$ e $p> 0,056$), $\Delta F/F_m$ ($F= 2,336$ e $p> 0,094$) e I_k ($F= 2,466$ e $p> 0,111$). Gametófitos masculinos apresentaram valores elevados para ETR_{max} , quando comparados aos tetrasporófitos ($F= 3,675$ e $p= 0,037$). Valores semelhantes para ETR_{max} foram observados entre os gametófitos masculinos e gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 3,675$ e $p= 0,134$). Tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F= 3,675$ e $p= 0,272$) (Tabela 3).

5.2.4. Município de Arembepe – BA (Praia do Emissário)

Gametófitos femininos com cistocarpos e tetrasporófitos apresentaram valores semelhantes para αETR ($F= 2,850$ e $p= 0,129$) e $\Delta F/F_m$ ($F= 4,272$ e $p= 0,072$). Tetrasporófitos apresentaram valores elevados para ETR_{max} ($F= 11,298$ e $p= 0,010$) e I_k ($F= 6,384$ e $p= 0,035$), quando comparados aos gametófitos masculinos. Não foram avaliados gametófitos femininos com cistocarpos, pois não foram encontrados indivíduos adequados para a realização da técnica de fluorescência (Tabela 3).

5.2.5. Município de Anchieta – ES (Praia de Parati)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 2,808$ e $p> 0,075$), αETR ($F= 0,145$ e $p> 0,730$), $\Delta F/F_m$ ($F= 0,570$ e $p> 0,389$) e I_k ($F= 0,172$ e $p> 0,632$) (Tabela 3).

5.2.6. Município de São Sebastião – SP (Praia das Cigarras)

Gametófitos masculinos, tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,127$ e $p> 0,739$) e $\Delta F/F_m$ ($F= 1,561$ e $p> 0,211$).

Tetrasporófitos apresentaram valores elevados para αETR , quando comparados aos gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 4,469$ e $p= 0,022$). Valores semelhantes de αETR foram observados para os tetrasporófitos e gametófitos masculinos ($F= 4,469$ e $p= 0,068$). Gametófitos masculinos e gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores semelhantes de αETR ($F= 4,469$ e $p= 0,330$) (Tabela 3).

Gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram valores elevados para I_k , quando comparados aos tetrasporófitos ($F= 4,216$ e $p= 0,024$). Valores semelhantes de I_k foram observados entre gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos ($F= 4,216$ e $p= 0,143$). Tetrasporófitos e gametófitos masculinos apresentaram valores semelhantes de I_k ($F= 4,216$ e $p= 0,187$) (Tabela 3).

Figura 2. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (gametófitos femininos com cistocarpos, gametófitos masculinos e tetrasporófitos) de *Gracilaria caudata* nas seis populações avaliadas: **A.** Praia do Rio do Fogo, Município do Rio Fogo, Rio Grande do Norte (RN), 11h03min (28/09/2011), **B.** Praia do Naufrágio, Município de Paracurú, Ceará (CE), 14h25min (09/02/2012), **C.** Praia do Emissário, Município de Arembépe, Bahia (BA), 12h37min (15/10/2012), **D.** Praia de Boa Viagem, Município de Recife, Pernambuco (PE) 13h59min (14/03/2013), **E.** Praia de Parati, Município de Anchieta, Espírito Santo (ES), 11h06min (05/05/2012) e **F.** Praia das Cigarras, Município de São Sebastião, São Paulo (SP), 11h44min (03/10/2013).

5.2.7. Comparação entre diferentes populações de *G. caudata*

Foram comparados os tetrasporófitos e gametófitos masculinos das seis populações amostradas e identificadas como *G. caudata* (Figura 4). Os gametófitos femininos com cistocarpos foram comparados apenas para as populações dos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP), já que não foram realizadas medidas em gametófitos femininos com cistocarpos da população da Bahia (BA) (Figura 4).

5.2.7.1. Tetrasporófitos

Os indivíduos tetrasporófitos de *G. caudata* do RN, CE e ES apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F= 35,580$ e $p> 0,836$). Entretanto, os valores obtidos para CE e ES foram semelhantes aos observados para os tetrasporófitos de PE ($F= 35,580$ e $p> 0,054$). Os tetrasporófitos de SP apresentaram valores intermediários de ETR_{max} e semelhantes aos observados para os tetrasporófitos de PE ($F= 35,580$ e $p= 0,379$). Valores elevados de ETR_{max} foram observados para os tetrasporófitos de BA, quando comparados aos tetrasporófitos das demais populações ($F= 35,580$ e $p< 0,001$).

Tetrasporófitos do RN, CE, PE, ES e SP apresentaram valores semelhantes de αETR ($F= 4,602$ e $p> 0,222$). Entretanto, os valores obtidos para RN, CE e SP foram superiores aos observados para os tetrasporófitos da BA ($F= 4,602$ e $p< 0,036$). Os tetrasporófitos da BA apresentaram valores de αETR semelhantes aos observados para os tetrasporófitos de PE e ES ($F= 4,602$ e $p> 0,197$).

Valores semelhantes de $\Delta F/F_m'$ foram observados para os tetrasporófitos de PE, ES e SP ($F= 12,725$ e $p> 0,056$), entretanto, esses valores foram superiores aos observados para os tetrasporófitos das demais populações (RN, CE e BA) ($F= 12,725$ e $p< 0,048$). Os tetrasporófitos de PE apresentaram valores de $\Delta F/F_m'$ semelhantes aos observados para os tetrasporófitos da BA ($F= 12,725$ e $p= 0,051$). Valores semelhantes de $\Delta F/F_m'$ foram observados para os tetrasporófitos de RN, CE e BA ($F= 12,725$ e $p> 0,072$).

Valores elevados de I_k foram observados para os tetrasporófitos da BA, quando comparados aos tetrasporófitos das demais populações ($F= 16,909$ e $p< 0,000$). Os tetrasporófitos das populações do RN, CE, PE, ES e SP apresentaram valores semelhantes de I_k ($F= 16,909$ e $p> 0,239$).

5.2.7.2. Gametófitos femininos com cistocarpos

Valores semelhantes de ETR_{max} foram observados para os gametófitos femininos com cistocarpos das populações de PE e SP ($F= 17,500$ e $p= 0,179$), entretanto, esses valores foram superiores aos observados para os gametófitos femininos do RN, CE e ES ($F= 17,500$ e $p< 0,000$). Os gametófitos femininos com cistocarpos das populações do RN, CE e ES apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} ($F= 17,500$ e $p> 0,670$).

Valores semelhantes de αETR foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos do RN, CE, PE e ES ($F= 3,501$ e $p> 0,082$). Entretanto, esses valores foram superiores aos observados para os gametófitos femininos com cistocarpos de SP ($F= 3,501$ e $p< 0,048$). Os gametófitos femininos com cistocarpos de PE e SP apresentaram valores semelhantes de αETR ($F= 3,501$ e $p= 0,414$).

Valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos das populações de SP e ES ($F= 16,954$ e $p= 0,354$). Entretanto, esses valores foram superiores aos observados para os gametófitos femininos das demais populações ($F= 16,954$ e $p< 0,031$). Valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos das populações de PE e ES ($F= 16,954$ e $p= 0,094$), no entanto, esses valores foram superiores aos observados para os gametófitos femininos das populações do RN e CE ($F= 16,954$ e $p< 0,009$). Os gametófitos femininos com cistocarpos das populações do RN e CE apresentaram valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ ($F= 16,954$ e $p= 0,176$).

Valores elevados de I_k foram observados para os gametófitos femininos com cistocarpos da população de SP, quando comparados aos gametófitos femininos das demais populações ($F= 15,915$ e $p< 0,013$). Gametófitos femininos com cistocarpos da população de PE apresentaram valores de I_k superiores aos observados para os gametófitos femininos das populações do RN, CE e ES ($F= 15,915$ e $p< 0,013$). Valores semelhantes de I_k foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos das populações do RN, CE e ES ($F= 15,915$ e $p> 0,619$).

5.2.7.3. Gametófitos masculinos

Os gametófitos masculinos de *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para αETR ($F= 1,387$ e $p> 0,234$) e I_k ($F= 2,872$ e $p> 0,0983$) nas seis populações avaliadas.

Os gametófitos masculinos das populações da BA, PE e SP apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 7,851$ e $p> 0,132$), no entanto, esses valores foram superiores aos observados para os gametófitos masculinos das demais populações ($F=$

7,851 e $p < 0,046$). Os gametófitos masculinos de PE apresentaram valores de ETR_{max} semelhantes aos observados para gametófitos masculinos do ES e CE ($F = 7,851$ e $p > 0,050$). Os valores obtidos para o ES e CE foram semelhantes aos observados para os gametófitos masculinos do RN ($F = 7,851$ e $p > 0,262$). Valores semelhantes de ETR_{max} foram observados entre os gametófitos masculinos das populações do CE e SP ($F = 7,851$ e $p = 0,455$).

Valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ foram observados entre os gametófitos masculinos das populações do CE, BA, PE, ES e SP ($F = 7,787$ e $p > 0,067$). Entretanto, esses valores foram superiores os observados para os gametófitos masculinos do RN ($F = 7,787$ e $p < 0,024$), com exceção dos gametófitos masculinos da população do CE. Valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ foram observados entre os gametófitos masculinos do CE e RN ($F = 7,787$ e $p = 0,154$).

Figura 4. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** gametófitos femininos com cistocarpos, **B.** tetrasporófitos e **C.** gametófitos masculinos) de *Gracilaria caudata* nas seis populações avaliadas: Praia do Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN), 11h03min (28/09/2011); Praia do Naufrágio, Município de Paracurú, Ceará (CE), 14h25min (09/02/2012); Praia do Emissário, Município de Areembepe, Bahia (BA), 12h37min (15/10/2012); Praia de Boa Viagem, Município de Recife, Pernambuco (PE) 13h59min (14/03/2013); Praia de Parati, Município de Anchieta, Espírito Santo (ES), 11h06min (05/05/2012), e Praia das Cigarras, Município de São Sebastião, São Paulo (SP), 11h44min (03/10/2013). Os gametófitos femininos com cistocarpos foram comparados apenas para as populações

dos Estados do RN, CE, PE, ES e SP, já que não foram encontrados indivíduos adequados na população da BA para a realização da técnica de fluorescência.

5.3. *Gracilaria birdiae* X *G. caudata*

Foi realizada uma análise comparativa, considerando-se um mesmo estágio reprodutivo entre as populações de *G. birdiae* e *G. caudata* dos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Bahia (BA) e Pernambuco (PE).

5.3.1. Estado do Ceará – CE

Foram avaliados os tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* e *G. caudata* (Figura 5). Não foram avaliados gametófitos masculinos, pois não foram encontrados indivíduos de *G. birdiae* adequados para a realização da técnica de fluorescência.

5.3.1.1. Gametófitos femininos com cistocarpos

Os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,472$ e $p= 0,505$), αETR ($F= 2,645$ e $p= 0,129$) e $\Delta F/F_m'$ ($F= 1,103$ e $p= 0,314$). Valores elevados de I_k foram observados para os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. caudata*, quando comparados aos valores observados para *G. birdiae* ($F= 6,523$ e $p= 0,025$).

5.3.1.2. Tetrasporófitos

Os tetrasporófitos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 0,198$ e $p= 0,665$), αETR ($F= 0,354$ e $p= 0,565$), $\Delta F/F_m'$ ($F= 0,034$ e $p= 0,857$) e I_k ($F= 0,004$ e $p= 0,949$).

Figura 5. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** gametófitos femininos com cistocarpos e **B.** tetrasporófitos) de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* na população do Estado do Ceará (CE), 14h46min e 14h25min (08 e 09/02/2012), respectivamente. Os gametófitos masculinos não foram comparados, pois não foram encontrados indivíduos adequados na população de *G. birdiae* do CE para a realização da técnica de fluorescência.

5.3.2. Estado do Rio Grande do Norte – RN

Foram avaliados os tetrasporófitos, gametófitos masculinos e gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* e *G. caudata* (Figura 6).

5.3.2.1. Gametófitos femininos com cistocarpo

Valores semelhantes de $\Delta F/F_m$ ($F=0,747$ e $p=0,404$) e I_k ($F=3,860$ e $p=0,073$) foram observados entre os gametófitos femininos com cistocarpos de ambas espécies.

Os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. caudata* apresentaram valores elevados de ETR_{max} ($F=11,640$ e $p=0,005$) e αETR ($F=30,565$ e $p=0,000$), quando comparados aos observados para os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae*.

5.3.2.2. Tetrasporófitos

Os tetrasporófitos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F=1,843$ e $p=0,204$). Entretanto, valores elevados de $\Delta F/F_m$ ($F=6,280$ e $p=0,031$) e I_k ($F=9,901$ e $p=0,010$) foram observados para os tetrasporófitos de *G. birdiae*, quando comparados aos valores observados para *G. caudata*. Os tetrasporófitos de *G. caudata* apresentaram valores elevados de αETR , quando comparados aos valores observados para *G. birdiae* ($F=28,991$ e $p=0,000$).

5.3.2.3. Gametófitos masculinos

Os gametófitos masculinos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F=0,122$ e $p=0,735$), $\Delta F/F_m$ ($F=0,956$ e $p=0,356$) e I_k ($F=3,589$ e $p=0,094$). Valores elevados de αETR foram observados para os gametófitos masculinos de *G. caudata*, quando comparados aos valores observados para *G. birdiae* ($F=11,082$ e $p=0,010$).

Figura 6. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** gametófitos femininos com cistocarpos, **B.** tetrasporófitos e **C.** gametófitos masculinos) de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* na população do Estado do Rio Grande do Norte (RN), 12h07min e 11h03min (27 e 28/09/2011), respectivamente.

5.3.3. Estado da Bahia – BA

Foram avaliados os tetrasporófitos e gametófitos masculinos de *G. birdiae* e *G. caudata* (Figura 7). Não foram avaliados gametófitos femininos com cistocarpos, pois não foram encontrados indivíduos de *G. caudata* adequados para a realização da técnica de fluorescência.

5.3.3.1. Tetrasporófitos

Os tetrasporófitos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para $\Delta F/F_m$ ($F= 0,755$ e $p= 0,410$). Entretanto, valores elevados de ETR_{max} ($F= 18,896$ e $p= 0,002$) e I_k ($F= 27,979$ e $p= 0,000$) foram observados para os tetrasporófitos de *G. caudata*, quando comparados aos valores observados para *G. birdiae*. Os tetrasporófitos de *G. birdiae* apresentaram valores elevados de αETR , quando comparados aos valores observados para *G. caudata* ($F= 13,086$ e $p= 0,006$).

5.3.3.2. Gametófitos masculinos

Os gametófitos masculinos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} ($F= 1,573$ e $p= 0,245$), αETR ($F= 0,149$ e $p= 0,709$), $\Delta F/F_m$ ($F= 2,441$ e $p= 0,157$) e I_k ($F= 1,216$ e $p= 0,302$).

Figura 7. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** tetrasporófitos e **B.** gametófitos masculinos) de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* na população do Estado da Bahia (BA), 11h47min e 12h37min (14 e 15/10/2012), respectivamente. Os gametófitos femininos com cistocarpos não foram comparados, pois não foram encontrados indivíduos adequados na população de *G. caudata* da BA para a realização da técnica de fluorescência.

5.3.4. Estado de Pernambuco – PE

Foram avaliados os gametófitos femininos com cistocarpos, tetrasporófitos e gametófitos masculinos de *G. birdiae* e *G. caudata* (Figura 8).

5.3.4.1. Gametófitos femininos com cistocarpos

Os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para α ETR (F= 0,030 e p= 0,868), $\Delta F/F_m$ (F= 0,382 e p= 0,559) e I_k (F= 4,777 e p= 0,071). Valores elevados de ETR_{max} foram observados para os gametófitos femininos com cistocarpos de *G. birdiae*, quando comparados aos valores observados para *G. caudata* (F= 9,101 e p= 0,023).

5.3.4.2. Tetrasporófitos

Os tetrasporófitos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para α ETR (F= 0,078 e p= 0,784), $\Delta F/F_m$ (F= 1,365 e p= 0,265) e I_k (F= 2,624 e p= 0,131). Valores elevados de ETR_{max} foram observados para os tetrasporófitos de *G. birdiae*, quando comparados aos valores observados para *G. caudata* (F= 17,715 e p= 0,001).

5.3.4.3. Gametófitos masculinos

Os gametófitos masculinos de *G. birdiae* e *G. caudata* apresentaram valores semelhantes para ETR_{max} (F= 2,001 e p= 0,182), α ETR (F= 0,854 e p= 0,373), $\Delta F/F_m$ (F= 0,030 e p= 0,865) e I_k (F= 0,364 e p= 0,557).

Figura 8. Curvas de Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* dos diferentes estádios reprodutivos (**A.** gametófitos femininos com cistocarpos, **B.** tetrasporófitos e **C.** gametófitos masculinos) de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* na população do Estado de Pernambuco (PE), 12h01min e 13h59min (12 e 14/03/2013), respectivamente.

6. Discussão

Existem evidências de que os parâmetros relacionados à fotossíntese são suscetíveis a variações circadianas e sazonais (Terrados & Ros, 1992; Kasukariba & Necchi, 2005; Valera *et al.*, 2006). A sazonalidade bem como o fotoperíodo são determinantes na variação da fotossíntese de algas de regiões entre-marés expostas a flutuações e condições abióticas extremas, especialmente àquelas que ocorrem em áreas tropicais (Henley & Ramus, 1989; Plastino & Oliveira, 2002), como pode ser o caso de *G. birdiae* e *G. caudata*. Neste trabalho, considerando-se as populações avaliadas ao longo da costa, deve-se ressaltar que as medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas em diferentes horários e períodos do ano, e que essas populações estavam expostas a condições ambientais distintas, o que poderia limitar o potencial de comparação das mesmas, tanto para *Gracilaria birdiae*, como para *G. caudata*. Entretanto, essas análises comparativas são consistentes se considerarmos os dados de fotossíntese de diferentes estádios reprodutivos de uma mesma população, ou mesmo as análises realizadas entre as duas espécies de uma mesma localidade, pois nesses casos, as medidas foram realizadas numa mesma ocasião.

O outro aspecto a ser considerado diz respeito à posição vertical ocupada pelas populações no substrato, para ambas espécies estudadas. Populações localizadas no médio-litoral, por apresentarem emergências periódicas, possuem habilidades de aclimação, como a otimização da resposta fotossintetizante a um dado regime de luz e a manutenção da atividade metabólica, especialmente a enzimática, em um amplo espectro de temperatura (Henley & Ramus, 1989). Dentre as populações de *G. birdiae* amostradas, notamos que as populações dos municípios de Rio do Fogo (RN) e de Paracurú (CE), ocorriam na franja entre o médio-litoral e o infra-litoral, parcialmente submersas na coluna d'água, sendo, portanto, as que menos sofriam influências das variações de maré. Mesmo a população de *G. caudata* do CE, embora num nível superior, encontrava-se parcialmente submersa. Entretanto, as populações dos Estados da Bahia (BA) e Pernambuco (PE), de ambas espécies, encontravam-se expostas ao ar durante o período de amostragem, assim como as populações de *G. caudata* dos Estados do Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP). Além disso, as populações de *G. caudata* ocupavam locais de menor hidrodinamismo, com exceção da população do ES, que se encontrava em uma zona sujeita à ação direta do impacto das ondas. Deve-se ressaltar ainda que as coletas foram realizadas em marés: 0,0 (*G. birdiae* - RN, CE, BA; *G. caudata* - RN, CE, BA, ES), 0,1 (*G. birdiae* - PE; *G. caudata* - SP) e 0,2 (*G. caudata* -

PE). Esses dados sugerem que as populações dos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte ocupavam uma posição inferior às demais em relação ao nível da água, possivelmente em decorrência das diferentes condições de irradiâncias e dessecação a que estão submetidas.

Nas análises intra-populacionais, observou-se menores valores para a fotossíntese máxima (ETR_{max}), eficiência fotossintetizante (αETR) e saturação luminosa (I_k), em gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria birdiae* do CE, e de *G. caudata* do CE, BA e SP. Esses dados sugerem um maior comprometimento dos recursos destinados à fotossíntese nesses indivíduos, quando comparados aos tetrasporófitos e gametófitos masculinos. Esses resultados corroboram estudos anteriores em que gametófitos femininos com cistocarpos de *G. domingensis* (Guimarães *et al.*, 1999) e de *G. chilensis* (Guillemin *et al.*, 2013) apresentaram menores taxas de crescimento em laboratório, quando comparados aos demais estádios reprodutivos, possivelmente devido à presença da fase carposporofítica, evidenciando um maior aporte de recursos energéticos para o desenvolvimento dessa fase dependente do gametófito feminino. Os valores semelhantes observados para ETR_{max} , αETR , I_k e rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$), nas diferentes populações de *G. birdiae* (RN, PE e BA) e *G. caudata* (RN, PE e ES), independentemente do estágio reprodutivo, sugerem um gasto energético semelhante para a produção de estruturas reprodutivas. Além disso, deve-se considerar que as plantas cistocárpicas de *G. birdiae* procedentes da população de PE portavam um número menor de cistocarpos, quando comparadas com as plantas cistocárpicas das demais populações, o que poderia explicar também os valores semelhantes observados para esses parâmetros, quando comparados aos obtidos para os demais estádios reprodutivos.

Comparando-se as diferentes populações, os maiores valores de αETR observados para os tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos das populações de *G. birdiae* e *G. caudata* do Ceará sugerem que esses indivíduos estão adaptados a irradiâncias elevadas e apresentam mecanismos capazes de evitar danos ao aparato fotossintetizante. Em condições de laboratório, gametófitos femininos de *G. birdiae* do Ceará apresentaram menores valores de αETR , quando comparados aos do Espírito Santo (Ursi *et al.*, 2003). Entretanto, valores semelhantes para esse parâmetro foram observados para tetrasporófitos de *G. birdiae* do Ceará, quando comparados aos do Espírito Santo (Donato, 2005). Esses dados, aparentemente contraditórios, podem ter resultado das diferentes condições de cultivo empregadas nesses trabalhos. No atual

trabalho, em *G. caudata*, valores elevados de α ETR foram também observados para os tetrasporófitos das populações do RN e SP. No entanto, valores semelhantes de α ETR foram observados entre tetrasporófitos e gametófitos femininos procedentes das populações de *G. caudata* dos Estados do CE e SP (Araújo *et al.*, 2014) em condições de laboratório.

Os valores de α ETR obtidos para as diferentes populações avaliadas variaram entre 0,013 e 0,044 para *G. birdiae*; e entre 0,013 e 0,042 para *G. caudata*. A literatura, referente a espécies de *Gracilaria*, mostra uma grande variação nesses valores (Tabela 4), porém os obtidos para ambas espécies avaliadas neste trabalho estão próximos aos observados em *G. salicornia* (Phooprong *et al.*, 2007), *G. vermiculophylla* (Phooprong *et al.*, 2008), *G. cornea* (Dawes *et al.*, 1999; Ordunã-Rojas *et al.*, 2002), *G. verrucosa* (Menéndez *et al.*, 2001) e *G. tenuistipitata* (Barufi *et al.*, 2011). As espécies citadas nesses artigos encontravam-se expostas a grandes variações de temperatura e irradiância.

No presente estudo, a população de *G. birdiae* do Rio Grande do Norte (RN) apresentou uma diminuição das taxas fotossintetizantes em elevadas irradiâncias testadas (até 500 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Essa diminuição sugere a ocorrência de uma fotoinibição. Durante a fotoinibição, a energia em excesso absorvida pelo PSII é dissipada na forma de calor, resultando em uma diminuição da capacidade fotossintetizante, assim como dos parâmetros relacionados à fotossíntese (Krause & Weis, 1991). Além disso, é necessário considerar a ação de fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes, temperaturas extremas, elevadas irradiâncias e dessecação, que podem acelerar o processo de fotoinibição (Wahl *et al.*, 2011). Deve-se salientar ainda que a população de *G. birdiae* do RN ocupava uma posição inferior no substrato, quando comparada às populações da BA e PE, o que poderia indicar uma maior sensibilidade à luz em relação às demais. As demais populações avaliadas de *G. birdiae* (CE, BA e PE) e *G. caudata* (RN, CE, BA, PE, ES e SP) não apresentaram fotoinibição nas irradiâncias testadas (até 500 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Não foi também verificada fotoinibição para gametófitos femininos de *G. birdiae* cultivados em condições de laboratório, em até 2000 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Ursi *et al.*, 2003). Resultados para outras espécies mostram que *G. cornea* não apresentou fotoinibição em até 800 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Dawes *et al.*, 1999; Orduña-Rojas *et al.*, 2002), e *G. verrucosa* e *G. tikvahiae* em até 1200 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Dawes & Koch, 1990). Além dessas

respostas variarem com a espécie, é importante salientar que as populações avaliadas estavam expostas a condições ambientais distintas.

Os valores obtidos para a fotossíntese máxima (ETR_{max}) em *G. birdiae* (CE, BA e PE) e *G. caudata* (RN, CE, BA, PE, ES e SP), independentemente do estágio reprodutivo, foram semelhantes aos observados para outras espécies de *Gracilaria*, como *G. cornea* (Dawes *et al.*, 1999) exposta a elevadas irradiancias em seu local de ocorrência (Florida Keys). Valores semelhantes de ETR_{max} foram também observados para *G. vermiculophylla* proveniente do Mar Báltico e exposta a grandes variações de temperatura e irradiancias (Nejrup *et al.*, 2013).

Não foram observadas diferenças nos valores de ETR_{max} entre as populações dos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará para ambas espécies estudadas, o que pode ser justificado pela proximidade geográfica das populações, que estariam expostas a condições ambientais parecidas, resultando em respostas fisiológicas semelhantes. Destaca-se ainda o fato dessas populações, especialmente *G. birdiae*, ocuparem posições verticais semelhantes. Os baixos valores de ETR_{max} observados para a população de *G. birdiae* do RN podem estar relacionados a uma baixa disponibilidade de nutrientes no ambiente marinho, principalmente nitrogênio (NO_3). Uma redução na concentração de clorofila *a*, rica em nitrogênio, resultaria na redução da fração da luz absorvida pelo PSII e utilizada na fotossíntese (Shelly *et al.*, 2010). Uma redução de até 50% para o ETR_{max} , associada às baixas concentrações de NO_3 , foi observada em *G. tenuistipitata* (Barufi *et al.*, 2011). Além disso, a ocorrência de temperaturas elevadas inibe o reparo do PSII pela supressão da síntese protéica, em particular da proteína D1, em decorrência da interrupção da fixação de CO_2 , acelerando assim a fotoinibição (Takahashi & Murata, 2008). Uma redução nos valores de ETR_{max} foi observada para *G. vermiculophylla* em decorrência do aumento da temperatura (Phooprong *et al.*, 2008). O período seco (setembro a fevereiro), durante o qual foi realizada a avaliação da população de *G. birdiae* do Município de Rio do Fogo (RN) é marcado por baixas concentrações de nutrientes na água do mar (NO_3 , NO_2 e NH_4), elevadas irradiancias e maiores temperaturas da água (Carneiro *et al.*, 2011). Portanto, essas condições podem ter favorecido a ocorrência de uma fotoinibição em *G. birdiae*.

Os maiores valores de ETR_{max} , $\Delta F/F_m'$ e I_k observados para a população de Pernambuco, tanto de *G. birdiae* como de *G. caudata*, independentemente do estágio reprodutivo, podem também indicar a atuação de outros fatores, como a disponibilidade de nutrientes. Populações que ocorrem na costa do Estado de Pernambuco estão sujeitas

a uma variação sazonal no regime de ventos que agem diretamente sobre a direção das correntes: ventos provenientes do Sul e Sudeste impõem correntes costeiras no sentido Sul-Norte, e ventos oriundos do Quadrante Nordeste ocasionam a inversão da corrente no sentido Norte-Sul (Lira *et al.*, 2010). Estudos anteriores sugerem que durante o período no qual foi realizada a amostragem em questão (março) estariam atuando ventos do Quadrante Nordeste, o que ocasionaria um maior fluxo de águas continentais ricas em nutrientes em direção sul ao longo da linha da costa (Lira *et al.*, 2010). Essa disponibilidade de nutrientes explicaria os elevados valores de ETR_{max} , $\Delta F/F_m'$ e I_k observados para as populações de Pernambuco.

Os valores de I_k obtidos para as diferentes populações variaram entre 21,501 e 226,333 para *G. birdiae*, e entre 22,851 e 236,715 para *G. caudata*. A literatura, referente a espécies de *Gracilaria*, mostrou uma grande variação nesses valores (Tabela 4). Os obtidos para ambas espécies estão próximos aos observados em *G. salicornia* (Phooprong *et al.*, 2006, 2007), *G. vermiculophylla* (Phooprong *et al.*, 2008), *G. cornea* (Dawes *et al.*, 1999; Ordunã-Rojas *et al.*, 2002), e *G. domingensis* (Andersson *et al.*, 2006). As espécies citadas nesses artigos encontravam-se expostas a grandes variações de temperatura e irradiância.

Quando comparamos tanto tetrasporófitos quanto gametófitos femininos de *G. birdiae* de diferentes colorações recém-coletados da população do Ceará, maiores valores de ETR_{max} foram observados para os indivíduos de coloração esverdeada, quando comparados aos de coloração vermelha (selvagem). Resultados semelhantes foram observados em condições de laboratório para gametófitos femininos e tetrasporófitos das variantes cromáticas (marrom-esverdeada e verde) de *G. birdiae* (Ursi *et al.*, 2003; Donato, 2005) e *G. domingensis* (Guimarães, 2000; Ferreira, 2008). O mesmo foi verificado em *Hypnea musciformis*, cujos maiores valores de ETR_{max} foram observados na linhagem verde, quando comparada à linhagem selvagem (Yokoya *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2012). Os valores elevados de ETR_{max} , observados para a linhagem de coloração esverdeada de *G. birdiae* na natureza sugerem uma maior habilidade em utilizar elevadas irradiâncias para a manutenção de seu metabolismo, quando comparada à linhagem selvagem. Esses dados corroboram estudos anteriores, nos quais em elevadas irradiâncias gametófitos femininos da linhagem verde de *G. birdiae* apresentaram maiores taxas de crescimento, quando comparados à linhagem selvagem (Ursi, 2005). Essa característica deve representar uma vantagem adaptativa para *G. birdiae*, uma vez que a ocorrência de espécimes com capacidades

fotossintetizantes distintas pode aumentar os espectros de aclimação possíveis da espécie. É interessante reforçar que a população do Ceará representa o limite norte da distribuição de *G. birdiae*, estando submetida aos maiores índices de irradiância, quando comparada às demais populações amostradas.

No atual estudo, não foram observadas diferenças entre as linhagens vermelha e esverdeada para a eficiência fotossintetizante (α ETR), rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) e índice de saturação luminosa (I_k). Resultados semelhantes foram observados, em laboratório, para tetrasporófitos de *G. birdiae* de diferentes colorações (Donato, 2005). Entretanto, valores superiores de α ETR foram observados para gametófitos femininos de *G. birdiae* de colocação verde e marrom-esverdeada, quando comparados aos de coloração vermelha (Ursi *et al.*, 2003). Valores semelhantes para α ETR e ETR_{max} foram também observados em laboratório entre as linhagens vermelha e verde de *Kappaphycus alvarezii* expostas a elevadas temperaturas (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2001). Em *Hypnea musciformis*, valores semelhantes de $\Delta F/F_m'$ foram observados entre a variante de cor e a linhagem vermelha (Fernandes *et al.*, 2011), no entanto, menores valores de α ETR foram observados para a linhagem verde cultivada à baixas irradiâncias, quando comparada à linhagem selvagem (Yokoya *et al.*, 2007).

As Rhodophyta podem ocorrer em um limite variável de irradiâncias, sendo que muitas das espécies são conhecidas como plantas de sombra (Gantt, 1990). Comparando-se as populações de *G. birdiae* e *G. caudata* amostradas dentro de uma mesma região, foi possível observar que, independentemente da população, *G. caudata* apresentou valores elevados de I_k e inferiores de α ETR. Uma vez que a aclimação à sombra está relacionada a menores valores de I_k e maior α ETR (Gantt, 1990), os dados obtidos sugerem que *G. birdiae* apresente maior sensibilidade a altos níveis de irradiância, quando comparada a *G. caudata*. Nos locais aonde foram amostradas, observou-se que *G. caudata* encontrava-se em pontos superiores do substrato, estando sujeita a uma maior exposição a elevadas irradiâncias; as populações de *G. birdiae* encontravam-se em uma faixa inferior do substrato. Além disso, a maior distribuição geográfica de *G. caudata* indica uma maior habilidade em lidar com distintas irradiâncias e temperaturas, quando comparada à *G. birdiae*.

Embora a utilização das curvas rápidas de luz na técnica de fluorescência da clorofila *a* para a avaliação dos parâmetros da fotossíntese venha sendo questionada, pois os curtos períodos de iluminação (10-20 seg.) aos quais os ápices estão expostos às diferentes irradiâncias não seriam suficientes para criar um fluxo de elétrons “estável”

entre os fotossistemas PSI e PSII (Ralph & Gademann, 2005), outros trabalhos apontam para uma linearidade entre os valores obtidos para as técnicas de oxigênio dissolvido e fluorescência da clorofila *a*, principalmente em baixas irradiâncias (Enríquez & Borowitzka, 2010). Valores semelhantes foram também observados para os parâmetros da fotossíntese obtidos com ambas as técnicas em *G. tenuistipitata* (Hanelt *et al.*, 1992) *Delesseria sanguinea*, *Porphyra* spp. (Hanelt *et al.*, 1993), *Chondrus crispus* (Hanelt *et al.*, 1993; Cabello-Pasini *et al.*, 2000), *P. umbilicalis* e *Palmaria palmata* (Beer & Axelsson, 2004). Portanto, desde que o desenho experimental apresente medidas padronizadas, como a realizada no atual estudo, esse tipo de abordagem pode resultar em informações úteis para a descrição de variações relativas à atividade fotossintetizante, como sugere Enríquez & Borowitzka (2010).

As diferenças fisiológicas entre as populações, tanto de *Gracilaria birdiae* como de *G. caudata*, e entre as diferentes colorações numa mesma população de *G. birdiae*, evidenciadas no atual estudo por meio de variações na saturação luminosa, eficiência fotossintetizante e fotossíntese máxima, sugerem uma grande capacidade de aclimação das espécies, maximizando as repostas do aparato fotossintetizante e possibilitando uma ampla distribuição ao longo da costa brasileira. Esses resultados corroboram estudos de laboratório em que foram verificadas distintas respostas fisiológicas das diferentes linhagens de *G. birdiae* e *G. caudata*, quando submetidas a diferentes fatores abióticos (Ursi *et al.*, 2003; Donato, 2005; Araújo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a e b).

Tabela 1. Localização das populações de *G. birdiae* e *G. caudata* avaliadas e o número de indivíduos empregados na realização da técnica de fluorescência *in vivo* da clorofila *a*, de acordo com estágio reprodutivo: gametófito feminino com cistocarpo (GF), gametófito masculino (GM) e tetrasporófito (T). A coloração verde no texto refere-se à variante de cor esverdeada.

Região (Estado)	Local (Praia)	Coordenadas		<i>G. birdiae</i>			<i>G. caudata</i>		
				GF	GM	T	GF	GM	T
Rio Grande do Norte Ceará	Rio do Fogo	05°15'41.0"S	35°23'11.0"W	7	7	7	7	5	6
	Pedra Rachada	03°23'87.0"S	39°00'67.0"W	7	*	7	-	-	-
				7	*	7	-	-	-
Bahia Pernambuco	Naufrágio	03°23'50.5"S	39°00'38.8"W	-	-	-	7	4	6
	Emissário	12°44'28.0"S	38°09'01.0"W	7	7	7	*	5	5
	Muro Alto	08°26'13.0"S	34°58'47.0"W	4	7	7	-	-	-
Espírito Santo São Paulo	Boa Viagem	08°07'58.9"S	34°53'57.3"W	-	-	-	7	7	7
	Parati	20°48'31.0"S	40°36'39.0"W	-	-	-	7	7	7
	Cigarras	23°55'01.0"S	46°19'16.8"W	-	-	-	7	7	7

*Não foi possível avaliar, pois não foram encontrados indivíduos adequados à realização da técnica de fluorescência.

Tabela 2. Resultados obtidos para o coeficiente de absortância de acordo com as metodologias empregadas por Barufi (2010) e Enríquez (2005). VM_{CE} , coloração vermelha do Ceará. Valores (média $\pm$ desvio-padrão, n=3).

<i>Repetições</i>	<i>Barufi (2010)</i>	<i>Enríquez (2005)</i>
$VM_{CE} 1$	$0,82 \pm 0,00$	$0,92 \pm 0,01$
$VM_{CE} 2$	$0,82 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,01$
$VM_{CE} 3$	$0,85 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$
Média	$0,83 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,00$

Tabela 3. Parâmetros das curvas Fotossíntese-Irradiância a partir das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* de *G. birdiae* e *G. caudata*, realizadas em indivíduos das diferentes populações. As medidas de fluorescência tiveram início logo após a coleta para *G. birdiae*: Praia do Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN), 12h07min (27/09/2011), n=7; Praia da Pedra Rachada, Município de Paracurú, Ceará (CE), 14h46min (08/02/2012), n=7; Praia do Emissário, Município de Arembépe, Bahia (BA), 11h47min (14/10/2012), n=7; Praia de Muro Alto, Município de Ipojuca, Pernambuco (PE) 12h01min (12/03/2013), n=4. *G. caudata*: Praia do Rio do Fogo, Município de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN), 11h03min (28/09/2011), n= 5; Praia do Naufrágio, Município de Paracurú, Ceará (CE), 14h25min (09/02/2012), n=4; Praia do Emissário, Município de Arembépe, Bahia (BA), 12h37min (15/10/2012), n=5; Praia de Boa Viagem, Município de Recife, Pernambuco (PE) 13h59min (14/03/2013), n=7; Praia de Parati, Município de Anchieta, Espírito Santo (ES), 11h06min (05/05/2012), n=7; Praia das Cigarras, Município de São Sebastião, São Paulo (SP), 11h44min (03/10/2013), n=7. ETR_{max}: fotossíntese máxima. I_K: índice de saturação luminosa. αETR: eficiência fotossintetizante. ΔF/F_{m'}: rendimento quântico efetivo. GF: gametófitos femininos com cistocarpos. GM: gametófitos masculinos. T: tetrasporófitos. A coloração verde no texto refere-se à variante de cor esverdeada. Valores (média ± desvio-padrão).

Populações	Parâmetros	<i>G. birdiae</i>			<i>G. caudata</i>		
		GF	T	GM	GF	T	GM
Praia do Rio do Fogo (RN) (5°15'41.0"S 35°23'11.0"W)	ETR _{max}	0,576 ± 0,104 ^a	0,863 ± 0,162 ^b	0,760 ± 0,160	0,889 ± 0,259 ^{ac}	0,982 ± 0,267	0,851 ± 0,218
	αETR	0,013 ± 0,005	0,020 ± 0,007	0,020 ± 0,006	0,025 ± 0,002 ^c	0,032 ± 0,001 ^c	0,031 ± 0,005 ^c
	ΔF/F _{m'}	0,414 ± 0,104	0,498 ± 0,064 ^c	0,424 ± 0,107	0,361 ± 0,022	0,395 ± 0,048	0,385 ± 0,053
	I _K	48,159 ± 18,440	48,640 ± 10,549 ^c	44,149 ± 22,782	35,336 ± 9,561	30,501 ± 9,436	27,275 ± 7,389
Praia da Pedra Rachada (CE) (03°23'87.0"S 39°00'67.0"W)	ETR _{max}	0,809 ± 0,155	0,954 ± 0,128 ^b	*	-	-	-
	αETR	0,039 ± 0,012 ^b	0,043 ± 0,007 ^b	*	-	-	-
	ΔF/F _{m'}	0,392 ± 0,100	0,453 ± 0,062	*	-	-	-
	I _K	21,501 ± 4,085	22,612 ± 4,525	*	-	-	-
	ETR _{max}	0,965 ± 0,171	1,208 ± 0,195 ^a	*	-	-	-
	αETR	0,036 ± 0,010	0,044 ± 0,008	*	-	-	-
	ΔF/F _{m'}	0,381 ± 0,096	0,449 ± 0,087	*	-	-	-
	I _K	27,967 ± 7,995	27,530 ± 5,714	*	-	-	-
Praia do Naufrágio (CE) (03°23'50.5"S 39°00'38.8"W)	ETR _{max}	-	-	-	1,097 ± 0,327	0,972 ± 0,246	1,321 ± 0,572
	αETR	-	-	-	0,034 ± 0,014	0,042 ± 0,007	0,039 ± 0,006
	ΔF/F _{m'}	-	-	-	0,386 ± 0,135	0,455 ± 0,073	0,433 ± 0,046

	I_K	-	-	-	$37,241 \pm 15,649$ c	$22,851 \pm 4,912$	$36,001 \pm 23,509$
Praia do Emissário (BA) (12°44'28.0"S 38°09'01.0"W)	ETR_{max}	$1,798 \pm 0,397$	$1,963 \pm 0,412$	$1,952 \pm 0,393$	*	$3,749 \pm 0,793$ abc	$2,281 \pm 0,570$
	αETR	$0,027 \pm 0,007$	$0,021 \pm 0,005$ c	$0,024 \pm 0,007$	*	$0,016 \pm 0,002$ b	$0,032 \pm 0,021$
	$\Delta F/F_{m'}$	$0,463 \pm 0,026$	$0,423 \pm 0,048$	$0,468 \pm 0,044$	*	$0,460 \pm 0,030$	$0,552 \pm 0,095$
	I_K	$76,248 \pm 50,721$	$96,368 \pm 31,208$ b	$92,027 \pm 58,110$	*	$236,715 \pm 59,909$ abc	$114,761 \pm 89,764$
Praia de Muro Alto (PE) (08°26'13.1"S 34°58'47.1"W)	ETR_{max}	$4,441 \pm 1,825$ bc	$2,733 \pm 0,688$ c	$3,578 \pm 3,019$ b	-	-	-
	αETR	$0,020 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,007$	$0,024 \pm 0,012$	-	-	-
	$\Delta F/F_{m'}$	$0,502 \pm 0,061$	$0,588 \pm 0,030$ b	$0,473 \pm 0,136$	-	-	-
	I_K	$226,333 \pm 100,360$ b	$116,079 \pm 81,699$ b	$154,583 \pm 63,364$ b	-	-	-
Praia de Boa Viagem (PE) (08°07'58.9"S 34°53'57.6"W)	ETR_{max}	-	-	-	$1,692 \pm 0,236$	$1,503 \pm 0,351$ b	$1,953 \pm 0,335$ a
	αETR	-	-	-	$0,017 \pm 0,008$	$0,028 \pm 0,008$	$0,018 \pm 0,009$
	$\Delta F/F_{m'}$	-	-	-	$0,478 \pm 0,055$	$0,523 \pm 0,024$ b	$0,483 \pm 0,043$
	I_K	-	-	-	$114,836 \pm 50,302$	$64,852 \pm 49,153$	$131,122 \pm 72,157$
Praia de Parati (ES) (20°48'31.0"S 40°36'39.0"W)	ETR_{max}	-	-	-	$0,983 \pm 0,228$	$0,884 \pm 0,170$	$1,151 \pm 0,236$
	αETR	-	-	-	$0,026 \pm 0,011$	$0,023 \pm 0,011$ b	$0,025 \pm 0,012$
	$\Delta F/F_{m'}$	-	-	-	$0,541 \pm 0,016$	$0,528 \pm 0,015$ b	$0,540 \pm 0,035$
	I_K	-	-	-	$45,662 \pm 27,880$	$54,751 \pm 46,312$	$55,518 \pm 27,167$
Praia das Cigarras (23°55'01.0"S 46°19'16.8"W)	ETR_{max}	-	-	-	$1,919 \pm 0,433$	$1,890 \pm 0,285$ b	$1,980 \pm 0,281$
	αETR	-	-	-	$0,013 \pm 0,008$	$0,030 \pm 0,012$ a	$0,019 \pm 0,011$
	$\Delta F/F_{m'}$	-	-	-	$0,575 \pm 0,056$	$0,590 \pm 0,027$ b	$0,610 \pm 0,021$
	I_K	-	-	-	$172,097 \pm 69,052$	$80,397 \pm 57,216$ a	$123,712 \pm 49,380$

* Ausência de dados.

a $p < 0,05$ comparando-se os diferentes estádios reprodutivos.

b $p < 0,05$ comparando-se as diferentes populações.

c $p < 0,05$ comparando-se ambas as espécies.

Tabela 4. Valores obtidos na literatura para diferentes espécies de *Gracilaria*, considerando-se os diferentes parâmetros da fotossíntese. ETR_{max}: fotossíntese máxima. I_k: índice de saturação luminosa. αETR: eficiência fotossintetizante. ΔF/F_m': rendimento quântico efetivo.

Espécies	αETR	ETR _{max}	ΔF/F _m '	I _k	Referência
<i>Gracilaria birdiae</i>	0,0018 ± 0,005	0,36 ± 0,03	*	198	Ursi <i>et al.</i> , 2003
<i>G. birdiae</i>	0,18 ± 0,01	27,6 ± 1,8	0,47 ± 0,06	156,6 ± 14,4	Donato, 2005
<i>G. changii</i>	0,0006 a 0,001	0,23 a 0,28	*	216 a 491	Phooprong <i>et al.</i> , 2006
<i>G. chilensis</i>	0,062 ± 0,015	7,25 ± 0,60	*	87,92 ± 31,08	Gómez <i>et al.</i> , 2005
<i>G. cornea</i>	0,03 a 0,05	3,6 a 4,3	*	90 a 127	Dawes <i>et al.</i> , 1999
<i>G. cornea</i>	0,05 a 0,12	*	*	72 a 155	Orduña-Rojas <i>et al.</i> , 2002
<i>G. domingensis</i>	0,19 ± 0,03	42 ± 4	*	219 ± 25	Andersson <i>et al.</i> , 2006
<i>G. firma</i>	0,0007 a 0,0009	0,24 a 0,30	*	242 a 497	Phooprong <i>et al.</i> , 2006
<i>G. parvispora</i>	0,12 a 0,15	6,0 a 18,8	*	60 a 171	Orduña-Rojas <i>et al.</i> , 2013
<i>G. salicornia</i>	0,0008 a 0,001	0,14 a 0,32	*	150 a 427	Phooprong <i>et al.</i> , 2006
<i>G. salicornia</i>	0,018 a 0,057	2,6 a 19,6	*	144 a 557	Phooprong <i>et al.</i> , 2007
<i>G. tenuistipitata</i>	0,023 a 0,055	2,86 a 5,44	*	*	Barufi <i>et al.</i> , 2011
<i>G. vermiculophylla</i>	0,012 a 0,042	0,8 a 15,1	*	46 a 536	Phooprong <i>et al.</i> , 2008
<i>G. vermiculophylla</i>	*	0,8 a 7,2	*	*	Nejrup <i>et al.</i> , 2013
<i>G. verrucosa</i>	0,018 a 0,027	7,92 à fotoinibição	*	*	Menéndez <i>et al.</i> , 2001

* Ausência de dados.

Capítulo 4 - Development and characterization of microsatellite markers in *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) using 454 sequencing data*

L.M. Ayres-Ostrock ^a, S. Mauger ^{b, c}, E.M. Plastino ^a, M.C. Oliveira ^a, M. Valero ^{b, c}, C. Destombe ^{b, c}

^a Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, CEP: 05508-090. São Paulo, SP, Brazil.

^b Université Pierre et Marie Curie, UPMC, UMI 3614, Evolutionary Biology and Ecology of Algae, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

^c Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, UMI 3614, Evolutionary Biology and Ecology of Algae, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29688 Roscoff, France.

*Submitted to the Journal of Applied Phycology (November, 2014)

1. Resumo

A exploração das algas devido à demanda global por ficocolóides tem afetado a sustentabilidade destes recursos marinhos. No Brasil, a exploração comercial de *Gracilaria* spp. teve início na década de 1960, e rapidamente tornou-se claro que a coleta intensiva e descontrolada dos bancos naturais levou a uma diminuição significativa das populações nativas. *Gracilaria birdiae* Plastino e E. C. Oliveira e *G. caudata* J. Agardh são importantes fontes de ágar no Brasil. Visando avaliar a diversidade genética destas espécies, sete marcadores tipo microssatélites foram desenvolvidos para *G. birdiae* e 12 para *G. caudata* a partir de populações do Estado do Ceará. Um maior número de alelos foi observado em *G. birdiae*, quando comparada a *G. caudata*. Além disso, cinco loci de microssatélites amplificaram em ambas as espécies, no entanto, foram observadas diferenças no tamanho e número de alelos de acordo com a espécie. Os subconjuntos de quatro loci diagnósticos identificados para *G. birdiae* e 8 para *G. caudata*, são superiores ao que foi previamente retalado para outras espécies de *Gracilaria*. Em *G. caudata* existem fortes evidências da predominância da reprodução assexuada como o excesso de heterozigotos, embora não tenham sido observados genótipos multilocus repetidos (MLGs). No entanto, em *G. birdiae* a ausência do desequilíbrio de ligação, o excesso de homozigotos, e também a ausência de MLGs repetidos, sugerem a prevalência da reprodução sexuada. A elevada proporção de possíveis alelos nulos encontrados em *G. birdiae* podem influenciar a estimativa do excesso de homozigotos. A diversidade genética observada para *G. birdiae* (0,43) e *G. caudata* (0,42) foi semelhante aos valores encontrados para outras espécies de *Gracilaria*.

2. Abstract

The two species *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C.Oliveira and *G. caudata* J.Agardh are the most important natural sources of agar in Brazil. Using the 454 sequencing system, we identified 464 and 487 perfect microsatellite loci in 6,908 and 9,602 sequences/contigs from *G. birdiae* and *G. caudata*, respectively. After a conservative removal of potentially problematic loci, 144 loci were tested (72 from each species). A total of 25 polymorphic microsatellite loci were defined (13 loci for *G. birdiae* and 17 loci for *G. caudata*, including five loci common to both species). The five microsatellite loci that cross-amplified in both species showed species-specific differences in allele size. Polymorphic microsatellite loci were used to assess the genetic diversity of both species in their main harvest and cultivation areas on the Brazilian coast. Gene diversity was similar in *G. birdiae* and *G. caudata*. However, significant heterozygote deficiency was observed in *G. birdiae*, whereas heterozygote excess occurred in *G. caudata*, suggesting that these two related species differ in their mating system. These results also raised new questions on their biology in the field and on their patterns of genetic structure across their geographical ranges. In addition, the 20 loci developed in this study proved successful in identifying each individual in the field as a unique multilocus genotype, and will be useful for studying lineage sorting, breeding programs or conservation issues.

Keywords microsatellite, NGS, cross-amplification, diagnostic loci, seaweed, conservation

3. Introduction

Microsatellite markers are short tandem repeats (STRs) of 2-6 nucleotide motifs randomly distributed throughout the genome; they are highly polymorphic due to their high mutation rate (Tautz and Schlötterer 1994; Jarne and Lagoda 1996). Given their high level of variability, single-locus inheritance, and codominance, microsatellite markers are used for parentage analyses (Avisé 2004; Pemberton 2009) and genetic mapping (Jarne and Lagoda 1996; Röder et al. 1998). In red algae, microsatellite markers have been used to retrace paternity in intertidal rocky shores in *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham (Engel et al. 1999) and in *Chondrus crispus* Stackhouse (Krueger-Hadfield et al. 2015). These markers are also efficient for describing intraspecific genetic diversity, and are used to estimate population size or connectivity for conservation genetics purposes (for review see Sunnucks 2000). For example, microsatellites have been used to assess the effects of domestication and human activities on the genetic diversity of the cultivated *G. chilensis* C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira, revealing that the reduction in genetic diversity is driving this species to extinction (Guillemin et al. 2008; Guillemin et al. 2014). In *Asparagopsis armata* Harvey, STRs have been used to evaluate the genetic similarities of populations from the Mediterranean, Hawaii, and California (Andreakis et al. 2007). In *Furcellaria lumbricalis* (Hudson) J.V. Lamouroux, neutral and EST-derived microsatellite markers have been developed to examine the genetic structure of northern European populations inhabiting different salinity conditions (Kostamo et al. 2012).

The need for *de novo* development using costly and time-consuming methods, as well as the low success rate of cross-species transfer, have been a major obstacle to the application of these markers in poorly studied taxonomic groups (Squirrell et al. 2003). Moreover, cross-amplified markers often show lower allelic diversity and higher frequency of null alleles than in the source species (Selkoe and Toonen 2006). With the advent of next-generation sequencing (NGS) technologies, the identification and characterization of microsatellites in non-model species have become more feasible. In red algae, polymorphic microsatellite markers have been reported for only 16 species from seven orders (Pardo et al. 2014), including only three species of *Gracilaria*: *G. changii* (B.M.Xia & I.A.Abbott) I.A.Abbott, J.Zhang & B.M.Xia (Song et al. 2013), *G. chilensis* (Guillemin et al. 2005), and *G. gracilis* (Wattier et al. 1997; Luo et al. 1999; Song et al. 2013).

Gracilaria birdiae Plastino and E.C. Oliveira and *G. caudata* J. Agardh are important sources of agar in Brazil (Plastino and Oliveira 2002). The commercial

exploitation of *Gracilaria* spp. in Brazil began in the 1960s, with the direct harvesting of seaweeds in natural beds (Câmara-Neto 1987). However, in the 1970s, it became clear that intensive and uncontrolled exploitation of natural beds was leading to a significant decline of native populations (Hayashi et al. 2014). Hence, the cultivation of selected agarophyte species was proposed (Oliveira 1984). Today, artisanal mariculture of *G. birdiae* and *G. caudata* in the Northeast State of Ceará, Brazil offers an important source of income for the local fishing community (Araujo and Rodrigues 2011; Costa et al. 2011).

In the present study, we report the development of microsatellite markers in the *G. birdiae* and *G. caudata*. The polymorphism of these markers was assessed in the Ceará region of northeastern Brazil, where both species are probably highly affected by human activities.

4. Materials and methods

Data pre-processing and microsatellite discovery

To develop and characterize microsatellites loci in these species, we employed the 454 pyrosequencing system (Roche, Basel Switzerland) (Margulies et al. 2005). Genomic DNA was extracted and purified from haploid individuals of *G. birdiae* from Ceará State (03°23'87"S 39°00'67"W), and of *G. caudata* from São Paulo State (23°63'87"S 45°38'33"W), using around 500 mg of dried sample. DNA extraction, library preparation, amplification, and sequencing were carried out by Ecogenics GmbH (Zürich-Schlieren, Switzerland). A sample of DNA from each species was used to prepare their respective GS-FLX Titanium general libraries (454 Life Sciences) according to the manufacturer's protocols and included quality control steps. Each DNA sample was appropriately tagged using two different multiplex identifiers (MIDs) to enable pooling for simultaneous sequencing. DNA library fragments were then captured onto beads and clonally amplified within individual emulsion droplets (emPCR). Finally, amplified fragments from both species were evenly mixed and sequenced using Titanium GS-FLX chemistry (454 Life Sciences). Each read was automatically assigned to its correct library using GS-FLX software (454 Life Sciences) based on the sample-specific MID sequence. The 454 sequencing data received was screened for SSRs using SPUTNIK (Abajian 1994). Results

were then parsed to Primer3 for locus-specific primer design (Koressaar and Remm 2007; Untergrasser et al. 2012). The resulting tab-delimited files were converted to spreadsheet files for use in Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Microsatellite frequencies for each species were expressed as the total number of identified microsatellites per million base pairs (Mbp), and subsequent data analysis included sorting according to microsatellite category (i.e., di-, tri-, tetra-, and pentanucleotides), specific motifs, and number of tandem repeated units. Moreover, PCR product size (< 400 bp) and melting temperature (T_m) of 60 °C were also considered during primer selection. Reverse-complement repeat motifs and translated or shifted motifs were grouped together so that there were 144 microsatellite loci for *G. birdiae* and *G. caudata* (72 each), with 12 dinucleotide repeats, 24 trinucleotides, 24 tetranucleotides, and 12 pentanucleotides. To increase the chance of obtaining polymorphic loci, we selected motifs with the highest number of repetitions.

Test for polymorphism and PCR amplification

A total of 144 primer pairs were designed and tested for amplification on 15 DNA samples (7 individuals of *G. birdiae* and 8 of *G. caudata*) with indirect labelling markers. A subset of the primer pairs that amplified correctly (32 pairs for each species) was tested for polymorphism on 48 individuals of both species from nine locations covering seven regions along the Brazilian coast, according to the distribution range of each species (for more details see Table 1).

PCR amplifications of the direct labeling markers were performed in 10 μ L, containing 2 μ L of template DNA diluted 1:50, 150 μ M dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 30 pmol forward fluorescent-labelled primer FAM, Yakima Yellow (VIC), ATTO550 (NED) or ATTO565(PET) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), 30 pmol reverse primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), 2.5 mM $MgCl_2$ (Promega Corp.), 1 X GoTaq® Flexi Buffer (Promega Corp.), and 0.35 U GoTaq® DNA polymerase (Promega Corp.). PCR amplifications of the indirect labeling markers using the standard M13 universal sequence were performed in 10 μ L, containing 2 μ L of DNA template diluted 1:50, 150 μ M of dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 30 pmol forward primer, 30 pmol reverse primer, 30 pmol fluorescent-labelled M13(-21) primer FAM, Yakima Yellow (VIC), ATTO550 (NED) or ATTO565(PET)

(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), 2.5 mM MgCl₂ (Promega Corp.), 1 X GoTaq® Flexi Buffer (Promega Corp.), and 0.35 U GoTaq® DNA polymerase (Promega Corp.). The 5' end of the forward primer from each pair was modified with a M13 (-21) universal sequence tag (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') to enable the incorporation of the universal fluorescent labelled M13 (-21) primer for detection on an ABI3130 XL DNA Analyzer (Life Technologies Corporation). Amplifications were carried out separately for each primer pair on a DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Corporation). For the direct labeling markers, PCR cycling consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 30 cycles: denaturation of 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, with a final extension of 72 °C for 10 min. For the indirect labeling marker cycling conditions included an initial denaturing at 95 °C for 5 min followed by 10 cycles: denaturation of 95 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s; followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 53 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, with a final extension of 72 °C for 10 min. Each microsatellite amplification was diluted with distilled H₂O (1:10), and 2 µL were mixed with 9.5 µL of Hi-Di formamide (Life Technologies Corporation) and 0.5 µL of SM594 size standard (Mauger et al. 2012).

Fragments were separated using an Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation). Genotypes were scored manually using GeneMapper® v4.0 software (Life Technologies Corporation) and microsatellite loci selected for subsequent population analyses according to their polymorphic information content (PIC), calculated with Cervus software (Marshall et al. 1998; Kalinowski et al. 2007).

Sampling and DNA extraction for population analyses

Fifty diploid individuals of *G. birdiae* and 50 of *G. caudata* were sampled in the region of Ceará (CE), northeastern Brazil, at two locations 1.45 km apart: Pedra Rachada and Naufrágio, Paracurú (Table 1). These locations were situated at about 30.97 km from the nearest cultivated farms in Trairi (CE). Samples were collected along a 20 m transect placed perpendicularly to the shoreline during low tide. Reproductive diploid individuals (tetrasporophytes) identified under stereoscopic microscope (American Optical FORTY) were selected for genotyping.

DNA was extracted and purified using the NucleoSpin® 96 Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Apical fragments of approximately 8 mg of silica-dried sample were powdered using mechanical tissue disruption with 3 mm diameter steel beads. Extraction was carried out according to the manufacturer's instructions, except for incubation in cell lysis buffer: samples were left at room temperature overnight rather than heating to 65 °C for 30 minutes. PCR amplifications and genotype scoring were carried out using the procedures described above.

Data Analyses within populations

Prior to analysis and for each species, the frequency of null alleles was estimated using MicroChecker software (van Oosterhout et al. 2004). The power of the developed markers to discriminate all the multilocus microsatellite genotypes (MLG) present in the sample was tested using the Monte Carlo procedure implemented in GenClone 2.0 (Arnaud-Haond and Belkhir 2007). Genotype diversity was calculated as $R = (G-1)/(N-1)$, where G is the number of distinct genotypes identified and N is the number of individuals (Dorken and Eckert 2001). Linkage disequilibrium was assessed using a single multilocus measurement of LD that is provided by the association index $\bar{r}_d$ (Brown et al. 1980 modified by Agapow and Burt 2001) and was computed using Multilocus ver. 1.2 (Agapow and Burt 2001). Significance tests were based on the comparisons of the observed values with those of randomized data sets generated from 1000 permutations (Burt et al. 1996). Single and multilocus estimates of gene diversity were calculated as the mean number of alleles per locus (N_a), expected heterozygosity (H_e , sensus Nei 1978) and observed heterozygosity (H_o) using GENETIX 4.05 software (Belkhir et al. 1996-2004)). Single and multilocus estimates of deviation from random mating (F_{is}) were calculated according to Weir and Cockerham (1984), and significant departure from panmixia was tested by running 1000 permutations of alleles among individuals within samples, using GENETIX 4.05 software (Belkhir et al. 1996-2004). To test for differences in gene diversity between species, one-way analyses of variance (ANOVA) were performed on N_a , H_e , H_o , and F_{is} values considering each locus as random repeat of these estimates, using Minitab® (2009).

5. Results

Development of microsatellite

In *G. birdiae* of the 14,358 reads obtained, 464 (3.2%) contained (perfect) microsatellite inserts. Of these, there were 318 microsatellite loci and they contained dinucleotide (48.7%) or trinucleotide (32.7%) motifs. The other motifs were less frequent (8.8% tetranucleotides, 9.7% pentanucleotides). Of the 318 potentially amplifiable loci, 72 primer pairs were tested and 32 were selected according to their amplification. Twenty-two primer pairs were validated on a panel of samples, i.e. produced specific PCR products of the expected size, and tested for polymorphism. Thirteen of these 22 loci (59.1%) proved to be polymorphic in populations. These loci were dominated by tetranucleotide (50%) and trinucleotide (25%) motifs followed by pentanucleotide (18.7%) and dinucleotide (6.2%) repeats.

In *G. caudata*, of the 24,757 reads obtained, 487 (1.9%) contained (perfect) microsatellite inserts. Of these, there were 403 microsatellite loci and they contained dinucleotide (43.9%) or trinucleotide (34.2%) motifs. The other motifs were less frequent (12.4% tetranucleotides and 9.4% pentanucleotides). Of the 403 potentially amplifiable loci, 72 primer pairs were tested, and 32 were selected according to their amplification. Twenty-seven primer pairs were validated on a panel of samples, i.e. produced specific PCR products of the expected size, and were tested for polymorphism. Seventeen of these 27 loci (63.0%) proved to be polymorphic in populations. These loci were dominated by tetranucleotide (39.1%) and trinucleotide (26.1%) motifs followed by dinucleotide (21.7%) and pentanucleotide (13.0%) repeats.

Overall, five microsatellite loci cross-amplified in both species, eight were diagnostic loci for *G. birdiae* and 12 for *G. caudata* (Table 2). Clear differences in allele size according to the species were found for the five loci that cross-amplified (Figure 2).

Genotypic and genetic diversity within the Ceará state

As shown above, the entire data set included 25 loci (13 loci for *G. birdiae* and 17 loci for *G. caudata*, including the 5 common loci). We characterized 107 alleles across the 13 microsatellite loci in *G. birdiae*, whereas only 69 alleles were found across the 17 loci in *G.*

caudata over the whole data set (i.e. 50 individuals sampled in the Ceará state for both species, Table 3).

The frequency of null alleles was significant for six loci in *G. birdiae* (GraB_03, GraB_05, GraB_07, GraB_08, GraBC_03, and GraBC_04) and for three loci in *G. caudata* (GraC_06, GraC_09, and GraC_11) (Table 3). These loci were therefore eliminated from subsequent analyses. The final data sets consisted of 50 individuals genotyped at 7 loci for *G. birdiae* and 50 individuals genotyped at 12 loci for *G. caudata*. The combinatory procedure implemented in GenClone 2.0 indicated that the discrimination power of our loci set was adequate in both species. In fact, even after excluding the locus suspected to harbor null alleles, a combination of all 7 loci in the case of *G. birdiae* (Figure 1a) and 10 loci in the case of *G. caudata* (Figure 1b) was enough to distinguish among all genotypes. All the individuals analyzed in both species had unique multilocus genotypes leading to a value of clonal richness (R) equal to 1.

Tests of linkage disequilibrium (LD) revealed an overall P-value of 0.391 in *G. caudata* with $\bar{r}_d$ (i.e. LD estimator) values of 0.0029. In *G. birdiae*, the $\bar{r}_d$ value of 0.0919 was significant with a P-value < 0.001.

The single and multilocus estimates of gene diversity are given in Table 3. The number of alleles per polymorphic locus (N_a) (excluding loci with null alleles) ranged for *G. birdiae* from 2 (locus GraB_02) to 15 alleles (locus GraBC_05) and for *G. caudata* from 2 (locus GraC_10) to 10 alleles (locus GraC_04). The mean N_a values were not significantly different between species (ANOVA, $F_{(1,17)} = 1.80$, $P = 0.197$), although larger in *G. birdiae* (6.86) than in *G. caudata* (4.58). The expected heterozygosity (H_e) ranged for *G. birdiae* from 0.059 (locus GraBC_02) to 0.854 (locus GraBC_05) and for *G. caudata* from 0.059 (locus GraBC_01) to 0.830 (locus GraC_04). The mean H_e values were similar between *G. birdiae* (0.435) and *G. caudata* (0.420) (ANOVA, $F_{(1,17)} = 0.02$, $P = 0.904$). The observed heterozygosity (H_o) ranged for *G. birdiae* from 0.060 (locus GraBC_02) to 0.580 (locus GraB_01) and for *G. caudata* from 0.060 (locus GraBC_01) to 0.780 (locus GraC_01). The mean H_o values were similar between *G. birdiae* (0.342) and *G. caudata* (0.460) (ANOVA, $F_{(1,17)} = 0.92$, $P = 0.350$).

F_{is} values were highly variable among loci and species. The number of significant F_{is} values per locus was higher in *G. birdiae* (9/13) than in *G. caudata* (6/15) (Table 3). Excluding loci with null alleles, the F_{is} values ranged from -0.205 (locus GraB_02) to 0.5 (locus GraBC_05) in *G. birdiae* and from -0.343 (GraC_03) to 0.112 (GraC_04) in *G.*

caudata. The mean F_{is} value was significantly higher in *G. birdiae* ($F_{is}= 0.150$, SE= 0.103) than in *G. caudata* ($F_{is}= -0.083$, SE= 0.037) (ANOVA, $F_{(1,17)}= 6.61$, $P= 0.020$).

6. Discussion

In the current study, we used 454 pyrosequencing to obtain sequence reads for microsatellite primer development in *Gracilaria birdiae* and *G. caudata*. Our newly developed microsatellite marker set is highly informative. Seven polymorphic microsatellites markers amplified in *G. birdiae* and 12 in *G. caudata*. In our results, only five loci (20%) were able to cross-amplify in both species. These results are in agreement with previous observations in the genus *Gracilaria* that demonstrated that microsatellite loci are often poorly conserved between related species (Wattier et al. 1997; Song et al. 2013).

Based on the primer pairs initially tested, the percentage of amplified markers of the expected size was similar for *G. caudata* (27/72: 37.5%) and *G. birdiae* (22/72: 30.6%), but generally lower than those reported for other organisms using the same method; ranging from 44% to 100% in plants, invertebrates, vertebrates, and fungi (for a review see Schoebel et al. 2013), and in red algae from 57.1% in *Phymatolithon calcareum* (Pallas) W.H.Adey & D.L.McKibbin (Pardo et al. 2014) to 82.6% in *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi (Couceiro et al. 2011). However, among the correctly amplified markers, the percentage of polymorphic markers in *G. birdiae* (59.1%) and *G. caudata* (63.0%) were higher than in other red algae (36.8% in *G. lanceolata* and 45.8% in *P. calcareum*). Overall, the rate of success of the current work was thus similar to other studies that employed the same technique.

Excluding loci with null alleles, 7 microsatellite loci in *G. birdiae* and 12 in *G. caudata* were used to assess population genetic diversity of both species in the Ceará region of Brazil, their main area of harvest and cultivation. The mean numbers of alleles per locus did not differ significantly between species, $N_a= 4.6$ for *G. caudate* and $N_a= 6.8$ for *G. birdiae*; and were similar to the values reported for other red algae species: $N_a= 4.4$ for *Gracilaria gracilis* (Luo et al. 1999; $N_a= 4.6$ for *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan de Saint-Léo (Andreakis et al. 2007); $N_a=5.1$ for *Grateloupia filicina* (J.V.Lamouroux) C.Agardh (Wang et al. 2013); $N_a= 6.6$ for *Furcellaria lumbricalis* (Kostamo et al. 2012),

with the exception of the Chilean populations of *Gracilaria chilensis* for which the remarkably low diversity (mean allelic richness of 0.95) is attributed to a recent genetic bottleneck due to over-exploitation of natural stocks (Guillemin et al. 2014)). Similarly, the genetic diversity observed for *G. birdiae* ($H_e = 0.43$) and *G. caudata* ($H_e = 0.42$) was similar to the values found for other *Gracilaria* species such as *G. gracilis* (from $H_e = 0.45$ to 0.52) (Luo et al. 1999; Engel et al. 2004), but greater than the over-harvested Chilean populations of *G. chilensis* ($H_e = 0.32$, Guillemin et al. 2014). A better assessment of the effect of the harvesting of natural stocks in the two Brazilian study species of *Gracilaria* requires further comparison of their genetic diversity with non-harvested natural populations along the Brazilian coast.

Our results suggest that *G. birdiae* and *G. caudata* differ in their reproductive systems and/or their population structure. The studied population of *G. birdiae* exhibited a significant heterozygote deficiency compared with Hardy-Weinberg equilibrium, whereas the population of *G. caudata* showed an excess of heterozygotes. This difference can be due to the life history of these two species. Red seaweeds typically have complex sexual haploid-diploid life cycles with the alternation of haploid (gametophytic) and diploid (tetrasporophytic) individuals. Variations in the frequencies of haploid and diploid individuals are due to the reproductive system (sexual vs. asexual) and/or to differences in fertility and survivorship (for a review see Kain and Destombe 1997). In our study, the population of *G. caudata* was composed almost entirely of tetrasporophytic (diploid) individuals (90.5%), whereas in *G. birdiae* the haploid:diploid ratio was more balanced (Ayres-Ostrock and Plastino, unpublished data). The low frequency of gametophytes (haploids) and the heterozygote excess found in *G. caudata* highly suggests that asexual reproduction occurs in this species (Guillemin et al. 2008), even though there were no repeated multilocus genotypes. In *G. birdiae*, significant heterozygote deficiency may be explained by the occurrence of null alleles, bi-parental inbreeding or by a Wahlund effect. Additional population genetic studies are needed to test these hypotheses.

In conclusion, the 7 polymorphic microsatellites markers developed for *G. birdiae* and the 12 markers developed for *G. caudata* proved reliable for population genetic studies. The study of genetic variation is the basis of any breeding or conservation program. Therefore, future studies using these polymorphic microsatellites will lead to a better understanding of the patterns of genetic diversity in *G. caudata* and *G. birdiae*, providing information on population structure and dynamics that can be useful in guiding

management strategies, as well as for the exploitation and culture of these agarophyte species in Brazil.

Acknowledgments This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP: 2010/50175-3; 2011/10189-8), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: 300148/93-3; 301491/2013-5), the program of international cooperation USP/COFECUB between the University of São Paulo and the Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil, and the International Research Network "Diversity, Evolution and Biotechnology of Marine Algae" (GDRI CNRS 0803). We are also most grateful to the Biogenouest Genomics core facility for its technical support. To Carolyn Engel-Gautier for the English review of this manuscript.

a

b

Fig. 1 Curves describing the genotypic resolution of microsatellites for all samples of (a) *G. birdiae* and (b) *G. caudata*, giving the average clonal diversity $R (\pm SE)$ for each loci. Clonal diversity estimated by $R = G - 1/N - 1$, where G is the number of genotypes and N is the sample size.

Fig. 2 Allele frequency histogram of 3 microsatellite loci that cross amplified between *G. birdiae* and *G. caudata* without null alleles. **a.** GraBC_01. **b.** GraBC_02. **c.** GraBC_05.

Table 1 Locations of *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* populations and number of individuals used in amplification (amp test) and polymorphism test (poly test).

Region (State)	Location	Coordinates		<i>G. birdiae</i>		<i>G. caudata</i>	
				amp test	poly test	amp test	poly test
Rio Grande do Norte (RN)	Rio do Fogo	05°15'41.0"S	35°23'11.0"W	2	12	2	12
Ceará (CE)	Pedra Rachada*	03°23'87.0"S	39°00'67.0"W	2	12	-	-
	Naufrágio*	03°23'50.5"S	39°00'38.8"W	-	-	1	6
Bahia (BA)	Emissário	12°44'28.0"S	38°09'01.0"W	2	12	1	6
Pernambuco (PE)	Muro Alto	08°26'13.0"S	34°58'47.0"W	1	12	-	-
	Boa Viagem	08°07'58.9"S	34°53'57.3"W	-	-	1	6
Paraíba (PB)	Carapibus	07°17'62.9"S	34°48'08.5"W	-	-	1	6
Espírito Santo (ES)	Parati	20°48'31.0"S	40°36'39.0"W	-	-	1	6
São Paulo (SP)	Cigarras	23°55'01.0"S	46°19'16.8"W	-	-	1	6
Total				7	48	8	48

*: 50 individuals from this site were sampled to assess genetic diversity.

Table 2 Characteristics of 25 polymorphic microsatellites loci (8 for *G. birdiae*, 12 for *G. caudata* and 5 common to both species): PCR conditions: annealing temperature used in PCR ($T_{\text{beginning}}^{\circ\text{C}} \downarrow T_{\text{final}}^{\circ\text{C}}$).

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	PCR conditions	Allele size range (bp)	
				<i>G. birdiae</i>	<i>G. caudata</i>
GraB_01	(ACTTC) ₄ ACTT	F: CGGAGTAGGAGCAAGGAGGT R: AGATTGGCGACGGTGAG	58 ↓ 53	(85-295)	-
GraB_02	(CACCG) ₂ CACCA (CACCG) ₁	F: TCATTGGAACTGGCAACTATG R: GTGGTGGTGTGTCTTTTCGTG	58 ↓ 53	(170-250)	-
GraB_03	(CGTTC) ₃	F: CCTCCCAGACACCATCCTAA R: CGGTTCCCGTTCCCGTTC	58 ↓ 53	(178-288)	-
GraB_04	(CAAA) ₃	F: AAGCCATCTTCGTTGTGTCTC R: GGTATTAGCGGAATCGTGG	58 ↓ 53	(100-170)	-
GraB_05	(CCA) ₃ TCA (CCA) ₆	F: CCACACGCAACAACTAAACA R: TGAGCAAGGGAAATGAGT	58 ↓ 53	(94-274)	-
GraB_06	(CCA) ₃ TCA (CCA) ₆	F: CCACACGCAACAACTAAACA R: TGAGCAAGGGAAATGAGT	58 ↓ 53	(135-218)	-
GraB_07	(TCAG) ₃ TTAG (TCAG) ₁ TCAA (TCAG) ₂	F: CTTATCCTCAACAGCAGCGAC R: ACAGGGCGTAGTGAAACAGAA	58 ↓ 53	(160-378)	-
GraB_08	(GTAG) ₅	F: GGCTTGCGGTGGGCGTAA R: TTCGCTTCGTCGCTTCTC	58 ↓ 53	(83-204)	-
GraBC_01	(ATG) ₂₁	F: TCGGTCAAAGAGAGACAAG R: CACCTCGTGTTCAGGGTCA	54	(322-355)	(232-331)
GraBC_02	(TCT) ₆	F: GACCCATTCTCTCCGTTTATG R: AGACCCGATGAAGCCAC	54	(265-274)	(264-310)
GraBC_03	(TGCG) ₂ TGCT (TGCG) ₂	F: TCAAAATGCCCTTACTGCTCTC R: CACTCTTCACCGCCTCTCTT	58 ↓ 53	(93-231)	(231)
GraBC_04	(TAAC) ₃ AAAC (TAAC) ₁	F: ACAGAACCCAACCATACTCCC R: GCAAATGACAGAGAGCGAAA	58 ↓ 53	(153-324)	(162-184)
GraBC_05	(GCAC) ₅	F: ACGCACGCAAGCACTCAC R: TTGTTCTCAAATGCCCTTACTG	58 ↓ 53	(87-272)	(232-334)
GraC_01	(AC) ₃₇	F: CACAACACACGGACGAACACTAC R: TACCTATTGCGGTTTGAGGG	58 ↓ 53	-	(122-342)
GraC_02	(ACACA) ₆ AA (ACACA) CACA (ACACA) ₂	F: ATCGCAAGGTCACTGGTTC R: TGTGTGGTGTGTTGTGTTGTG	58 ↓ 53	-	(130-260)
GraC_03	(CACG) ₇	F: GCCTCTTCTGTCTTCCAG R: CGTGTGTGTATGAGTGCGTG	54	-	(161-209)
GraC_04	(GT) ₂₃	F: CCTACGGTCAGCCACTTTCTT R: ACGACTCCTTCCATCCCTTC	58 ↓ 53	-	(178-242)
GraC_05	(TTG) ₄ TTT (TTG) ₃ T (TTG) ₄ G (TTG) ₂ T (TTG) ₆ T (TTG) ₂ G (TTG) ₄	F: TTGGACGCAGGAGGAAGTAG R: AATGACAAGCACAACTGACGG	58 ↓ 53	-	(286-293)
GraC_06	(AAC) ₆ AATA (AAC) ₅	F: ATCTGTGGGTGGAGAAGTGGT R: ATTGTGTTTGGGTGCTCGTT	58 ↓ 53	-	(204-269)
GraC_07	(GCAC) ₄	F: GCGATACAGCGACAAAGTAAA	58 ↓ 53	-	(136-158)

GraC_08	(CACG) ₄	R: GCTATGGAGACGAACACTGATG F: TGGTAATCTTGGAATCGTCATC R: ATTGAGGGTGAGAGCAGGAA	58 ↓ 53	-	(180-184)
GraC_09	(AGGA) ₄	F: AAAGAACACGAACAAGCCAAC R: TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	58 ↓ 53	-	(194-212)
GraC_10	(CGGTA) ₃ A (CGGTA) ₃	F: TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTC R: ACCGTAACCTAACCTAACC	58 ↓ 53	-	(135-140)
GraC_11	(AACCG) ₅	F: TTGCTGCTGTCGTAATCTGTC R: ACTTCTTTGTTGTGGCGGTT	58 ↓ 53	-	(272-282)

Table 3 Genetic variability within populations of *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* from the Ceará State, for 13 and 16 microsatellite loci, respectively. Null allele frequency (N_f) obtained with MICRO-CHECKER software (Oosterhout et al. 2004), locus showing significant frequency of null allele are shown in bold. Number of individual genotyped (n); number of alleles per locus (N_a); expected heterozygosity (H_e sensus Nei 1978); observed heterozygosity (H_o) (SE); standard error computed over loci. F_{is} : single locus and multilocus estimates of deviation from random mating (Weir and Cockerham 1984). F_{is} values significantly different from zero are shown in bold.

<i>G. birdiae</i>							<i>G. caudata</i>					
<i>Locus</i>	N_f	n	N_a	H_e	H_o	F_{is}	N_f	n	N_a	H_e	H_o	F_{is}
GraB_01	-0.0347	50	7	0.532	0.580	-0.091	-	-	-	-	-	-
GraB_02	-0.0486	48	2	0.295	0.354	-0.205	-	-	-	-	-	-
GraB_03*	0.2056	19	7	0.606	0.263	0.572	-	-	-	-	-	-
GraB_04	0.0336	49	3	0.099	0.061	0.385	-	-	-	-	-	-
GraB_05*	0.2222	30	12	0.552	0.200	0.642	-	-	-	-	-	-
GraB_06	0.0679	46	13	0.682	0.565	0.174	-	-	-	-	-	-
GraB_07*	0.1501	40	12	0.610	0.350	0.430	-	-	-	-	-	-
GraB_08*	0.1553	32	14	0.751	0.468	0.379	-	-	-	-	-	-
GraBC_01	0.0966	50	5	0.527	0.400	0.244	-0.0011	50	4	0.059	0.060	-0.010
GraBC_02	-0.0013	50	3	0.059	0.060	-0.014	0.001	50	5	0.203	0.200	0.016
GraBC_03**	0.3515	20	5	0.714	0.100	0.863	0	50	1	0.000	0.000	-
GraBC_04**	0.2233	28	9	0.433	0.107	0.756	-0.0311	50	3	0.472	0.500	-0.060
GraBC_05	0.2369	45	15	0.854	0.378	0.560	0.0003	50	4	0.263	0.260	0.012
GraC_01	-	-	-	-	-	-	-0.0842	50	7	0.657	0.780	-0.189
GraC_02	-	-	-	-	-	-	-0.1259	45	4	0.568	0.711	-0.256
GraC_03	-	-	-	-	-	-	-0.1424	49	4	0.579	0.776	-0.343
GraC_04	-	-	-	-	-	-	0.0321	46	10	0.783	0.696	0.112
GraC_05	-	-	-	-	-	-	-0.0407	50	4	0.582	0.640	-0.102
GraC_06*	-	-	-	-	-	-	0.1433	47	4	0.445	0.234	0.476
GraC_07	-	-	-	-	-	-	-0.0229	49	6	0.609	0.612	-0.050
GraC_08	-	-	-	-	-	-	-0.0238	50	2	0.198	0.220	-0.113

GraC_09*	-	-	-	-	-	0.0972	49	6	0.810	0.612	0.246
GraC_10	-	-	-	-	-	-0.0022	30	2	0.066	0.067	-0.018
GraC_11*	-	-	-	-	-	0.1127	48	2	0.357	0.208	0.419
Mean over loci ***		6.857	0.435	0.342	0.215°			4.583	0.420	0.460	-0.097°
(SE)***		(1.960)	(0.112)	(0.080)				(0.6454)	(0.072)	(0.080)	

* Null allele present at this locus

** Null allele present at this locus only for *G. birdiae*

*** Calculated without the locus presenting null alleles

° multilocus estimates of Fis (Weir and Cockerham 1984)

Capítulo 5 – *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): diversidade genética em populações da costa brasileira.

1. Abstract

Considering the economic importance of *G. birdiae* and *G. caudata* as the main agarophytes collected along the Brazilian coast, the current study aimed to evaluate the genetic diversity of selected populations using molecular markers, and taking into account their distribution along the Brazilian coast. This approach allows us to test the assumption of intraspecific diversity among populations along the coast, consistent with physiological changes previously observed in laboratory studies for *G. birdiae* and *G. caudata*. Four populations of *Gracilaria birdiae* (RN, CE, PE, and BA) and seven populations of *G. caudata* (RN, CE, PE, PB, BA, ES, and SP) were sampled during this work. Samples were collected using three 20 meters transects, positioned in the intertidal region perpendicular to the shore. Thirty-five individuals were sampled by transect, totaling 105 individuals per population. Only one branch was removed by individual sampled, in order to identify the reproductive stage. From the same individuals sampled for phenological studies (Chapter 2), apical segments of tetrasporophytes were selected for genetic studies. During this project, 129 sequences of *G. birdiae* and *G. caudata* were amplified for different molecular markers (*cox1*, *cox2-3*, *rbcL* and SSU). *Cox1* sequences (633 bp) were obtained for 42 samples *G. birdiae*, and only three samples of *G. caudata*, due to difficulties with the amplification. A difference of 64 bp (10.25%) was observed between *G. birdiae* and *G. caudata*, the ML analysis of these sequences resulted in different groups for each species. However, doubts related to the identification of a population of *G. caudata* from Espírito Santo State (ES) resulted in the amplification of molecular markers *rbcL* and SSU. *RbcL* (1571 bp) and SSU (1769 bp) sequences were amplified for: i, one sample of *G. birdiae* from RN; and ii, two samples of *G. caudata*, one from RN and another from ES. Divergence of 61 bp (3.88%) and 4 bp (0.2%) were observed between *G. birdiae* and *G. caudata* for the *rbcL* and SSU sequences, respectively, the ML analyzes of these sequences resulted in different groups for each species. *Cox2-3* sequences (363 bp) were obtained for 33 samples of *G. birdiae*, and 48 samples of *G. caudata*. A difference of 35 bp (8.97%) was observed between species, the ML analysis for these sequences resulted in distinct clusters for *G. birdiae* and *G. caudata*. Intraspecific variation observed in *G. birdiae* for the *cox1* sequences, 0-1 bp (0.15%), allowed the identification of three haplotypes: a predominant haplotype (H1), present in all populations; one second haplotype (H2) observed only in the BA population; and a third haplotype (H3) observed only in the RN population. In *G. caudata*, the intraspecific diversity observed only for the *cox2-3* sequences, 0-3 bp (0.82%), allowed the identification of five haplotypes. The first (H1) was present in 13 sequences: 7 RN, 4 CE, 1 PE, and 1 ES. The second haplotype (H2) was found in 18 sequences: 7 PB, 6 PE, 2 CE, 2 RN, and 1 BA. The third haplotype (H3) represents a single sequence from BA. The fourth haplotype (H4) was present in 15 sequences: 7 BA, 7 ES, and 1 PE. The

fifth (H5) represents a single sequence from SP. For the microsatellite analysis were evaluated a total of 248 samples of *G. birdiae* (71 RN, 58 CE, 52 BA, and 67 PE), and 424 of *G. caudata* (RN 52, CE 75, 83 PB, 53 PE, 56 BA, 54 ES, and 51 SP). In *G. birdiae*, repeated multilocus genotypes were found in three of the four populations evaluated (BA, CE, and PE). In *G. caudata*, this repetition was found only for the populations of BA and SP, the remaining populations presented only unique multilocus genotypes (CE, RN, PB, PE, and ES). A decrease in the mean observed heterozygosity in relation to the expected heterozygosity was observed for the BA populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, and for the CE population of *G. birdiae*. However, the diversity pattern observed for the CE population of *G. birdiae* was produced by the sampling of more than one population on the chosen location. The excess of heterozygotes observed on the PB and ES populations of *G. caudata* was initially thought as evidence of a recent genetic bottleneck. Nevertheless, further analyses failed to prove to occurrence of a recent bottleneck in all populations of *G. birdiae* and *G. caudata* evaluated in the present study. Estimates of genetic differentiation (F_{st}) in combination with the Mantel Test indicates the existence of a correlation between the genetic and geographic distances for both *G. birdiae* and *G. caudata*, however, this correlation was linear only for *G. caudata*. The Bayesian analysis performed with the Structure program demonstrated the existence of a similar structure among the populations of *G. birdiae* and *G. caudata*. The two clusters found in both species have as limit the populations of BA and PE, indicating the existence of a possible genetic barrier. These results support the hypothesis of a genetic diversity related to environmental adaptations that results also on physiological changes in both species.

2. Resumo

Considerando-se a importância econômica de *G. birdiae* e *G. caudata*, como as principais agarófitas coletadas no litoral brasileiro, e também a proximidade filogenética dessas espécies, o atual trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética por meio de marcadores moleculares, de populações selecionadas, levando-se em consideração a distribuição ao longo da costa brasileira. Essa abordagem permitiu testar o pressuposto da existência de diversidade intraespecífica entre populações distribuídas ao longo da costa, compatível às variações fisiológicas observadas previamente em estudos de laboratório realizados tanto em *G. birdiae* como em *G. caudata*. Durante a realização desse trabalho, foram amostradas quatro populações de *Gracilaria birdiae* (RN, CE, PE e BA) e sete populações de *G. caudata* (RN, CE, PE, PB, BA, ES e SP). As amostragens foram realizadas utilizando-se três transecções de 20 metros de comprimento, posicionadas na região entre-marés, de forma perpendicular à linha da costa. Trinta e cinco indivíduos foram amostrados por transecção, totalizando 105 indivíduos por população. Apenas um ramo foi removido por indivíduo amostrado, visando à identificação do estágio reprodutivo. A partir dos mesmos indivíduos amostrados para os estudos fenológicos (capítulo 2), foram selecionados ápices de indivíduos tetrasporofíticos para a amostragem destinada aos estudos genéticos. Durante a realização deste projeto, 129 sequências de *G. birdiae* e *G. caudata* foram amplificadas para diferentes marcadores moleculares (*cox1*, *cox2-3*, *rbcL* e *SSU*). Sequências de *cox1* (633 pares de base (bp)) foram obtidas para 42 amostras de *G. birdiae*, e para apenas três amostras de *G. caudata*, devido a dificuldades de amplificação. Uma divergência de 64 bp (10,25%) foi observada entre *G. birdiae* e *G. caudata*, a análise de máxima verossimilhança realizada para essas sequências resultou em agrupamentos

distintos para cada espécie. Essa divergência, superior a 30 pb, está de acordo com o que se propõe para a separação de espécies de Rhodophyta, utilizando-se o método de “DNA-barcoding”. No entanto, dúvidas relacionadas à identificação de uma população de *G. caudata* proveniente do Estado do Espírito Santo (ES) resultou na amplificação dos marcadores moleculares *rbcL* e SSU. Sequências de *rbcL* (1571 bp) e de SSU (1769 bp) foram obtidas para: i, uma amostra de *G. birdiae* da população do Estado do Rio Grande do Norte (RN); e ii, duas amostras de *G. caudata*, uma da população do RN e outra da população do Estado do Espírito Santo (ES). Divergências de 61 bp (3,88%) e 4 bp (0,2%) foram observadas entre *G. birdiae* e *G. caudata* para as sequências de *rbcL* e SSU, respectivamente, as análises de máxima verossimilhança realizadas para essas sequências resultaram em agrupamentos distintos para cada espécie. Sequências de *cox2-3* (363 bp) foram obtidas para 33 amostras de *G. birdiae*, e para 48 amostras de *G. caudata*. Uma divergência de 35 bp (8,97%) foi observada entre as espécies, a análise de máxima verossimilhança realizada para essas sequências resultou em agrupamentos distintos para *G. birdiae* e *G. caudata*. Além disso, variação intraespecífica observada em *G. birdiae* para as sequências de *cox1* de 0-1 bp (0,15%) possibilitou a identificação de 3 haplótipos: um haplótipo predominante (H1), presente em todas as populações avaliadas; um segundo haplótipo (H2) observado apenas na população da BA; e um terceiro haplótipo (H3) observado apenas na população do RN. Em *G. caudata*, a diversidade intraespecífica, observada apenas para as sequências de *cox2-3*, de 0-3 bp (0,82%), possibilitou a identificação de 5 haplótipos. O primeiro deles (H1) esteve presente em 13 sequências: 7 do RN, 4 do CE, 1 de PE e 1 do ES. O segundo haplótipo (H2) esteve presente em 18 sequências: 7 de PB, 6 de PE, 2 do CE, 2 do RN e 1 da BA. O terceiro haplótipo (H3) representou uma única sequência da BA. O quarto haplótipo (H4) esteve presente em 15 sequências: 7 da BA, 7 do ES e 1 de PE. O quinto (H5) representou uma única sequência de SP. Para a análise de microsatélites foi avaliado um total de 248 amostras de *G. birdiae* (71 do RN, 58 de CE, 52 da BA, e 67 de PE), e 424 de *G. caudata* (52 do RN, 75 do CE, 83 da PB, 53 de PE, 56 da BA, 54 do ES, e 51 de SP). Em *G. birdiae*, genótipos multilocus repetidos foram encontrados em três das quatro populações avaliadas (BA, CE e PE). Entretanto, em *G. caudata*, essa repetição foi encontrada apenas para as populações da BA e SP, sendo que as demais populações avaliadas apresentaram somente genótipos multilocus únicos (CE, RN, PB, PE e ES). Uma diminuição da heterozigosidade média observada em relação à heterozigosidade esperada, principal efeito da subdivisão populacional, foi observada para as populações de *G. birdiae* e *G. caudata* da BA e para a população de *G. birdiae* do CE. Entretanto, análises posteriores possibilitaram concluir que o padrão de diversidade observado para a população de *G. birdiae* do CE foi produzido pela amostragem de mais de uma população para o local escolhido. O excesso de heterozigotos observado de forma acentuada para as populações de *G. caudata* da PB e do ES foi inicialmente considerado como evidência de um recente efeito de gargalo ou “bottleneck”. No entanto, análises posteriores não suportaram essa hipótese. Além disso, valores de F_{is} muito distantes de zero, como os observados para a população de *G. birdiae* do CE ($F_{is}=0,176$), indicaram também a existência de um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas de diferenciação genética (F_{st}) em combinação com o Teste de Mantel indicaram a existência de uma correlação entre as distâncias genética e geográfica, tanto para *G. birdiae* como para *G. caudata*; entretanto, essa correlação mostrou-se linear apenas para *G. caudata*. A análise Bayesiana (programa Structure) demonstrou a existência de uma estruturação semelhante para as populações de *G. birdiae* e *G. caudata*. Os dois agrupamentos encontrados para ambas espécies têm como limite as populações dos Estados

da Bahia e Pernambuco, indicando a existência de uma possível barreira genética não específica. A análise de componentes principais, realizada com o programa PCAGEN, demonstrou a existência de subdivisões adicionais, tanto em *G. birdiae* como em *G. caudata*. Esses resultados corroboram a hipótese da existência de uma diversidade genética relacionada a adaptações ambientais que acabam refletindo também em alterações fisiológicas para ambas espécies.

3. Introduction

3.1. Development of molecular techniques

Molecular markers, defined as any molecular phenotype expressed from a gene or a specific segment of DNA (Avis, 2004; Ferreira & Grattapaglia, 1998), have been widely used in studies of genetic diversity. The use of these markers for these studies produced valuable information about gene flow, population structure, phylogeographic relationships, and analysis of kinship and parenthood (Feral, 2002).

The use of molecular techniques in the assessment of intraspecific diversity began in the 60s with studies on the polymorphism of isoenzymes. The analysis of enzymes presented an improvement against the cytological and morphological techniques, since these markers seem to be little influenced by the interaction with the environment, enabling a breakthrough in the understanding of micro and macro-evolutionary processes (Avis, 2004). However, doubts about the underestimation of variability, since not all the genetic mutation leads to the alteration of protein structure, in addition to technical difficulties associated with the presence of phycocolloids, especially in some brown and red algae, are some of the reasons there are few studies using isoenzymes (Sosa & Lindstrom, 1999). In red algae, one of the earliest works using isoenzymes evaluated one natural and two cultivated populations of *Porphyra yezoensis* of the coast of Japan (Gil-Kodaka *et al.*, 1988). This study observed a higher genetic diversity in the natural population compared to the farming ones, mainly due to the method of vegetative propagation used in these cultivations.

Despite the extensive use of the isoenzyme technique, studies on population structure and other intraspecific applications require reasonable levels of variability, and the results of this technique has not been variable enough for some organisms (Avis, 2004). Subsequently, the RFLP technique, or restriction fragment length polymorphism, was used to evaluate the differences in homologous DNA sequences. This technique is based on the pattern of fragments produced after the digestion of a DNA sample by a specific restriction

enzyme. Different individuals could produce fragments with different sizes. This variability is a reflection of insertions, deletions or rearrangements that may have occurred in a particular region or substitutions in the nucleotide sequence recognized by a specific restriction enzyme (Avisé, 2004). One of the first studies in macroalgae using RFLP was performed by Goff & Coleman (1988), in which it was possible to identify species of red algae such as *Gracilariopsis andersonii* among others Florideophyceae. Nevertheless, the RFLP technique was not able to identify the cellular origin of the polymorphism, which could only be determined by other molecular techniques developed later (Tell, 2004).

The development of the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) greatly increased the efficiency in detecting polymorphisms at DNA and RNA levels, by reducing the execution time, cost, and complexity of the experiments. This technique allowed the amplification in very large amounts of target DNA sequences. At first, the PCR was used together with the RFLP, in which the initial amplification was then followed by the digestion using restriction enzymes. Subsequently, the PCR enabled the development of other molecular techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD). RAPD was used to assess the intraspecific diversity of *Mazzaella laminarioides*, relating the genetic isolation to an increase in geographical distance (Faugeron *et al.*, 2001). In *Gracilaria changii*, RAPD allowed the identification of specific markers for male and female gametophytes, in addition to the separation of different reproductive stages in two populations from Malaysia (Sim *et al.*, 2007). Later, similar techniques have emerged, such as the single primer amplification reaction (SPAR), inter-simple sequence repeats (ISSR), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Tell, 2004).

3.2. The use of molecular makers in gracilarioid algae

Recently, the assessment of genetic diversity of macroalgae has increased due to advances in molecular marker technology and related equipment. In recent decades, these techniques have been used to identify different Gracilariaceae (Bellorin *et al.*, 2002, 2004, 2008; Guillermin *et al.*, 2008; Gurgel *et al.*, 2004, 2008; Destombe *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Lyra, 2014). However, most of these studies employ a limited number of markers for the chloroplast, nuclear, and mitochondrial genomes.

Among the plastid markers, the gene of the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzyme (Rubisco) (*rbcL*), and the spacer region

between the *rbcL* and *rbcS* genes were effective in separating closely related species as *Gracilariopsis mclachlanii* and *G. persica* (Bellorin *et al.*, 2008). The *rbcL* has been used in phylogenetic studies of different red algae (Freshwater *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 2012).

The nuclear ribosomal DNA (SSU and LSU) and their spacers have also been successfully used in the separation of different species of *Gracilaria* (Harper & Saunders, 2001, 2002; Bellorin *et al.*, 2002). Moreover, the molecular marker for the internal transcribed spacer region of the ribosomal genes (ITS) proved useful in identifying specimens of *G. chilensis* from populations sampled in Chile and New Zealand (Cohen *et al.*, 2004). However, this marker showed no conclusive results in distinguishing among populations of *Gracilaria tikvahiae* sampled at various points of their geographical distribution in the North Atlantic (Gurgel *et al.*, 2004).

The molecular marker for the spacer region of the mitochondrial genes for cytochrome oxidase subunits 2 and 3 (*cox2-3*) was variable in populations of *G. changii* sampled along the coast of Malaysia (Yow *et al.*, 2013), in addition to being able to distinguish between closely related species such as *G. gracilis* and *G. dura* (Destombe *et al.*, 2010).

The 5' region of the gene encoding the mitochondrial enzyme cytochrome *c* oxidase 1 (*cox1*) is known as the most suitable molecular marker proposed for the "DNA barcode". Initially employed in the identification of animal species (Herbert *et al.*, 2003a and b), this marker has been used successfully in the identification of different species of algae. It is a short fragment of DNA that can be readily amplified (approximately 650 bp), making it ideal for detecting closely related species (Robba *et al.*, 2006; Le Gall & Saunders, 2010). The *cox1* was first used in the identification of red algae by Saunders (2005), also allowing the recognition of population structure and intraspecific diversity of *Gracilaria gracilis* (Robba *et al.*, 2006). *Cox1* was also considered a suitable marker for the delineation of 41 strains of Gracilariales from the Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil (Costa *et al.*, 2012). In *G. vermiculophylla*, *cox1* revealed a high genetic diversity in populations sampled along the coast of the State of Virginia (USA) (Gulbransen *et al.*, 2012). Similar results were observed for this species using *cox1* in populations from Korea and Japan (Yang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). In *G. parvispora*, *cox1* demonstrated the existence of a greater genetic similarity between populations from Mexico and Hawaii,

compared to Korea (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2013). In *G. salicornia*, *cox1* revealed an intraspecific diversity among Southeast Asian populations (Yang *et al.*, 2013).

Microsatellites, also known as "Simple Sequence Repeats" (SSR) or "Short Tandem Repeats" (STR) (Rice & Bird, 1990), are able to determine the genetic diversity at the individual, population or species level (Wattier *et al.*, 1997). These are composed of repetitive short DNA motifs (one to ten nucleotides repeated side by side), dispersed in the genomes of eukaryotes and prokaryotes (Field & Wills, 1996; Toth *et al.*, 2000). Many microsatellites have high mutational rates (between 10^{-2} and 10^{-6} mutations per locus per generation), resulting in high levels of allelic diversity, ideal for genetic studies aimed at assessing evolutionary processes (Schlötterer, 2000). Dinucleotides, trinucleotides, and tetranucleotides repeats are preferably chosen for molecular studies. Microsatellites were able to distinguish among the different genotypes within a population of *G. gracilis* (Wattier *et al.*, 1997). In *G. changii*, microsatellites were used to differentiate among the populations sampled along the coast of Malaysia (Song *et al.*, 2013). This study was also able to identify three species of *Gracilaria*, *G. changii* from Malaysia, *G. manilaensis* from the Philippines, and *G. fisheri* from Thailand. In *G. chilensis*, microsatellites were used to compare natural and farmed populations located along the Chilean coast (Guillemin *et al.*, 2005, 2008, Engel *et al.*, 2002, 2004). A lower genetic diversity was found in these studies for the farmed populations compared to natural ones, probably due to the vegetative propagation method used in mariculture. However, in natural populations of *G. chilensis*, a gradient of diversity was found related to geographical characteristics, such as the vertical location of such populations on the substrate (Engel & Destombe, 2002; Engel *et al.*, 2004).

Gracilaria birdiae Plastino & E.C. Oliveira and *G. caudata* J. Agardh are algae typical of intertidal regions with wide distribution along the Brazilian coast, and whose populations from different latitudes are exposed to different light intensities and temperatures, among other factors. *G. birdiae* is found from the coast of Ceará State to the coast of Espírito Santo State (Plastino & Oliveira, 2002), while *G. caudata* has a wider distribution, found from the Caribbean to the coast of Santa Catarina State (Plastino & Oliveira, 1997). Such environmental changes together with the different positions that each species occupies on the shore may influence the life history of *G. birdiae* and *G. caudata*, and therefore their genetic diversity. Previous studies with both species, in which physiological characteristics were evaluated, identified geographic-related adaptations to

different light intensities, temperatures and UVB tolerance (Ursi *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014*a* and *b*).

Considering the economic importance of *G. birdiae* and *G. caudata* as the main agarophytes collected along the Brazilian coast, the current study aimed to evaluate the genetic diversity of selected populations using molecular markers, and taking into account their distribution along the Brazilian coast. This approach allows us to test the hypothesis of variations in the genetic diversity of the species along the coast, corresponding to the physiological changes observed in previous studies for both *G. birdiae* and *G. caudata* under laboratory conditions.

4. Materials and methods

4.1. Biological material

Natural populations of *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* from the States of Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Pernambuco (PE) and Bahia (BA) were evaluated. In addition, natural populations of *G. caudata* from Espírito Santo (ES), Paraíba (PB), and São Paulo (SP) States were evaluated, as presented in chapter 1 item 8.

Samples were obtained using three 20 meters transects, placed in the intertidal region during low tide. Thirty five individuals were sampled by transect totaling 105 per population. Except for the SP population of *G. caudata*, where the sampling was not done in transects. Only one branch was removed of each sampled individual, aiming to identify the reproductive stages (female gametophytes, male gametophytes, and tetrasporophytes). The female gametophyte was identified by the presence of cystocarps on the thallus. The male gametophytes and tetrasporophytes were identified under a stereoscopic microscope (American Optical FORTY) immediately after collection.

From the same individuals sampled for phenological studies (Chapter 2), apical segments of reproductive diploid individuals (tetrasporophytes) were selected for genetic studies. Branches that exhibited no morphological damage or the presence of epiphytes were cleaned with the aid of absorbent paper, placed in polypropylene falcon tubes properly labeled and stored in silica gel until DNA extraction.

4.1.1. *G. birdiae*

4.1.1.1. Plastidial, mitochondrial, and nuclear markers

Fifty tetrasporophytic individuals of *G. birdiae* sampled in each population of RN, CE, and BA, and five individuals from the PE population were selected for the amplification of *cox1*. One female gametophyte of *G. birdiae* kept in the Gracilariaceae germplasm bank and derived from algae collected in Espírito Santo State (Plastino *et al.*, 2004) was also selected for the amplification of *cox1*. In order to confirm the species, one of the RN samples was selected for the amplification of SSU and *rbcL*. The *cox2-3* spacer was amplified for 10 samples from each population: RN, CE, BA, and PE.

4.1.1.2. Microsatellite markers

For the microsatellite technique only tetrasporophytes of each population of *G. birdiae* were used: 71 from RN, 58 from CE, 52 from BA, and 67 from PE (total: 248).

4.1.2. *G. caudata*

4.1.2.1. Plastidial, mitochondrial, and nuclear markers

Five tetrasporophytes from each sampled populations of *G. caudata* (CE, RN, PB, PE, BA, ES, and SP) were selected for the amplification of *cox1*. In order to confirm the species, one of the RN and another from the ES samples were selected for the amplification of *rbcL* and SSU. The *cox2-3* spacer was also amplified for 10 samples from each population: CE, RN, PB, PE, BA, ES, and SP.

4.1.2.2. Microsatellite markers

For the microsatellite technique only tetrasporophytes of each population of *G. caudata* were used: 52 from RN, 75 from CE, 83 from PB, 53 from PE, 56 from BA, 54 from ES, and 51 from SP (total: 424).

4.2. DNA extraction

The methodology used for the DNA extraction of the samples of *G. birdiae* from the population of Rio do Fogo (RN) was based on Faugeron *et al.* (2001) with minor modifications (Ursi, 2005). Thereafter, DNA extraction for the remaining samples of *G. birdiae* and *G. caudata* were performed using the Chelex resin (Goff & Moon, 1993). All

these procedures were made in Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula”, IBUSP.

Besides the methods described above, all 248 samples of *G. birdiae* and 424 of *G. caudata* obtained during this study had their DNA extracted using the NucleoSpin® 96 Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). This procedure was performed in the laboratory of Dr. Christophe Destombe during my internship at the Station Biologique de Roscoff, France, from February 1 to April 30, 2014, for the development of microsatellites markers. This method results in extracts of superior quality necessary for the development of microsatellites (C. Destombe, personal communication).

4.2.1. DNA extraction based on Faugeron *et al.* (2001) method with minor modifications (Ursi, 2005)

DNA was extracted from 50 mg of dry weight or 250 mg fresh weight (culture). Apical fragments were powdered in microtubes (Eppendorf type) of 1000 µl using liquid nitrogen with the aid of a conical polypropylene pestle, and then kept at room temperature for 1 hour in a mixture of 800 µl of lysis buffer (1 ml TRIS 0.1 M – pH 8.0; 1 ml EDTA 0.05 M; 0.4 ml NaCl 0.2 M; 5 ml KAc 2.5 M), 100 µl of Tween 20 (10%), 16 µl of proteinase K (10 ml⁻¹), and 5 µl of RNase (10 mg/mL).

Purification was performed by adding 700 µl of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) directly in the lysis buffer. The material was homogenized for three minutes by inverting before being centrifuged at 14,000 g for 20 min at 4 °C. The aqueous phase was subjected to a second extraction by adding 500 µl of the chloroform: isoamyl alcohol solution (24:1). The material was then centrifuged at 14,000 g for 5 min at 4 °C.

The DNA was precipitated by the addition of 480 µl of isopropyl alcohol (0.6 volume) and centrifuged at 14,000 g for 30 min at 4 °C. 500 µl of ethanol 70% were added to the precipitate. The mixture was centrifuged at 14,000 g for 5 min at 4 °C. After the ethanol was discarded, the samples were dried in speed vacuum for 60 min and resuspended in 200 µl of Milli-Q water.

4.2.2. DNA extraction with the Chélex resin (Goff & Moon, 1993)

DNA was extracted from 20 mg of dry weight or 40 mg fresh weight. Apical fragments were powdered in microtubes (Eppendorf type) of 1000 µl using liquid nitrogen

with the aid of a conical polypropylene pestle. To this powder, 350 µL of Chelex 100 Resin (BIO-RAD) solution was added. These microtubes were then placed in a water bath at 90 ° C for 10 minutes. They were then transferred to room temperature for 10 minutes, and rapidly chilled in an ice bath for 10 to 15 minutes. The material was then centrifuged at 13,000 g (at 4 ° C) for 5 minutes. Only the supernatant containing the DNA was stored at - 20 ° C for further manipulations.

4.2.3. DNA extraction with the NucleoSpin® 96 Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

Apical fragments of approximately 8 mg silica dried sample were powdered using mechanical tissue disruption and 3 mm diameter steel beads, according to manufacture instruction, except for the cell lysis buffer in which samples were left at room temperature overnight rather than heating to 65°C for 30 minutes.

4.3. Agarose gel electrophoresis

An aliquot of the extraction product was subjected to electrophoresis on a 0.7% agarose gel to ascertain the quality of the extracted DNA (Sambrook *et al.*, 1989). The gel was prepared with Tris-borate-EDTA buffer (TBE: 50 mM Tris-HCl, 50 mM borate, 2 mM EDTA). The gel was loaded with DNA samples stained with 1 µl of GelRed™. The 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL - Life Technologies, Gaithersburg, Maryland) was used to determine the sizes of the amplified fragments.

4.4. PCR reactions

PCR amplifications (Sambrook *et al.*, 1989) were performed in 25 µl, containing 17.82 µl of autoclaved Milli-Q water, 0.18 µl of Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Invitrogen, Brazil), 0.5 µl of dNTPs (deoxynucleotide triphosphates), 2.5 µl of 10X Taq Buffer (without Mg⁺²), 1 µl of MgCl₂, 1 µl of each primer (F e R), and 1 µl of DNA template. PCR amplifications were also performed in 10 µl, containing 2.5 µl of autoclaved Milli-Q water, 0.2 µl of Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Invitrogen, Brazil), 0.5 µl of dNTPs (2',5'-deoxynucleotide triphosphates), 2 µl of 10X Taq Buffer (without Mg⁺²), 0.8 µl of MgCl₂, 1 µl of each primer (F e R), and 2 µl of DNA template. The cycles used for the amplification of the different markers are described in Table 1.

4.4.1. Plastidial marker *rbcL*

The *rbcL* amplification and sequencing were performed according to the methodology proposed by Freshwater *et al.* (1994). The *rbcL* was PCR amplified in one fragment with the primers FrbcL Start x RrbcS. Internal primers were used in the sequencing: FrbcL Start x R753, F492 x R1150, and F993 x RrbcS Start (Table 2).

4.4.2. Mitochondrial markers

4.4.2.1. *cox1*

The *cox1* amplification and sequencing were performed according to the methodology proposed by Saunders (2005). The *cox1* was PCR amplified with the primers GazF1 x GazR1, or alternatively GHaIF x GWSRx (Table 2).

4.4.2.2. *cox2-3*

The spacer region of mitochondrial genes *cox2-3* was amplified and sequenced according to the methodology proposed by Zucarello *et al.* (1999a). The *cox2-3* was PCR amplified with the primers cox2F x cox3R (Table 2).

4.4.3. Nuclear marker SSU

The nuclear SSU gene amplification and sequencing were performed according to the methodology proposed by Harper & Saunders (2001). The SSU was PCR amplified in one fragment with the primers 18S3' x 18S5'. Internal primers were used in the sequencing: 530F x 536R, and 1055F x 1055R (Table 2).

4.5. Microsatellites

The microsatellite technique was described in detail in Chapter 4.

4.6. Purification of the PCR product

PCR samples were purified on “illustra™ GFX™ MicroSpin™” columns from “illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. After purification, the PCR products were applied to agarose gel as described in item 4.3.

4.7. DNA quantification

A “Thermo Scientific NanoDrop TM” spectrophotometer was used to determine the amount of DNA (ng) per µl. The instrument calibration was performed using 1 µl of elution buffer type 4 (“TM illustra GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification Kit” - GE Healthcare). Readings were performed by replacing the standard DNA by the DNA to be analyzed.

4.8. Sequencing

The sequencing reactions were performed using the “BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing” kit. To this kit were added specific primers for each marker, and the purified PCR product. Sequencing was performed on a 3730 DNA Analyzer automatic sequencer, or a 3130xL Genetic Analyzer sequencer (Life Technologies).

4.9. Assembly and analysis of the sequences for plastidial, mitochondrial, and nuclear markers

The sequences obtained, both forward (F) and reverse (R) primers, were aligned with the ClustalW/Bioedit and/or Geneious programs, generating a consensus sequence for each sample (Hall, 1999). Eventually, different nucleotides were found in the same position on the sample. In such cases, the chromatograms of the sequences were analyzed to confirm the results. The consensus sequences were compared with sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST software (Altschul *et al.*, 1990).

4.10. Phylogenetic analyses

Phylogenetic trees were constructed with Maximum Likelihood (ML) algorithms (*cox1*, *cox2-3*, *rbcL*, and SSU). These trees were obtained using the MEGA 5.2.2 program. 2,000 bootstrap replicates were analyzed with heuristic searches (Felsenstein, 1985).

4.11. Analysis of population structure

Haplotype networks were constructed for the molecular markers *cox1* and *cox2-3*. These were obtained using the programs DnaSP v5.10 (Librado & Rozas, 2009) and NETWORK v4.6.1.2 (Bandelt *et al.*, 1999).

4.12. Development of *cox1* primers specific for *G. birdiae* and *G. caudata*

The difficulty in prompt identifying and differentiating the target species of this study by gross morphology, rendered necessary the development of specific "primers" for each one.

Consensus sequences obtained for the *cox1* marker of *G. birdiae* and *G. caudata* were aligned with the ClustalW/Bioedit (Hall, 1999). The analysis of these sequences allowed the selection of variable regions between the two species. These variations were positioned near the primers 3'-end.

In silico testing was performed with the PCR Primer Stats software (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) to evaluate the quality of the PCR cycling conditions and size of primers. After these procedures, primers considered suitable for the distinction of both species were selected: 314F (5'-GAAGTTGGTGTAGGAACCGGG-3') for *G. birdiae* and 70F (5'-GGTGTATGTCAATGTTGATC-3') for *G. caudata*. These specific primers were used with the regular *cox1* primers for species specific PCR amplification: 314F x GazR1 for *G. birdiae*, giving as a result a fragment of 292 bp; and 70F x GazR1 for *G. caudata*, giving as a result a fragment of 563bp. The specificity of the new primers were tested in PCR with template DNA from previously identified samples of *G. birdiae* and *G. caudata*, no cross-amplification was observed.

4.13. Microsatellites data analysis

Prior to analyses and for each species (*G. birdiae* and *G. caudata*), the frequency of null alleles was estimated using MICRO-CHECKER software (Oosterhout *et al.*, 2004). The power of the developed markers to discriminate all the multilocus microsatellite genotypes (MLG) present in the sample was tested using the Monte Carlo procedure implemented in GenClone 2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007). Genotype diversity was calculated as $R = (G-1)/(N-1)$, where G is the number of distinct genotypes identified and N is the number of individuals (Dorken & Eckert, 2001).

Linkage disequilibrium (LD) was assessed using a single multilocus measurement of LD that is provided by the association index $\bar{r}_d$ (Brown *et al.*, 1980, modified by Agapow & Burt, 2001) and was computed using MULTILOCUS v1.2 (Agapow & Burt,

2001). Significance tests were based on the comparisons of the observed value to those of randomized data sets generated from 1,000 permutations (Burt *et al.*, 1996).

Single and Multilocus estimates of gene diversity were calculated as mean number of alleles per locus (N_a), as expected heterozygosity (H_e , *sensus* Nei, 1978), and observed heterozygosity (H_o) using GENETIX 4.05 software (Belkhir *et al.*, 1996-2004)). Single and multilocus estimates of deviation from random mating (F_{is}) were calculated according to Weir and Cockerham (1984) and significant departure from panmixia was tested by running 1,000 permutations of alleles among individuals within samples using GENETIX 4.05 software (Belkhir *et al.*, 1996-2004).

GENETIX 4.05 software was also used to calculate the genetic differentiation (F_{st}) between populations, and the Mantel test, used to evaluate the existence of a correlation between genetic and geographic distances. The possibility that these populations underwent a recent bottleneck event was evaluated using the BOTTLENECK software v1.2.02 (Piry *et al.*, 1999).

The Bayesian clustering method as implemented in STRUCTURE v2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000) was used to determine the existence of genetic groups within the populations of *G. birdiae* and *G. caudata*. This program's approach aimed at maximizing Hardy-Weinberg Equilibrium in a given group to infer the genetic structure of outcrossing populations, categorizing them into K subpopulations (Pritchard *et al.*, 2000). K was determined by the method developed by Evanno *et al.* (2005). The PCAGEN v1.2.1 program (Goudet, 1999) was used to investigate the spatial pattern of genetic variation based on F_{st} values.

5. Results

5.1. Plastidial, mitochondrial, and nuclear molecular markers

One hundred and twenty nine sequences of different molecular markers were obtained during this project for *G. birdiae* and *G. caudata*. Among all populations evaluated of *G. birdiae* (CE, RN, PE, and BA) and *G. caudata* (CE, RN, PB, PE, BA, ES, and SP), only the population of ES presented doubts on identification by macroscopic characteristics of the thallus, requiring the amplification of SSU and *rbcL* markers. Those doubts have arisen by an inability to find populations of *G. birdiae* in this location as

previously stated by other studies. Specimens sampled recently in the City of Fundão, Espírito Santo State (ES), during a new collection effort undertaken in hopes of finding populations of *G. birdiae* in this region, were identified as *G. caudata*, and populations of *G. birdiae* were not found.

5.1.1. Plastidial marker *rbcL*

RbcL sequences with 1571 base pairs (bp) were successfully amplified for one sample of *G. birdiae* from RN; and two samples of *G. caudata*, one from RN and another from ES. A difference of 61 bp (3.88%) was found between *G. birdiae* and *G. caudata*; the ML analysis performed for these sequences resulted in distinct grouping for each species (Figure 1). For a more robust validation of the data, *rbcL* sequences of *G. birdiae* (RN) BRA18 and *G. caudata* (SP) BRA05, both provided by M.C. Oliveira, were included in this analysis.

Figure 1. Phylogenetic trees constructed with Maximum-Likelihood (ML) analysis for the *cox1*, *rbcL*, and SSU markers, showing the groupings for *G. birdiae* (Rio do Fogo (RN), Paracurú (CE), Arembepe (BA), Ipojuca (PE), and one from a female gametophyte kept in the Gracilariaceae germplasm bank and derived from algae collected in Espírito Santo State (VMES)), and *G. caudata* (Rio do Fogo (RN) and Anchieta (ES)). The different bootstrap values are plotted on the branches. BRA18 (RN) and BRA05 (SP) were provided by M.C. Oliveira. The sequences obtained from GenBank are identified by their accession number.

5.1.2. Mitochondrial markers

5.1.2.1. *cox1*

Cox1 sequences (633 bp) were successfully amplified for 42 samples of *G. birdiae*: 27 samples from RN, five from CE, five from BA, four from PE, and one from a female gametophyte of *G. birdiae* kept in the Gracilariaceae germplasm bank and derived from algae collected in ES (Plastino *et al.*, 2004). *Cox1* sequences were also successfully amplified for three samples of *G. caudata*: one from RN, and two from ES.

A difference of 64 bp (10.25%) was found between *G. birdiae* and *G. caudata*; the ML analysis performed for these sequences resulted in distinct grouping for each species (Figure 1). For a more robust validation of the data, *cox1* sequences of *G. birdiae* (RN) BRA18 and *G. caudata* (SP) BRA05, both provided by M.C. Oliveira, were included in this analysis.

The intraspecific variation found in *G. birdiae* for the *cox1* marker of 0-1 bp (0.15%) allowed the identification of three geographically related haplotypes: a predominant haplotype (H1), which appears in all populations analyzed; another exclusive for the population of Areembepe (BA) (H2); and another exclusive from the population of Rio do Fogo (RN) (H3) (Figure 2). H1 diverged from H2 and H3 by one mutational step each. A fourth haplotype (H4) was formed by the *cox1* sequences of *G. birdiae* (RN) BRA18 provided by M.C. Oliveira. H1 diverged from H4 by three mutational steps. In *G. caudata*, no intraspecific variation was found in the *cox1* sequences.

Figura 2. Haplotype network for the *cox1* sequences of *G. birdiae* constructed with individuals from different localities: Paracurú (CE), Rio do Fogo (RN), Ipojuca (PE), and Arembepe (BA). The size of the circle indicates the number of individuals with that haplotype. The first haplotype (H1) is formed by 40 sequences: 26 from RN, 5 from CE, 4 from PE, 4 from BA, and one from a female gametophyte kept in the Gracilariaceae germplasm bank and derived from algae collected in Espírito Santo State. The second haplotype (H2) is formed by one sequence from BA. The third haplotype (H3) is formed by one sequence from RN. The fourth haplotype (H4) is formed by one sequence provided by M.C. Oliveira (from RN State). Lines connect each haplotype to its most similar relative. Bars represent mutational steps between haplotypes. Constructed with the software NETWORK v4.6.1.2 (Bandelt *et al.*, 1999).

5.1.2.2. *cox2-3*

Cox2-3 sequences (363 bp) were successfully amplified for 33 samples of *G. birdiae*: 10 samples from RN, 7 from CE, 8 from PE, and 8 from BA. The total number of successful amplifications for *G. caudata* was 48: 9 samples from RN, 6 from CE, 7 from PB, 8 from PE, 9 from BA, 8 from ES, and 1 from SP. A difference of 35 bp (9.64%) was found between *G. birdiae* and *G. caudata*; the ML analysis performed for these sequences resulted in distinct grouping for each species. For a more robust validation of the data, were included in this analysis *cox2-3* sequences of *G. articulata*, *G. gracilis*, *G. conferta*, *G. vermiculophylla*, and *G. chilensis*, obtained from GenBank (Figure 3).

In *G. birdiae*, no intraspecific variation was observed considering the *cox2-3* sequences. Nevertheless, in *G. caudata*, the intraspecific variation found for the *cox2-3* spacer of 0-3 bp (0.82%) allowed the identification of five haplotypes, somewhat geographically related (Figure 3). The first haplotype (H1) was formed by 13 sequences: 7 from RN, 4 from CE, one from PE, and one from ES. H1 diverged from the second haplotype by one mutational step. The second haplotype (H2) was formed by 18 sequences: 7 from PB, 6 from PE, 2 from CE, 2 from RN, and one from BA. H1 diverged from the third haplotype also by one mutational step. The third haplotype (H3) was formed by one sequence from BA. H3 diverged from the fourth haplotype by one mutational step. The fourth haplotype (H4) was formed by 15 sequences: 7 from BA, 7 from ES, and one from PE. H4 diverged from the fifth haplotype by one mutational step. The fifth haplotype (H5) was formed by one sequence from SP (Figure 4).

Figure 3. Phylogenetic tree constructed with Maximum-Likelihood (ML) analysis for the *cox2-3* sequences showing the grouping for *G. birdiae* (Rio do Fogo (RN), Paracurú (CE), Arembepe (BA), and Ipojuca (PE)), and *G. caudata* (Rio do Fogo (RN) and Anchieta (ES)). The different bootstrap values are plotted on the branches. The sequences obtained from GenBank are identified by their accession number.

Figure 4. Haplotype network for the *cox2-3* spacer sequences of *G. caudata* constructed with individuals from different localities. The size of the circle indicates the number of individuals with that haplotype. The colour represents the different localities: cities of Paracurú (CE), Rio do Fogo (RN), Ipojuca (PE), Conde (PB), Arembepe (BA), Anchieta (ES), and São Sebastião (SP). The first haplotype (H1) is formed by 13 sequences: 7 from RN, 4 from CE, one from PE, and one from ES. The second haplotype (H2) is formed by 18 sequences: 7 from PB, 6 from PE, 2 from CE, 2 from RN, and one from BA. The third haplotype (H3) is formed by one sequence from BA. The fourth haplotype (H4) is formed by 15 sequences: 7 from BA, 7 from ES, and one from PE. The fifth haplotype (H5) is formed by one sequence from SP. Lines connect each haplotype to its most similar relative. Bars represent mutational steps between haplotypes. Constructed with the software NETWORK v4.6.1.2 (Bandelt *et al.*, 1999).

5.1.3. Nuclear marker SSU

SSU sequences (with 1769 bp) were successfully amplified for one sample of *G. birdiae* from RN and two samples of *G. caudata*, one from RN and another from ES.

A difference of 4 bp (0.2%) was found between *G. birdiae* and *G. caudata*; the ML analysis performed for these sequences resulted in distinct grouping for each species (Figure 1). For a more robust validation of the data were included two sequences in this analysis: *Gracilaria* sp. and *G. caudata*, obtained from GenBank (Figure 1).

5.1.4. Development of *cox1* primers specific for *G. birdiae* and *G. caudata*

Primers were developed for the *cox1* marker capable of distinguishing between *G. birdiae* (314F) and *G. caudata* (70F) after PCR, without being necessary to completion of the sequencing reactions (Figure 5). These markers were used to confirm the identification of specimens sampled recently in the City of Fundão, ES, during a new collection effort undertaken in hopes of finding populations of *G. birdiae* in this region. These samples were identified as *G. caudata*, and populations of *G. birdiae* were not found.

Figure 5. Agarose gel showing the primers developed for distinguishing between *G. birdiae* (341F) and *G. caudata* (70F). **A.** The 70F + GazR1 combination was used, with the first 4 bands being *G. birdiae* and the second 4 *G. caudata*. **B.** The 341F + GazR1 combination was used, with the first 4 bands being *G. birdiae* and the second 4 *G. caudata*.

Table 1. PCR amplification cycles used for of the different molecular markers.

Markers	Initial denaturation	Cycle steps			Final extension	Cycles	References
		Denaturation	Annealing	Extension			
<i>cox1</i>	94°C por 4 min	94°C por 1 min	50°C por 30 seg	72°C por 1 min	72°C por 7 min	38	Saunders (2005)
<i>rbcL</i>	94°C por 4 min	94°C por 30 seg	45°C por 1 min	72°C por 2 min	72°C por 7 min	35	Freshwaters <i>et al.</i> (1994)
SSU	94°C por 4 min	94°C por 30 seg	60°C por 1 min	72°C por 2 min	72°C por 7 min	35	Harper & Saunders (2001)
<i>cox2-3</i>	94°C por 4 min	1°. 93°C por 1 min	45°C por 1 min	72°C por 1 min	-	5	Zucarello <i>et al.</i> (1999a)
		2°. 93°C por 30 seg	55°C por 30 seg	72°C por 30 seg	72°C por 5 min	30	

Table 2. Primers used in the amplification and sequencing of plastidial (*rbcL*), mitochondrial (*cox1* and *cox2-3*), and nuclear (SSU) molecular markers. R= A or G, Y= C or T, K= G or T, W= A or T, and D= A or G or T.

Marcadores	“Primers”	Sequências 5’ – 3’	Referência
<i>cox1</i>	GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	Saunders (2005)
	GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA	
	GHalF	TCAACAAATCATAAAGATATYGG	Saunders (2008)
	GWSRx	ACTTCTGGRTGICCRAARAAYCA	
<i>rbcL</i>	FrbcL Start	ATGTCTAACTCTGTAGAAG	Freshwater & Rueness (1994)
	R753*	GCTCTTTCATACATATCTTCC	
	F492*	CGTATGGATAAATTTGGTCG	
	R1150*	GCATTTGTCCGCAGTGAATACC	
	F993*	GGTACTGTTGTAGGTAAATTAGAAGG	
	RrbcS Start	GTTCTTGTGTTAATCTCAC	
SSU	18S3’	GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA	Bellorin <i>et al.</i> (2002)
	530F*	GAGGGCAAGTCTGGTG	
	536R*	GAATTACCGCGGCTGCTG	
	1055F*	GGTGGTGCATGGCCG	
	1055R*	CGGCCATGCACCACC	
	18S5’	CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	
<i>cox2-3</i>	cox2F	GTACCWTCTTTDRGRRKDAAATGTGATGC	Zucarello <i>et al.</i> (1999a)
	cox3R	GCATCTACWAGATGRAAWGGATGTC	

*internal primers used for sequencing.

5.2. Microsatellites

5.2.1. *G. birdiae*

The frequency of null alleles varied among the different populations of *G. birdiae*. The population from CE had the highest number of probable null alleles. Their frequencies ranged from 0.164 to 0.350 and included six loci: GraB_03, GraB_05, GraB_08, GraBC_03, GraBC_04, and GraBC_05. Five probable null alleles were observed in the population from PE: GraB_03, GraB_05, GraB_06, GraB_08, and GraBC_05, and their frequencies ranged from 0.109 to 0.354. The populations from RN and BA States presented four probable null alleles each. In RN, their frequencies ranged from 0.085 to 0.244, and included the loci GraB_03, GraB_05, GraB_07, and GraBC_04. In BA, their frequencies ranged from 0.117 to 0.239 and included the loci GraB_04, GraB_05, GraB_08, and GraBC_03 (Table 3). The remaining calculations were performed excluding the probable null alleles of each population.

Considering the different populations of *G. birdiae*, only the population of RN did not show repeated genotypes among 71 tetrasporophytes sampled. The population of CE presented 54 unique multilocus genotypes and two repeated genotypes, each with only one repetition. The population of BA presented 48 unique multilocus genotypes and two repeated genotypes, each with only one repetition. The population of PE presented 50 unique multilocus genotypes and 7 repeated genotypes; these ranged between one and three replicates each (Table 3). It was possible to distinguish between all the different multilocus genotypes using a minimal combination of four microsatellite molecular markers for the populations of CE, RN, and BA, and six for the RN population (Figure 6).

The analysis of clonal diversity performed on all four populations of *G. birdiae* with 8 microsatellites markers presented levels of diversity ranging from 0.18 to 0.96 for the CE population, from 0.18 to 1.0 for the RN population, from 0.12 to 0.84 for the PE population, and from 0.23 to 0.96 for the BA population (Figure 7). The efficiency of these microsatellite loci to discriminate the maximal clonal diversity available in the different populations of *G. birdiae* is given in the figure 7.

Figure 6. The lines represent the number of unique genotypes of all the samples of *G. birdiae* by sequentially adding all loci. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Arembépe, Bahia State (BA).

Figure 7. Curves describing the genotypic resolution of microsatellites for all samples of *G. birdiae* giving the average clonal diversity $R (\pm SE)$ for each loci. Clonal diversity estimated by $R = G - 1 / N - 1$, where G is the number of genotypes and N is the sample size. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Arembépe, Bahia State (BA).

Evidences of linkage disequilibrium (LD) were found for three populations of *G. birdiae*, except for the PE population, whose association index ($\bar{r}_d$) (i.e. LD estimator) was 0.010 ($p = 0.218$) (Table 4). In the BA population, $\bar{r}_d = 0.138$ and $p < 0.002$ (Table 5); CE population, $\bar{r}_d = 0.194$ and $p < 0.002$ (Table 6); and RN population, $\bar{r}_d = 0.058$ and $p < 0.002$ (Table 7).

The genetic diversity indices are given in Table 3. The expected heterozygosity (He) for the CE population was 0.397, with an allelic richness (Na) of seven alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraB_02) to 15 (GraB_06). The RN population presented $He = 0.519$ and $Na = 7.125$ alleles/locus, and the number of alleles ranged from two (GraBC_01) to 17 (GraB_08). The PE population presented $He = 0.282$ and $Na = 5.285$ alleles/locus, and the number of alleles ranged from two (GraB_01, GraB_02, and GraBC_01) to 16 (GraB_07). The BA population presented $He = 0.453$ and $Na = 6.714$

alleles/locus, and the number of alleles ranged from two (GraB_01) to 14 (GraB_06) (Table 3).

Estimates of the inbreeding coefficient (F_{is}) varied among loci for all populations of *G. birdiae*. The highest F_{is} was observed for the CE population ($F_{is}= 0.184$), followed by the BA population ($F_{is}= 0.051$). The PE and RN populations showed negative F_{is} values: -0.025 and -0.139, respectively (Table 3). Jackknife standard errors, as provided in GENETIX, was smaller for the PE population (SE= 0.005), followed by the RN (SE= 0.008), CE (SE= 0.011), and BA (SE= 0.026) populations.

Estimates of genetic differentiation (F_{st}) among populations of *G. birdiae* ranged from 0.031 (RN-CE) to 0.228 (BA-PE) (Table 8). The AMOVA results showed a significant differentiation among the four populations evaluated ($p > 0.01$). Although the Mantel test indicates the existence of a correlation between genetic and geographic distances, the Pearson correlation coefficient ($R^2= 0.002$) demonstrates that this relationship is not linear (Figure 8). Nevertheless, an analysis done to evaluate the possibility of a recent bottleneck effect (BOTTLENECK software, Piry *et al.*, 1999) indicates that these populations are under mutation-drift equilibrium. The existence of subdivided populations, or groups with different allele frequencies (the Wahlund effect) was also evaluated. An analysis considering the different transects of each sampled population indicated the existence of two groups of close related individuals in the CE population. One group, including the first transect, presented $F_{is}= 0.283$ (SE= 0.028), $H_e= 0.434$ (SE= 0.263), and $N_a= 4$ allele/locus, also $\bar{r}_d= 0.348$ and $p < 0.020$. The second group, formed by transects 2 and 3, presented $F_{is}= 0.062$ (SE= 0.094), $H_e= 0.325$ (SE= 0.247), $N_a= 3.357$ allele/locus, also no evidence of linkage disequilibrium was found in this group ($p > 0.79$).

The Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000) identified the existence of two clusters ($K= 2$) along the distribution range of *G. birdiae*: one for the populations of BA and PE, and another for RN and CE (Figure 9). $K= 2$ was the optimal value of K indicated by the Evanno method (*et al.*, 2005) (Figure 10). This structure is also observed in the principal component analysis generated by PCAGEN 1.2 and based on F_{st} values (Figure 11). According to the “broken-stick” model, there are 2 significant axes. The X axis ($F_{st}= 0.081$ and $p < 0.05$) presents a difference between the PE and the BA, CE, and RN populations. The Y axis ($F_{st}= 0.051$

and $p < 0.05$) presents a difference between the BA and the PE, CE, and RN populations (Figure 6).

Figure 8. Spatial distribution based on the Mantel test for the different populations of *G. birdiae*: City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Arembepe, Bahia State (BA). Pearson's coefficient (R^2) indicates the degree of linear correlation between genetic and geographic distances.

Figure 9. The genetic structure of *G. birdiae* using Structure v2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000). Each thin bar represents a single individual, which may be partitioned into K colours depending on the estimated multilocus membership in each K clusters, where each color represents the posterior probability of that individual belonging to a cluster. The best fitting cluster was K= 2. Green group (City of Arembepe, Bahia State (BA) and City of Ipojuca, Pernambuco State (PE)). Red group (City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN) and City of Paracurú, Ceará State (CE)).

Figure 10. Description of the steps for the graphical method allowing detection of the true number of groups K , here 2 clusters. (A) ΔK calculated as $\Delta K = \frac{\text{mean}(|L''(K)|)}{\text{sd}(L(K))}$. (B) Rate of change of the likelihood distribution (mean $\pm$ SD), over 20 runs for each K value, calculated as $L'(K) = L(K) - L(K-1)$. (C) Absolute values of the second order rate of change of the likelihood distribution (mean $\pm$ SD) calculated according to the formula: $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$. Visualized with the website Structure Harvester (Dent & vonHoldt, 2012).

Figure 11. Spatial pattern of genetic variation of the different populations of *G. birdiae* obtained with the program PCAGEN 1.2.1 (Goudet, 1999) and based on F_{st} estimates. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Areembepe, Bahia State (BA).

Table 3. Genetic variability within populations of *Gracilaria birdiae* for 13 microsatellite loci. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Arembepe, Bahia State (BA). Null allele frequency obtained with MICRO-CHECKER software (Oosterhout *et al.* 2004). Number of individual genotyped (*n*); number of alleles per locus (*Na*); expected heterozygosity (*He* sensus Nei, 1978); observed heterozygosity (*Ho*) (SE); standard error computed over loci. F_{is} : single locus and multilocus estimates of deviation from random mating (Weir & Cockerham, 1984). F_{is} values significantly different from zero are shown in bold.

<i>Locus</i>	Paracurú (CE) <i>N</i> = 58					Rio do Fogo (RN) <i>N</i> = 71					Ipojuca (PE) <i>N</i> = 67					Arembepe (BA) <i>N</i> = 52				
	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>
GraB_01	57	7	0,513	0,578	-0,119	69	3	0,540	0,869	-0,605	67	2	0,043	0,044	-0,015	49	2	0,166	0,183	-0,091
GraB_02	54	2	0,301	0,370	-0,218	70	3	0,469	0,714	-0,518	66	2	0,165	0,181	-0,092	51	6	0,484	0,588	-0,206
GraB_03	19	7	0,590	0,263	0,572*	21	7	0,700	0,285	0,608*	8	6	0,742	0,125	0,851*	43	4	0,500	0,814	-0,618
GraB_04	55	3	0,087	0,054	0,386	70	3	0,169	0,185	-0,087	65	4	0,183	0,200	-0,081	50	5	0,325	0,120	0,638*
GraB_05	32	12	0,536	0,218	0,602*	45	13	0,549	0,311	0,443*	49	15	0,535	0,367	0,323*	32	13	0,593	0,406	0,329*
GraB_06	54	15	0,678	0,500	0,272	69	12	0,585	0,623	-0,058	51	13	0,551	0,372	0,333*	50	14	0,586	0,400	0,327
GraB_07	46	14	0,598	0,347	0,428	69	21	0,837	0,681	0,194*	63	16	0,436	0,396	0,100	48	9	0,458	0,479	-0,034
GraB_08	34	15	0,760	0,470	0,394*	61	17	0,705	0,704	0,009	45	13	0,739	0,400	0,468*	40	8	0,511	0,150	0,713*
GraBC_01	56	5	0,531	0,392	0,269	70	2	0,431	0,428	0,013	67	2	0,496	0,611	-0,227	51	1	0	0	-
GraBC_02	58	3	0,067	0,069	-0,020	69	1	0	0	-	66	1	0	0	-	50	1	0	0	-
GraBC_03	21	5	0,685	0,095	0,867*	62	5	0,586	0,596	-0,009	49	6	0,565	0,551	0,036	42	9	0,627	0,381	0,403*
GraBC_04	30	9	0,426	0,133	0,696*	59	8	0,352	0,152	0,574*	58	5	0,083	0,051	0,390	43	7	0,648	0,465	0,294
GraBC_05	49	15	0,847	0,387	0,550*	70	12	0,671	0,657	0,028	51	15	0,709	0,431	0,401*	48	13	0,794	0,666	0,171
Mean over loci **		7,000	0,397	0,330	0,184°		7,125	0,519	0,597	-0,139°		5,285	0,282	0,291	-0,025°		6,717	0,453	0,435	0,051°
(SE)**		(2,035)	(0,246)	(0,200)			(2,013)	(0,168)	(0,207)			(1,886)	(0,211)	(0,230)			(1,475)	(0,162)	(0,235)	

* Null allele present at this locus

** Calculated without the locus presenting null alleles

° multilocus estimates of F_{is} (Weir and Cockerham 1984)

Table 4. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. birdiae* from the City Ipojuca, Pernambuco State (PE), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraB_01	GraB_02	GraB_04	GraB_07	GraBC_01	GraBC_03
GraB_02	0,04					
GraB_04	-0,09	0,22				
GraB_07	-0,14	-0,15	-0,13			
GraBC_01	0,08	0,01	0,04	0,10		
GraBC_03	-0,03	-0,01	0,07	0,03	0,02	
GraBC_04	0,07	0,14	0,00	0,02	-0,08	0,00

Table 5. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. birdiae* from the City of Arembepe, Bahia State (BA), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraB_01	GraB_02	GraB_03	GraB_06	GraB_07	GraBC_04
GraB_02	0,32*					
GraB_03	-0,01*	0,04				
GraB_06	-0,02*	0,04	0,29			
GraB_07	-0,08*	-0,05	0,36	0,44		
GraBC_04	-0,01*	0,00	0,31	0,23	0,19	
GraBC_05	-0,08*	0,03	0,19	0,10	0,22	0,19

*p< 0,00

Table 6. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. birdiae* from the City of Paracurú, Ceará State (CE), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraB_01	GraB_02	GraB_04	GraB_06	GraB_07	GraBC_01
GraB_02	0,35**					
GraB_04	0,48**	0,68**				
GraB_06	0,02**	0,06**	0,07			
GraB_07	0,03**	0,14**	0,03	0,01		
GraBC_01	0,14**	0,17**	0,15	0,13	0,12*	
GraBC_02	0,48**	0,51**	0,64	0,11	0,06*	0,27**

*p< 0,05

**p< 0,01

Table 7. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. birdiae* from the City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraB_01	GraB_02	GraB_04	GraB_06	GraB_08	GraBC_01	GraBC_03
GraB_02	0,16*						
GraB_04	0,20*	0,23*					
GraB_06	0,02*	0,07*	0,03				
GraB_08	0,06*	0,13*	0,11	0,54			
GraBC_01	0,01*	-0,04*	-0,01	0,01	-0,02		
GraBC_03	0,07*	0,05*	-0,03	0,09	0,07	-0,03	
GraBC_05	-0,05*	-0,04*	-0,11	0,03	0,06	-0,07	0,01

*p< 0,05

Table 8. Genetic differentiation (F_{st}) among populations of *G. birdiae*: City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE), and City of Arembepe, Bahia State (BA). Values obtained with GENETIX software (Belkhir *et al.*, 2003), by bootstrapping 5000 interactions (Weir & Cockerham, 1984).

F_{st}	CE	PE	RN
BA	0.14413	0.22848	0.17353
CE		0.18554	0.03178
PE			0.19385

5.2.2. *G. caudata*

Frequencies of null alleles varied among the different populations of *G. caudata*. The population of SP presented the highest number of probable null alleles. Their frequencies ranged from 0.040 to 0.368, and included five loci: GraC_04, GraC_06, GraC_07, GraC_09, and GraC_12. Four probable null alleles were observed for the population of PB: GraBC_02, GraBC_03, GraBC_05, and GraC_06, and their frequencies ranged from 0.023 to 0.133. The populations of CE and BA States presented three probable null alleles each. In CE, their frequencies ranged from 0.108 to 0.135, and included the loci GraC_06, GraC_09, and GraC_12. In BA, their frequencies ranged from 0.083 to 0.270, and included the loci GraC_04, GraC_11, and GraC_12. Two probable null alleles were observed for the populations of RN, PE, and ES States. In RN, their frequencies ranged from 0.105 to 0.198, and included the loci GraC_11 and GraC_09. In PE, their frequencies ranged from 0.113 to 0.195, and included the loci GraC_09 and GraC_04. In ES their frequencies ranged from 0.054 to 0.082, and included the loci GraBC_03 and GraBC_05. The remaining calculations were performed excluding the probable null alleles of each population (Table 9).

Considering the different populations of *G. caudata*, only the populations of BA and SP showed repeated genotypes. The population of the BA showed 54 unique multilocus genotypes and one genotype with a single repetition. The population of SP showed 41 unique multilocus genotypes and four repeated genotypes, these ranged between one and two repetitions. Unique multilocus genotypes were observed the following numbers: 75 in the CE, 52 in RN, 83 in PB, 53 in PE, and 54 in ES (Table 9). It was possible to distinguish between all the different multilocus genotypes using a minimal combination of three microsatellite molecular markers for the populations of CE, ES, RN, and SP, four for the BA population, and five for the populations of PB and PE (Figure 12).

The analysis of clonal diversity performed on seven populations of *G. caudata* with 14 microsatellites markers showed levels of diversity ranging from 0.20 to 1.0 for both the CE and RN populations, from 0.15 to 1.0 for the PB population, from 0.17 to 1.0 for the PE population, from 0.14 to 0.97 for the BA population, from 0.23 to 1.0 for the ES population, and from 0.20 to 0.91 for the SP population (Figure 13). The efficiency of these microsatellite loci to discriminate the maximal clonal diversity available in the different populations of *G. caudata* is given in the figure 13.

Evidences of linkage disequilibrium (LD) were found for all populations of *G. caudata*. The BA population presented $\bar{r}_d$ (i.e. LD estimator) equal to 0.093 and $p < 0.002$ (Table 10). The CE population presented $\bar{r}_d = 0.068$ and $p < 0.002$ (Table 11). The ES population presented $\bar{r}_d = 0.061$ and $p < 0.002$ (Table 12). The PB population presented $\bar{r}_d = 0.082$ and $p < 0.002$ (Table 13). The PE population presented $\bar{r}_d = 0.045$ and $p < 0.002$ (Table 14). The RN population presented $\bar{r}_d = 0.041$ and $p < 0.002$ (Table 15). The SP population presented $\bar{r}_d = 0.154$ and $p < 0.002$ (Table 16).

Figure 12. The lines represent the number of unique genotypes for all the samples of *G. caudata* by sequentially adding all loci. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB); City of Recife, Pernambuco State (PE); City of Arembepe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP).

Figure 13. Curves describing the genotypic resolution of microsatellites for all samples of *G. caudata* giving the average clonal diversity $R (\pm SE)$ for each loci. Clonal diversity estimated by $R = G - 1 / N - 1$, where G is the number of genotypes and N is the sample size. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB); City of Recife, Pernambuco State (PE); City of Arembépe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP).

The genetic diversity indices are given in Table 9. The expected heterozygosity (H_e) for the CE population was 0.386, with an allelic richness (N_a) of 4.538 alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_03 and GraC_11) to 10 (GraC_04). The RN population presented $H_e = 0.490$ and $N_a = 5.571$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_03) to 16 (GraC_04). The PB population presented $H_e = 0.498$ and $N_a = 6.454$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraC_12) to 11 (GraC_01). The PE population presented $H_e = 0.383$ and $N_a = 3.923$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_01, GraBC_03, GraBC_04, and GraC_12) to eight (GraC_03). The BA population presented $H_e = 0.320$ and $N_a = 4.071$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_03, GraBC_04, and GraC_10) to 12 (GraC_09). The ES population presented $H_e = 0.470$ and $N_a = 4.5$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_01, GraC_02, GraC_08, and GraC_10) to 10 (GraC_04). The SP population presented $H_e = 0.321$ and $N_a = 3$ alleles/locus. The number of alleles ranged from two (GraBC_01, GraBC_02, GraBC_05, GraC_02, and GraC_08) to five (GraC_01) (Table 9).

Estimates of the inbreeding coefficient (F_{is}) varied among loci for all populations of *G. caudata*. The highest F_{is} was observed for the BA population ($F_{is} = 0.064$). The remaining populations presented negative values of F_{is} : CE ($F_{is} = -0.072$), RN ($F_{is} = -0.038$), PB ($F_{is} = -0.048$), PE ($F_{is} = -0.102$), ES ($F_{is} = -0.135$), and SP ($F_{is} = -0.141$) (Table 9). Jackknife standard errors, as provided in GENETIX, was smaller for the BA population (SE= 0.000), followed by the CE (SE= 0.001), RN (SE= 0.001), PB (SE= 0.005), ES (SE= 0.005), PE (SE= 0.006), and SP (SE= 0.016) populations.

Estimates of genetic differentiation (F_{st}) among populations of *G. caudata* ranged from 0.065 (PB-PE) to 0.449 (SP-CE) (Table 17). The AMOVA results showed a significant differentiation among the seven populations evaluated ($p > 0.00$). The Mantel test indicated that there was a clear correlation between genetic and geographic distances, also supported by the Pearson correlation coefficient ($R^2 = 0.767$), which shows that this relationship is linear (Figure 14). Moreover, an analysis done to evaluate the possibility of a recent bottleneck effect (BOTTLENECK software) indicates that these populations are under mutation-drift equilibrium. The existence of subdivided populations, or groups with different allele frequencies (the Wahlund effect) was also evaluated. An analysis

considering the different transects of each sampled population failed to show the existence of subdivided groups within the population of *G. caudata*.

The Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000) identified the existence of two clusters ($K=2$) along the distribution range of *G. caudata*: one for the populations of CE, RN, PB, and PE, and another for the populations of BA, ES, and SP (Figure 15). However, it is possible to observe that some alleles are still shared among populations of PE and BA (Figure 15). $K=2$ was the optimal value of K indicated by the Evanno method (*et al.*, 2005) (Figure 16). This structure is also observed in the principal component analysis generated by PCAGEN 1.2.1 and based on the F_{st} values. According to the “broken-stick” model, there is only one significant axis. The X axis ($F_{st}=0.157$ and $p<0.00$) presents a difference between the populations of CE, RN, PB, and PE; and the populations of BA, ES, and SP. The Y axis presented $F_{st}=0.042$ and $p>0.198$ (Figure 12).

Figure 14. Spatial distribution based on the Mantel test for the different populations of *G. caudata*. Pearson’s coefficient (R^2) indicates the degree of linear correlation between genetic and geographic distances

Figure 15. The genetic structure of *G. caudata* using Structure v.2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000). Each thin bar represents a single individual, which may be partitioned into K colours depending on the estimated multilocus membership in each K clusters, where each color represents the posterior probability of that individual belonging to a cluster. The best fitting cluster for each species was $K=2$. Red group (Município de City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB) and City of Recife, Pernambuco State (PE)). Green group (City of Arembepe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP)).

Figure 16. Description of the steps for the graphical method allowing detection of the true number of groups K , here 2 clusters. (A) ΔK calculated as $\Delta K = m|L''(K)| / s[L(K)]$. (B) Rate of change of the likelihood distribution (mean $\pm$ SD), over 20 runs for each K value, calculated as $L'(K) = L(K) - L(K-1)$. (C) Absolute values of the second order rate of change of the likelihood distribution (mean $\pm$ SD) calculated according to the formula: $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$. Visualized with the website Structure Harvester (Dent & vonHoldt, 2012).

Figure 17. Spatial pattern of genetic variation of the different populations of *G. caudata* obtained with the program PCAGEN 1.2.1 (Goudet, 1999) and based on F_{st} estimates. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB); City of Recife, Pernambuco State (PE); City of Arembépe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP).

Table 9. Genetic variability within populations of *Gracilaria caudata* for 17 microsatellite loci. City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB); City of Recife, Pernambuco State (PE); City of Arembépe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP). Null allele frequency obtained with MICRO-CHECKER software (Oosterhout *et al.* 2004). Number of individual genotyped (*n*); number of alleles per locus (*Na*); expected heterozygosity (*He* sensus Nei, 1978); observed heterozygosity (*Ho*) (SE); standard error computed over loci. *F_{is}*: single locus and multilocus estimates of deviation from random mating (Weir & Cockerham, 1984). *F_{is}* values significantly different from zero are shown in bold.

Locus	n	Paracurú (CE) N = 75				n	Rio do Fogo (RN) N = 52				n	Conde (PB) N = 83				n	Recife (PE) N = 53			
		Na	He	Ho	f		Na	He	Ho	f		Na	He	Ho	f		Na	He	Ho	f
GraBC_01	72	4	0,054	0,055	-0,012	51	3	0,293	0,274	0,076	81	4	0,338	0,308	0,095	53	2	0,155	0,169	-0,083
GraBC_02	75	5	0,173	0,173	0,006	52	5	0,261	0,269	-0,021	82	3	0,036	0,012	0,665*	53	3	0,073	0,075	-0,022
GraBC_03	72	2	0,013	0,013	0	51	2	0,093	0,098	-0,042	80	3	0,037	0,012	0,665*	51	2	0,019	0,019	0
GraBC_04	72	3	0,466	0,486	-0,035	51	4	0,728	0,745	-0,013	76	3	0,527	0,552	-0,041	49	2	0,486	0,591	-0,206
GraBC_05	72	4	0,264	0,277	-0,043	51	5	0,215	0,215	0,010	78	5	0,528	0,410	0,229*	52	4	0,507	0,500	0,024
GraC_01	69	8	0,610	0,724	-0,180	46	6	0,371	0,413	-0,101	79	11	0,586	0,594	-0,008	51	7	0,412	0,490	-0,178
GraC_02	57	4	0,581	0,684	-0,168	46	5	0,682	0,804	0,167	73	8	0,375	0,342	0,096	48	3	0,294	0,354	-0,191
GraC_03	73	4	0,599	0,753	-0,250	52	7	0,583	0,807	-0,376	81	7	0,612	0,925	-0,508	51	8	0,615	0,960	-0,556
GraC_04	63	10	0,777	0,730	0,069	49	16	0,808	0,836	-0,024	83	9	0,680	0,662	0,032	48	10	0,838	0,479	0,437*
GraC_05	75	4	0,582	0,600	-0,024	48	5	0,479	0,479	0,011	83	9	0,599	0,518	0,142	53	4	0,596	0,528	0,123
GraC_06	66	4	0,402	0,212	0,479*	49	4	0,586	0,653	-0,103	83	6	0,403	0,216	0,468*	53	4	0,473	0,377	0,212
GraC_07	74	6	0,613	0,635	-0,028	50	8	0,794	0,800	0,003	81	9	0,639	0,814	-0,268	48	7	0,717	0,854	-0,181
GraC_08	72	3	0,220	0,222	-0,001	47	5	0,473	0,425	0,112	76	3	0,100	0,105	-0,043	48	1	0	0	-
GraC_09	64	6	0,812	0,609	0,257*	44	14	0,729	0,386	0,479*	34	3	0,664	0,500	0,261*	45	11	0,779	0,577	-0,269*
GraC_10	31	2	0,062	0,064	-0,017	22	5	0,474	0,318	0,350*	49	6	0,545	0,428	0,223	28	3	0,331	0,321	0,047
GraC_11	68	2	0,335	0,191	0,436*	49	3	0,489	0,367	0,260	79	2	0,482	0,531	-0,097	52	2	0,298	0,288	0,044
Mean over loci ** (SE)**		4,538 (0,637)	0,386 (0,262)	0,417 (0,288)	-0,072°		5,571 (0,906)	0,490 (0,222)	0,513 (0,255)	-0,038°		6,454 (0,918)	0,498 (0,169)	0,526 (0,231)	-0,048°		3,923 (0,582)	0,383 (0,212)	0,425 (0,275)	-0,102°

<i>Locus</i>	<i>n</i>	Arembepe (BA) N = 56				<i>n</i>	Anchieta (ES) N = 54				<i>n</i>	São Sebastião (SP) N = 51			
		<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>		<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>		<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>
GraBC_01	55	1	0	0	-	51	2	0,075	0,078	-0,031	47	2	0,021	0,021	0
GraBC_02	55	3	0,345	0,327	0,060	54	1	0	0	-	50	2	0,076	0,080	-0,032
GraBC_03	55	2	0,018	0,018	0	54	3	0,155	0,092	0,411*	49	1	0	0	-
GraBC_04	54	2	0,018	0,018	0	51	4	0,653	0,921	-0,401	48	3	0,562	0,958	-0,699
GraBC_05	54	3	0,123	0,129	-0,042	51	3	0,111	0,019	0,828*	49	2	0,078	0,040	0,487
GraC_01	53	5	0,445	0,396	0,120	51	5	0,385	0,470	-0,210	48	5	0,420	0,437	-0,029
GraC_02	51	3	0,111	0,117	-0,043	43	2	0,168	0,186	-0,091	39	2	0,355	0,461	-0,288
GraC_03	54	5	0,744	0,703	0,064	46	5	0,701	0,956	-0,354	47	4	0,602	0,595	0,022
GraC_04	54	12	0,697	0,555	0,212*	54	10	0,709	0,629	0,122	47	14	0,850	0,680	0,210*
GraC_05	56	6	0,647	0,625	0,044	51	6	0,669	0,627	0,072	49	4	0,541	0,530	0,031
GraC_06	56	5	0,505	0,464	0,091	54	5	0,710	0,944	-0,322	49	5	0,548	0,408	0,266*
GraC_07	55	5	0,604	0,618	-0,014	52	6	0,668	0,730	-0,084	47	3	0,175	0,106	0,401*
GraC_08	55	3	0,035	0,036	-0,005	50	2	0,019	0,020	0	48	2	0,020	0,020	0
GraC_09	45	12	0,692	0,577	0,176	1	1	0	0	-	9	6	0,759	0,111	0,869*
GraC_10	9	3	0,3704	0	1,000*	34	5	0,705	0,705	0,014	25	4	0,540	0,560	-0,017
GraC_11	54	2	0,499	0,222	0,561*	50	1	0	0	-	47	2	0,041	0	1,000*
Mean over loci ** (SE)**		4,071 (0,730)	0,320 (0,280)	0,303 (0,259)	0,064°		4,500 (0,680)	0,470 (0,282)	0,538 (0,343)	-0,135°		3,000 (0,365)	0,321 (0,245)	0,370 (0,317)	-0,141°

* Null allele present at this locus

** Calculated without the locus presenting null alleles

° multilocus estimates of F_{is} (Weir and Cockerham 1984)

Table 10. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Arembepe, Bahia State (BA), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_02	GraBC_03	GraBC_04	GraBC_05	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_05	GraC_06	GraC_07	GraC_08
GraBC_02	-0,07											
GraBC_03	-0,01	0,57										
GraBC_04	-0,06	0,55	0,68									
GraBC_05	-0,04	0,33	0,45	0,29								
GraC_01	0,09	0,28	0,45	0,34	0,31							
GraC_02	0,11	0,04	-0,05	-0,06	-0,01	0,03*						
GraC_03	-0,01	-0,08	-0,10	0,04	-0,06	-0,01*	-0,03					
GraC_05	0,07	-0,03	-0,08	-0,07	0,04	-0,05*	0,03	-0,04				
GraC_06	0,01	-0,05	-0,04	-0,08	0,06	0,15*	0,34	0,00	-0,01			
GraC_07	-0,02	0,14	0,51	0,48	0,28	0,24*	-0,07	-0,07	-0,05	-0,06		
GraC_08	0,04	0,12	0,17	0,16	0,08	0,10*	-0,01	0,00	-0,04	-0,02	0,11	
GraC_09	0,06	0,29	0,47	0,34	0,16	0,23*	-0,04	-0,02	-0,10	-0,07	0,42	0,13

*p< 0,05

Table 11. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Paracurú, Ceará State (CE), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_02	GraBC_03	GraBC_04	GraBC_05	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_04	GraC_05	GraC_07	GraC_08
GraBC_02	0,06											
GraBC_03	-0,05	-0,08										
GraBC_04	0,02	-0,03	0,27									
GraBC_05	-0,02	-0,05	0,39	0,32								
GraC_01	0,00	0,00	0,20	0,22	0,32							
GraC_02	0,03	0,03	0,17	0,09	0,10	0,13						
GraC_03	-0,05	-0,13	0,13	0,05	0,05	0,04	0,00					
GraC_04	-0,01	0,03	0,06	-0,02	0,02	-0,01	0,02	0,05				
GraC_05	-0,03	-0,04	-0,01	-0,04	-0,05	0,06	-0,03	0,14	0,06			
GraC_07	0,00	0,05	0,00	0,05	0,03	0,03	-0,01	-0,08	-0,08	-0,06		
GraC_08	-0,02	-0,06	0,41	0,49	0,44	0,25	0,08	0,11	0,01	0,02	-0,02	
GraC_11	1,00	0,06	-0,05	0,02	-0,02	0,00	0,03	-0,05	-0,01	-0,03	0,00	-0,02*

*p< 0,00

Table 12. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_04	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_04	GraC_05	GraC_06	GraC_07	GraC_08	Grac_10
GraBC_04	0,00										
GraC_01	0,03	0,43									
GraC_02	0,04	0,22	0,22								
GraC_03	0,03	-0,05	0,04	0,03							
GraC_04	0,01	0,21	0,06	-0,02	0,11						
GraC_05	0,00	0,01	-0,01	0,04	0,04	0,06					
GraC_06	-0,03	-0,02	0,00	-0,03	-0,06	-0,04	-0,02				
GraC_07	-0,04	-0,08	-0,06	-0,11	-0,08	-0,02	0,09	0,09			
GraC_08	-0,03	0,51	0,54	0,21	-0,03	0,17	-0,08	0,04	-0,14		
GraC_10	-0,01	0,27	0,37	0,03	-0,03	-0,03	-0,03	0,01	-0,08	0,34	
GraC_11	1,00	0,00	0,03	0,04	0,03	0,01	0,00	-0,03	-0,04	-0,03	-0,01*

*p< 0,00

Table 13. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Conde, Paraíba State (PB), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_04	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_04	GraC_05	GraC_07	GraC_08	GraC_11
GraBC_04	0,12*									
GraC_01	0,13*	0,30*								
GraC_02	0,23*	0,20*	0,17**							
GraC_03	-0,03*	0,30*	0,08**	0,06						
GraC_04	0,07*	0,00*	-0,02**	0,12	0,00					
GraC_05	0,08*	0,04*	0,05**	0,02	-0,01	-0,04				
GraC_07	-0,03*	0,02*	-0,01**	0,00	-0,05	0,02	0,07			
GraC_08	0,21*	0,46*	0,34**	0,19	0,32	0,03	-0,03	-0,04*		
GraC_11	-0,05*	-0,02*	0,01**	-0,05	0,01	0,05	0,04	0,03*	-0,02	
GraC_12	0,17*	0,22*	0,12**	0,22	0,20	0,02	-0,02	0,09*	0,25	0,03**

*p< 0,05

**p< 0,01

Table 14. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Recife, Pernambuco State (PE), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_02	GraBC_03	GraBC_04	GraBC_05	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_05	GraC_06	GraC_07	GraC_11
GraBC_02	-0,01											
GraBC_03	-0,03	-0,06										
GraBC_04	-0,03	-0,05	0,44									
GraBC_05	-0,02	-0,06	0,33	0,25								
GraC_01	-0,05	-0,10	0,23	0,22	-0,01							
GraC_02	0,01	0,09	0,13	0,16	-0,01	0,08						
GraC_03	-0,04	-0,12	-0,10	0,00	-0,04	-0,03	0,09					
GraC_05	0,09	0,01	-0,09	0,06	0,09	-0,10	0,00	0,05*				
GraC_06	-0,03	0,01	0,13	0,07	0,02	-0,05	0,03	-0,03*	0,01			
GraC_07	0,00	0,11	0,04	0,07	0,09	0,04	0,00	0,10*	0,00	-0,08		
GraC_11	1,00	-0,01	-0,03	-0,03	-0,02	-0,05	0,01	-0,04*	0,09	-0,03	0,00**	
GraC_12	-0,02	0,00	0,27	0,07	-0,01	0,11	0,09	-0,14*	-0,05	-0,09	0,04**	-0,02

*p< 0,05

**p< 0,01

Table 15. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_02	GraBC_03	GraBC_04	GraBC_05	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_04	GraC_05	GraC_06	GraC_17	GraC_08
GraBC_02	0,06												
GraBC_03	-0,06	0,38											
GraBC_04	-0,01	0,07	0,16										
GraBC_05	0,01	0,34	0,73	0,12									
GraC_01	0,17	0,10	0,09	0,14	0,06*								
GraC_02	-0,05	-0,04	0,09	0,14	0,12*	0,09							
GraC_03	-0,04	0,13	0,30	0,14	0,29*	0,16	0,21						
GraC_04	0,00	-0,04	-0,09	0,07	-0,15*	0,01	-0,06	-0,04					
GraC_05	-0,06	-0,08	-0,12	-0,09	-0,13*	-0,15	-0,09	-0,12	0,00				
GraC_06	-0,07	0,02	-0,05	-0,01	-0,05*	-0,09	0,18	0,12	0,07	0,20			
GraC_07	0,03	-0,02	-0,05	-0,05	-0,08*	-0,10	0,03	0,01	0,12	0,03	0,18		
GraC_08	0,00	0,18	0,29	0,36	0,15*	0,16	-0,09	0,02	0,07	0,06	-0,10	-0,09	
GraC_12	0,12	-0,03	-0,01	0,00	-0,04*	-0,04	-0,10	-0,03	0,05	0,00	-0,04	0,09	-0,03

*p< 0,05

Table 16. Multilocus linkage disequilibrium (rD) in the population of *G. caudata* from the City of São Sebastião, São Paulo State (SP), obtained with the software MultiLocus 1.3b (Agapow & Burt, 2000, 2001).

	GraBC_01	GraBC_02	GraBC_04	GraBC_05	GraC_01	GraC_02	GraC_03	GraC_05	GraC_08
GraBC_02	-0,09								
GraBC_04	0,70	-0,07*							
GraBC_05	0,45	0,00*	0,52*						
GraC_01	0,52	-0,03*	0,44*	0,29*					
GraC_02	0,29	-0,08*	0,25*	0,10*	0,20*				
GraC_03	0,02	0,06*	0,03*	0,16*	-0,01*	0,00			
GraC_05	-0,07	0,02*	-0,06*	-0,01*	-0,08*	-0,03	0,45		
GraC_08	0,77	-0,08*	0,71*	0,54*	0,55*	0,23	0,03	-0,07*	
GraC_11	0,03	0,03*	0,00*	0,02*	-0,04*	0,16	0,12	0,05*	0,00

*p< 0,00

Table 17. Genetic differentiation (F_{st}) among populations of *G. caudata*: City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte State (RN); City of Paracurú, Ceará State (CE); City of Conde, Paraíba State (PB); City of Ipojuca, Pernambuco State (PE); City of Arembepe, Bahia State (BA); City of Anchieta, Espírito Santo State (ES), and City of São Sebastião, São Paulo State (SP). Values obtained with GENETIX software (Belkhir et al. 2003), by bootstrapping 5000 interactions (Weir & Cockerham, 1984).

F_{st}	CE	ES	PB	PE	RN	SP
BA	0.28476	0.29656	0.27856	0.27136	0.36237	0.35392
CE		0.42617	0.15278	0.09175	0.17078	0.44909
ES			0.37281	0.41574	0.42207	0.16666
PB				0.06510	0.20725	0.36623
PE					0.19476	0.42545
RN						0.43948

6. Discussion

6.1. Plastidial, mitochondrial, and nuclear molecular markers

The use of different markers allowed us to confirm that the populations selected for this study were correctly identified as *Gracilaria birdiae* and *G. caudata*. This step was important since the species are closely related, and occasionally, it is not so easy to distinguish them in nature without an accurate analyzes of cystocarpic characteristics. The combination of multiple molecular markers in order to achieve a more precise identification of species with similar external morphology was initially proposed by Chase *et al.* (2005). Indeed, the combination of markers from the cytoplasmic and nuclear genomes has been successfully used in the identification of different macroalgae (Billard *et al.*, 2010; Tellier *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2011).

The sequencing and analysis of the chloroplast (*rbcL*) and nuclear (SSU) markers were performed for the same samples of *G. birdiae* and *G. caudata* from which *cox1* sequences were amplified. The results obtained from the comparison of these markers showed the formation of two groups: one for *G. birdiae* (RN, CE, BA and PE) and another for *G. caudata* (RN and ES). *rbcL* sequences presented a difference of 61 bp (3.88%) between the two groups, corroborating the data obtained by Gurgel & Fredericq (2004), whose interspecific divergence found in *Gracilaria sensu lato* ranged from 2.37% to 13.61%. Similar results were also observed between *Grateloupia elliptica* and *G. lanceolata*, whose interspecific divergence ranged from 3.7% to 4.6% (Yang *et al.*, 2013). The interspecific divergence of 4 bp (0.2%) found between the SSU

sequences of *G. birdiae* and *G. caudata* corroborates the data obtained by Bellorin *et al.* (2002), wherein the SSU interspecific divergence found in *Gracilaria* including *G. birdiae* (CE) and *G. caudata* (CE) ranged from 0.0% to 1.3%. Moreover, the interspecific divergence of 68 bp (10.6%) found between the *cox1* sequences of both species is in agreement with what has been proposed by Saunders (2005). He suggested that a variation of more than 30 bp is necessary for separating species of Rhodophyta using the method of “DNA barcoding”. Similar results were found among *G. incurvata*, *G. parvispora*, *G. textorii*, *G. vermiculophylla*, and *Gracilariopsis chorda* from Korea, whose interspecific divergence ranged from 9.2% to 16.1% (Kim *et al.*, 2010).

The intraspecific variation of 0-1 bp (0.15%) found among four different populations of *G. birdiae* for *cox1* allowed the identification of three geographically related haplotypes, diverging by only 1 bp or 0.15%. The predominant haplotype was found in all populations analyzed; one haplotype was exclusive of the Arembepe population (BA), and another exclusive of the Rio do Fogo population (RN). However, it should be noted that the number of sequenced individuals varied among populations (RN, 27; CE, 5; BA, 5; and PE, 4), which possibly led to an underestimation of the number of haplotypes observed. Geographic-related *cox1* haplotypes were previously observed for *G. changii* from several locations along the Malaysian coast (Yow *et al.*, 2011, 2013), *G. salicornia* from the Philippines, Malaysia, Thailand, China, and Japan (Yang *et al.*, 2013), and *G. parvispora* from Mexico, Hawaii, and Korea (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2013). In *G. vermiculophylla*, the large number of haplotypes found (19 haplotype on a global scale) was correlated to the size of the gene (Kim *et al.*, 2010), since *cox1* sequences of 1245 bp were amplified, as opposed to the 532- 710 bp usually amplified (Saunders, 2005; Robba *et al.*, 2006). The use of a short DNA fragment readily amplified and sequenced is recommended for the DNA barcoding technique, however, a larger gene may contain more information about the molecular evolution of the species (Yang *et al.*, 2008). In the current study the short fragment amplified for the gene *cox1* (633 bp) amplified for *G. birdiae*, and the lack of success in the amplification of these sequences for *G. caudata* might limit our capability of evaluating their genetic diversity based solely on this marker.

The elevated intraspecific variation found in *cox2-3* sequences of *G. caudata*, with 5 haplotypes (with a divergence of 0-3 bp) somewhat geographic-related, suggests an adaptation to local environmental conditions. These results are corroborated by the photosynthetic parameters, also evaluated in the current work (Chapter 3), where the

differences found for the maximum electron transport rate (ETR_{max}) and effective quantum yield ($\Delta F/F_m$) could also be related to specific environmental conditions. *G. caudata* has a wide distribution along the Brazilian coast, being exposed to broad spectrum of light intensities and temperatures, among other factors. Intraspecific variations in the *cox2-3* spacer were also found for *G. gracilis* and *G. dura* (4 haplotypes, with a divergence of 0-2 bp) from the North Atlantic (Destombe *et al.*, 2010), and in *G. chilensis* (five haplotypes) from Chile, Australia, and New Zealand (Cohen *et al.*, 2004). Nevertheless, in *G. vermiculophylla* no intraspecific variation was seen in the *cox2-3* spacer in samples for Europe (Rueness, 2005) and the United States of America (Thomsen *et al.*, 2005).

6.2. Microsatellites

This is the first study to assess the intraspecific genetic diversity of marine alga populations, taking into account distribution along the Brazilian coast, by using microsatellite markers. A total of 248 samples were analyzed for *Gracilaria birdiae* and 424 for *G. caudata*.

Frequencies of null alleles varied among the different populations of *G. birdiae* and *G. caudata* evaluated in this study. However, they were more frequent in the different populations of *G. birdiae*. A similar variation among populations were found in *Furcellaria lumbricalis* from northern Europe (Kostamo *et al.*, 2012). The high frequency of null alleles at a given locus indicates an excess of homozygotes, whose most common causes are preferential mating and population subdivision, the Wahlund effect (Marshall *et al.*, 1998; Hartl & Clark, 2010; Guichoux *et al.*, 2011; Garnier-Géré & Chikhi, 2013). However, it should be noted that when we consider only one population within the range of a species, inbreeding can produce a similar genotypic effect (Hartl & Clark, 2010). It was initially assumed that this was the case for populations of *G. birdiae* from CE, and of *G. caudata* from SP, which had the highest numbers of probable null alleles of both species. Additional analysis made it possible to conclude that the pattern of genetic diversity found for the CE population of *G. birdiae* was produced by the sampling design encompassing more than one population. This result was also corroborated by the elevated level of homozygotes found for this population. In *Fucus spiralis* from different populations along the coast of Maine (US), an inappropriate scale of sampling also resulted in elevated levels of homozygotes (Coleman & Brawley, 2005). Nevertheless, it was not possible to evaluate the existence

of subdivisions in the SP population of *G. caudata*, due to the fact that this sampling was not done in transects. Moreover, the excess of heterozygotes found in this population, as in most populations of *G. caudata* suggests the favoring of asexual reproduction.

Asexual reproduction, when prevalent in a population, produces genetic changes as the repetition of multilocus genotypes, linkage disequilibrium, and heterozygote excess (Guillemin *et al.*, 2008). In *G. birdiae*, repeated multilocus genotypes were found in three of the four populations evaluated (BA, CE, and PE). However, in *G. caudata*, this repetition was found only in the populations from BA and SP States. It should be noted that the BA population of *G. caudata* was restricted to a shallow puddle, rather isolated during the low tide, resulting in an environment with restrict gene flow. Moreover, the production of genetically identical carpospores in red algae could also result in repeated multilocus genotypes (Krueger-Hadfield *et al.*, 2013). Repeated genotypes were also observed in populations of *G. gracilis* from two localities on the coast of France (Engel *et al.*, 2004), and on a global sampling performed with the same species (Wattier *et al.*, 1997). However, in *Chondrus crispus*, this repetition was observed only for gametophytes, no repeated genotypes were observed for tetrasporophytes (Krueger-Hadfield *et al.*, 2013). In *Furcellaria lumbricales* only unique genotypes were found in a comparison between populations of the North Atlantic and Baltic Sea (Kostamo *et al.*, 2012).

Evidences of linkage disequilibrium (LD) were found for all populations of *G. caudata* and for three populations of *G. birdiae* (RN, CE, and BA). These results might be related to the presence of epiphytic gametophytes, prevalent in the populations of *G. caudata*. The *in situ* germination of tetraspores shortens the life cycle of the species; the epiphytic gametophytes are usually smaller and become fertile faster than the non-epiphytic ones (Plastino, 1985; Destombe *et al.*, 1989). Evidences of linkage disequilibrium were also found in populations of *Chondrus crispus* sampled at different points along the shore of Brittany (France) (Krueger-Hadfield *et al.*, 2011). Besides the existence of a physical link between chromosomes, the disequilibrium (LD) may occur due to the absence of genetic recombination caused by clonal propagation, selfing, or differences in allele frequencies among populations (the Wahlund effect) (Krueger-Hadfield *et al.*, 2013; Garnier-Géré & Chikhi, 2013).

The Wahlund effect, or population subdivision, refers to a decrease in mean observed heterozygosity relative to the expected heterozygosity (Hartl & Clark, 2010).

This decrease was observed in the current study for BA populations of *G. birdiae* and *G. caudata*, and for the CE population of *G. birdiae*. However, the high levels of heterozygosity observed in the populations of *G. caudata* from Paraíba (PB) and Espírito Santo (ES) States was initially thought as a result of having undergone a genetic bottleneck. The bottleneck effect is characterized by an excess of heterozygotes in relation to its equilibrium value in a stable population, in addition to causing a rapid reduction in the number of alleles (Maruyama & Fuerst, 1985; Piry *et al.*, 1999). Nevertheless, further analyses failed to prove to occurrence of a recent bottleneck in all populations of *G. birdiae* and *G. caudata* evaluated in the present study. Moreover, values of the inbreeding coefficient (F_{is}) far from zero, as observed in the CE population of *G. birdiae* and also in the PE, ES, and SP populations of *G. caudata* are further evidence of the occurrence of a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (Hartl & Clark, 2010). Probably due to the intensive and uncontrolled harvesting of these natural beds, especially in the 1970s (Hayashi *et al.* 2014), there was a significant drop in native populations. Nowadays, local fishermen communities report a decline in productivity and even the disappearance of natural beds of *G. birdiae* and *G. caudata*, mainly in the CE, RN, and PE populations (Miranda, 2010).

Estimates of genetic differentiation (F_{st}) in combination with the Mantel Test indicate the existence of a correlation between the genetic and geographic distances to both *G. birdiae* and *G. caudata*. However, this correlation was linear only for *G. caudata*, indicating that other underlying effects may be influencing the results observed in *G. birdiae*. Also in *G. birdiae* the lowest F_{st} found between the populations of CE and RN ($F_{st}= 0,031$) suggests a higher genetic similarity among these populations. This proximity, when compared to the populations of PE and BA, may be influenced by the ocean currents. The predominant current in this region is the North Brazil which transports warm waters (Johns *et al.*, 1998, Casey & Cornillon, 1999). Whereas, the PE and BA populations inhabits regions affected by the Brazil current, strongly influenced by the cold waters from the Malvinas current and the South Atlantic Central Waters (originated from the Subtropical Convergence) (Casey & Cornillon, 1999) (Figure 18). In *Macrodon ancylodon*, a coastal marine fish, the populations of the North Brazil current formed a clade (tropical clade) separated from the populations that inhabits regions influenced by the Brazil and Malvinas currents (subtropical clade), and no gene flow exists between the tropical and subtropical clades (Santos *et al.*, 2006). Similarities between the RN and CE populations of *G. birdiae* and also between RN and CE

populations of *G. caudata* were corroborated by the photosynthesis parameters evaluated in the present study (Chapter 3). The similar values for the maximum electron transport rate (ETR_{max}) found between the RN and CE populations for both species suggests an acclimation to similar environmental condition resulting in similar physiological responses.

Figure 18: Map showing the ocean currents surrounding the Brazilian coast. The sampling points were plotted according to their GPS coordinates. **A.** *G. birdiae*: Pedra Rachada beach (03°23'87.0"S 39°00'67.0"W), 08/02/2012, City of Paracurú, Ceará (CE). **B.** *G. caudata*: Naufrágio beach (03°23'50.5"S 39°00'38.8"W), 09/02/2012, City of Paracurú, Ceará (CE). **C.** *G. birdiae* e *G. caudata*: Rio do Fogo beach (05°15'41.0"S 35°23'11.0"W), 27 e 28/09/2011, City of Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (RN). **D.** *G. caudata*: Carapibús beach (07°17'62.9"S 34°48'08.5"W), 21/07/2012, City of Conde, Paraíba (PB). **E.** *G. caudata*: Boa Viagem beach (08°07'58.9"S 34°53'57.6"W), 14/03/2013, City of Recife, Pernambuco (PE). **F.** *G. birdiae*: Muro Alto beach (08°26'13.1"S 34°58'47.1"W), 12/03/2013,

City of Ipojuca, Pernambuco (PE). **G.** *G. birdiae* e *G. caudata*: Emissário beach (12°44'28.0"S 38°09'01.0"W), 14 e 15/10/2012, City of Arembepe, Bahia (BA). **H.** *G. caudata*: Parati beach (20°48'31.0"S 40°36'39.0"W), 05/05/2012, City of Anchieta, Espírito Santo (ES). **I.** *G. caudata*: Cigarras beach (23°55'01.0"S 46°19'16.8"W), 03/10/2013, City of São Sebastião, São Paulo (SP). The green arrow indicates the discharge of the São Francisco River. Adapted from Santo *et al.*, 2006.

Local adaptations and evolutionary divergence between populations can be predicted if geographic barriers that might restrict gene flow are identified (Krueger-Hadfield *et al.*, 2013). The Bayesian analysis performed using the Structure program demonstrated the existence of a similar geographic structure between the populations of *G. birdiae* and *G. caudata*. The two clusters found for both species have as limit the populations of BA and PE States, indicating the existence of a possible genetic barrier. Also the existence of additional subdivisions in both *G. birdiae* and *G. caudata* was demonstrated by the principal component analysis generated by PCAGEN 1.2.1. In *G. birdiae* a separation between one group consisting of the PE population and another including the BA, RN, and CE populations ($F_{is}= 0.081$), was superior to the separation found between the group formed by the BA population, and another including RN, CE, and PE populations ($F_{is}= 0.051$). The PE population of *G. birdiae* was located in a separate pool, slightly isolated during the low tide, resulting in an environment with restrict gene flow; also characterized by the highest proportion of tetrasporophytes, compared to the populations from RN, CE, and BA. All these aspects could result in the differentiation of the PE population from the remaining populations of *G. birdiae* evaluated in the current study. In *G. caudata* the separation found between a group consisting of the BA population, and another including the ES and SP populations ($F_{is}= 0.042$) was not as significant as the separation found between a group including the CE, RN, PB, and PE populations, and another including BA, ES, and SP populations ($F_{is}= 0.157$).

The Northeast region of Brazil, specifically between the BA and PE States, where there is evidence of a possible genetic discontinuity for *G. birdiae* and *G. caudata*, is part of a chain of submarine volcanic hills known as Vitória-Trindade (Figure 18), a biogeographic barrier previously related to changes in the genetic diversity of tropical fish (Joyeux *et al.*, 2001) and deepwater shrimp (Pezzuto & Dias, 2009). Another geographical factor to be considered in this region is the existence of the discharge of the São Francisco River which, due to the large freshwater inflow, could

exert a barrier effect for propagules and spores. Furthermore, in order to explain the current pattern of biodiversity found in the Brazilian Atlantic forest, modeling based on different climate scenarios and pollen records predicted forest contractions in the southern and south-eastern of Brazil at 21 ka BP (21 thousands of years before present) and the existence of a large refuges in BA as well as in PE, along the north-eastern Brazilian coast (Carnaval & Moritz, 2008). This scenario may also explain the results found in the present study for the geographic distribution of *G. birdiae* and *G. caudata*. Moreover, previous studies done under laboratory conditions found physiological differences between the north and south-east populations of both species that corroborate the existence of this non-specific genetic barrier (Ursi *et al.*, 2003, 2013; Araujo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014*a* and *b*).

Capítulo 6 – Conclusões finais

Gracilaria birdiae e *G. caudata* são algas gracilarióides típicas de regiões entremarés com ampla distribuição na costa brasileira, cujas populações de diferentes latitudes estão expostas a distintas irradiâncias e temperaturas. Ressalta-se que *G. caudata* apresenta uma distribuição mais ampla que *G. birdiae*, ocorrendo desde o Caribe, até a costa do Estado de Santa Catarina, enquanto que não existem evidências de que *G. birdiae* ocorra ao norte do Estado do Ceará, ou ao sul do Estado do Espírito Santo. Durante o desenvolvimento deste trabalho, não foi possível localizar populações de *G. birdiae* no Estado do Espírito Santo, mesmo após várias tentativas durante dois períodos distintos (05-07/05/2012 e 19-22/08/2013). Nessas ocasiões, várias praias dos Municípios de Anchieta e Fundão foram visitadas, locais onde anteriormente a espécie era comumente encontrada. Pesquisas recentes mostram uma redução no número de espécies para o litoral do Espírito Santo (comunicação pessoal, A.P.P. Valentim), o que poderia também explicar o suposto desaparecimento dessas populações de *G. birdiae* na região.

Muitos ambientes flutuam sazonalmente entre condições mais ou menos favoráveis, e muitas espécies desenvolveram ao longo da evolução respostas genéticas a sinais ambientais específicos, que permitem aproveitar períodos com condições climáticas favoráveis para o crescimento e a reprodução (Allendorf *et al.*, 2013). Apesar da semelhança morfológica e da proximidade filogenética entre *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*, os resultados apresentados no atual estudo indicam estratégias fisiológicas e reprodutivas distintas em cada espécie, possivelmente em decorrência de adaptações a condições ambientais específicas.

A sazonalidade bem como o fotoperíodo são determinantes na variação da fotossíntese de algas de regiões entre-marés expostas a flutuações e condições abióticas extremas, especialmente àquelas que ocorrem em áreas tropicais (Henley & Ramus, 1989; Plastino & Oliveira, 2002), como é o caso de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*. As Rhodophyta podem ocorrer em um limite variável de irradiâncias, sendo que muitas das espécies são conhecidas como plantas de sombra (Gantt, 1990). Comparando-se, por meio da análise de parâmetros da fotossíntese as diferentes populações de *G. birdiae* e *G. caudata*, foi possível observar que, independentemente da população, *G. caudata* apresenta uma maior habilidade em lidar com elevados níveis de irradiância, o que

justificaria sua ocorrência em pontos superiores na distribuição vertical do substrato. *G. birdiae*, no entanto, mostrou-se mais sensível a essa exposição, o que justificaria a localização de suas populações, já que sempre ocupam faixas inferiores do substrato. Esses resultados são reforçados pela ampla distribuição geográfica de *G. caudata*, o que indicaria uma maior habilidade em lidar com distintas irradiâncias e temperaturas, quando comparada à *G. birdiae*.

Mudanças evolutivas adaptativas interpopulacionais consistem de alterações graduais na morfologia, histórico de vida e fisiologia dos indivíduos de uma espécie, normalmente afetados por uma interação entre genes e ambiente (Allendorf *et al.*, 2013). Variações foram observadas entre as populações de *Gracilaria caudata* do Nordeste e Sudeste para os parâmetros da fotossíntese de gametófitos femininos com cistocarpo, corroborando estudos anteriores realizados em *G. birdiae* e *G. caudata*, nos quais se sugere que essas espécies selecionaram adaptações fisiológicas relacionadas ao ambiente e portanto, decorrentes de mudanças incorporadas geneticamente (Ursi *et al.*, 2003; Ursi *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014a e b). Essa capacidade de se adaptar a novas condições ambientais é determinada em parte pela extensão da variação genética existente na população (Allendorf *et al.*, 2013).

Dentre as possíveis estratégias reprodutivas, destaca-se a predominância de tetrasporófitos em relação aos gametófitos, para *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*, em todas as populações amostradas, corroborando a hipótese de maior viabilidade da fase diplóide tetrasporofítica, possivelmente em decorrência da maior taxa de sobrevivência dos carpósporos e maior tolerância a variações ambientais, como já sugerido para outras espécies (Destombe *et al.*, 1989; Hughes & Otto, 1999; Engel *et al.*, 2004). Entretanto, deve-se ressaltar que populações de *G. caudata* dos Estados do Sudeste (ES e SP), quando comparadas às populações dos Estados do Nordeste (CE, RN, PB, PE e BA), embora ainda apresentassem uma maior proporção de tetrasporófitos do que de gametófitos, esses últimos foram muito mais frequentes nas populações do Sudeste. Esse fato poderia ser parcialmente explicado pelas condições mais amenas quanto às irradiâncias a que essas populações estão sujeitas, além de uma maior disponibilidade de nutrientes (Brandini, 1990; Oliveira *et al.*, 1997), principalmente no ES (Rodrigues & Lorenzetti, 2001). Essas condições talvez sejam fundamentais para determinar a sobrevivência e independência do estágio haplóide, ainda na fase de tetrasporos e plântulas.

É importante ressaltar que, principalmente nas populações de *Gracilaria caudata* da região Nordeste, gametófitos férteis foram encontrados crescendo como epífitas de tetrasporófitos. Essa condição seria uma forma de garantir a manutenção e o desenvolvimento dessa fase haplóide, muito frágil para sobreviver livremente em um ambiente desfavorável. Deve-se ressaltar ainda, que esse mecanismo possibilita a redução do tempo necessário para completar o histórico de vida trifásico, pois esses gametófitos epífitas tornam-se férteis precocemente, quando comparados aos gametófitos de vida livre (Plastino, 1985). Além disso, esse mecanismo resulta em um número maior de gerações produzidas num dado período de tempo, o que aumentaria as chances da seleção de indivíduos com essas características nas populações subsequentes.

Mudanças graduais em fenótipos ao longo de gradientes geográficos e/ou ambientais são encontradas em várias espécies (Allendorf *et al.*, 2013). Entretanto, a ocorrência de algas com diferentes colorações crescendo lado a lado na natureza é um indicativo da existência de variantes genótípicas pigmentares, especialmente se as condições do local forem muito homogêneas (Plastino, 2008). Variantes pigmentares de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* foram observadas no atual estudo nas populações dos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Os valores elevados da fotossíntese máxima, observados para a linhagem de coloração esverdeada de *G. birdiae* na natureza sugerem uma maior habilidade em utilizar elevadas irradiâncias para a manutenção de seu metabolismo, quando comparada à linhagem de coloração vermelha (selvagem). Essa característica deve representar uma vantagem adaptativa para *G. birdiae*, uma vez que a ocorrência de espécimes com capacidades fotossintetizantes distintas pode aumentar os espectros de aclimação possíveis da espécie. É interessante reforçar que populações do Estado do Ceará representam o limite norte da distribuição de *G. birdiae*, expostas aos maiores índices de irradiância, quando comparadas às demais populações amostradas.

Dentre os marcadores moleculares utilizados no atual estudo, o marcador molecular para a região espaçadora dos genes mitocondriais para a citocromo oxidase subunidades 2 e 3 (*cox2-3*) e os marcadores tipo microssatélites mostraram-se mais efetivos na avaliação de características genéticas inter e intrapopulacionais, tanto em *Gracilaria birdiae*, como em *G. caudata*. Os resultados observados no atual estudo para *G. birdiae* sugerem que essa espécie apresenta uma menor diversidade genética, quando comparada à *G. caudata*, evidenciada pelo único haplótipo encontrado nas análises de *cox2-3*. Os valores obtidos para as estatísticas-F indicam também que em *G. birdiae* as

populações avaliadas encontram-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O excesso de homozigotos, além do elevado número de possíveis alelos nulos e genótipos multilocus repetidos sugerem a prevalência do modo de reprodução assexuada, contribuindo para essa baixa diversidade genética observada. A sua distribuição geográfica limitada aos estados do Nordeste Brasileiro indica também uma maior sensibilidade da espécie a mudanças ambientais, o que poderia em parte justificar o seu suposto desaparecimento de regiões anteriormente amostradas, como o litoral do Estado do Espírito Santo.

Em *Gracilaria caudata*, no entanto, os resultados obtidos indicam que as populações dessa espécie encontram-se mais próximas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O elevado número de haplótipos observado ao longo da sua distribuição geográfica, nas análises de *cox2-3* (cinco haplótipos), indica uma maior diversidade genética da espécie. A prevalência da reprodução sexuada nas diferentes populações avaliadas de *G. caudata* é evidenciada pela ausência de genótipos repetidos e pouco prováveis alelos nulos. A redução do tempo necessário para completar o histórico de vida, ocasionada pela presença de gametófitos férteis como epífitas de tetrasporófitos, principalmente para as populações do Nordeste, possivelmente contribui para a manutenção dessa elevada diversidade genética. A ampla distribuição geográfica dessa espécie pode ser considerada outra evidência de sua maior capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, garantindo assim a permanência da espécie no ambiente. Esses resultados, corroborados pelos dados obtidos nas análises de fotossíntese, reforçam a maior variabilidade genética em *G. caudata*, quando comparada à *G. birdiae*.

Populações naturais para a maioria das espécies são subdivididas ou estruturadas em unidades locais que ainda exibem algum nível de troca genética entre si (Allendorf *et al.*, 2013). No atual estudo, estruturações geográficas semelhantes foram verificadas para as populações de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata*. Embora os resultados indiquem estratégias reprodutivas e fisiológicas distintas para essas espécies, é importante ressaltar a semelhança morfológica e a proximidade filogenética entre elas. Os dois agrupamentos encontrados para ambas espécies têm como limites os Estados da Bahia e Pernambuco, indicando a existência de uma possível barreira genética influenciada por fatores ambientais. Essa região faz parte da cadeia vulcânica submarina denominada Vitória-Trindade, uma conhecida barreira geográfica. Além disso, essa região abriga a foz do Rio São Francisco, cujo elevado volume de águas pode exercer a função de barreira para a dispersão de propágulos e esporos. É necessário ressaltar a importância

de se aprofundar o conhecimento sobre essa estruturação, principalmente entre as regiões dos Estados da Bahia e Pernambuco, nas quais existem evidências de uma possível descontinuidade genética para as espécies.

Uma vez que *Gracilaria caudata* e *G. birdiae* são importantes fontes de um ficocolóide de alta qualidade no mercado, é importante levar em consideração, em possíveis projetos de maricultura, a maior tolerância fisiológica e também a maior variabilidade genética de *Gracilaria caudata*, evidenciadas neste trabalho. Entretanto, estudos prévios sobre a qualidade do ágar dessas espécies são indispensáveis, pois é complexo se utilizar como base apenas dados de literatura, já que há uma grande variabilidade nos métodos de extração e análise desses ficocolóides (Ursi *et al.*, 2013). Portanto, esses diferentes aspectos devem ser ponderados ao se considerar a maricultura dessas espécies na costa brasileira.

Resumo

Considerando-se a importância de *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* como as principais agarófitas coletadas no nordeste brasileiro, e o conhecimento prévio sobre a diversidade fisiológica de suas populações, foram avaliadas as características fenológicas, a diversidade genética e os parâmetros relacionados à fotossíntese de populações selecionadas ao longo da costa brasileira. Durante a realização desse trabalho, foram amostradas quatro populações de *Gracilaria birdiae* de diferentes estados (RN, CE, PE e BA) e sete populações de *G. caudata* (RN, CE, PE, PB, BA, ES e SP). Tetrasporófitos foram encontrados em maior número em todas as populações amostradas. Em *G. caudata*, uma maior proporção de tetrasporófitos foi observada para as populações da região Nordeste, quando comparada às populações da região Sudeste. A ausência de plantas inférteis na maioria das populações amostradas, ou a baixa frequência (*G. birdiae*, RN, 4%; e *G. caudata*, RN e PE, 0,95% e SP, 8,57%), indicam a elevada fertilidade das espécies. A presença de gametófitos epífitas em tetrasporófitos foi observada em ambas espécies, entretanto, eles foram predominantes em *G. caudata*. Os parâmetros da fotossíntese foram avaliados a partir de dados coletados na natureza, com o uso da técnica de fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. Nos locais onde ambas espécies ocorriam, observou-se que *G. caudata* apresentou valores elevados de I_k e inferiores de αETR , quando comparada a *G. birdiae*, sugerindo que essa espécie apresente maior sensibilidade a altos níveis de irradiância. Essas respostas estão de acordo com a posição em que ocupam em relação ao nível de maré: *G. caudata*, sempre numa posição superior em relação à *G. birdiae*. Tetrasporófitos e gametófitos femininos de ambas espécies do CE apresentaram valores elevados de αETR , sugerindo que estes estão adaptados a irradiâncias elevadas e apresentam mecanismos capazes de evitar danos ao aparato fotossintetizante. A população de *G. birdiae* do RN apresentou uma diminuição das taxas fotossintetizantes em elevadas irradiâncias (até 500 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) atribuída a sua posição inferior no substrato, quando comparada às populações da BA e PE, o que poderia indicar uma maior sensibilidade à irradiância em relação às demais. Não foram observadas diferenças nos valores de ETR_{max} entre as populações do RN e CE para ambas espécies, o que pode ser justificado pela proximidade geográfica. Tetrasporófitos de *G. birdiae* de coloração esverdeada do CE apresentaram maiores valores de ETR_{max} , quando comparados aos de coloração vermelha (selvagem), sugerindo uma maior habilidade de indivíduos de coloração esverdeada em utilizar elevadas irradiâncias para a manutenção de seu metabolismo. Essa característica deve representar uma vantagem adaptativa para *G. birdiae*, uma vez que a ocorrência de espécimes com capacidades fotossintetizantes distintas pode aumentar os espectros de aclimação da espécie. A diversidade genética foi acessada por meio de marcadores plastidiais (*rbcL*), mitocondriais (*cox1* e *cox2-3*), nucleares (SSU) e microssatélites. Um total de 129 sequências de *G. birdiae* e *G. caudata* foram amplificadas para os marcadores *cox1*, *cox2-3*, *rbcL* e SSU. Sequências de *cox1* (633 pares de base (bp)) foram obtidas para 42 amostras de *G. birdiae*, e para apenas três amostras de *G. caudata*, devido a dificuldades de amplificação; uma divergência de 64 bp (10,25%) foi observada entre as espécies. Sequências de *rbcL* (1571 bp) e de SSU (1769 bp) foram obtidas para: i, uma amostra de *G. birdiae* da população do RN; e ii, duas amostras de *G. caudata*, uma do RN e outra da população do ES. Divergências de 61 bp (3,88%) e 4 bp (0,2%) foram observadas entre as espécies para as sequências de *rbcL* e SSU, respectivamente. Sequências de *cox2-3* (363 bp) foram obtidas para 33 amostras de *G.*

birdiae, e para 48 amostras de *G. caudata*; uma divergência de 35 bp (8,97%) foi observada entre as espécies. Três haplótipos foram reconhecidos em *G. birdiae* para as sequências de *cox1* de 0-1 bp (0,15%), enquanto que 5 haplótipos para as sequências de *cox2-3*, de 0-3 bp (0,82%), foram identificados em *G. caudata*. Uma média de sete marcadores tipo microssatélites foram desenvolvidos para *G. birdiae* e 12 para *G. caudata*, a partir das diferentes populações amostradas. Cinco loci de microssatélites amplificaram em ambas espécies, no entanto, foram observadas diferenças no tamanho e número de alelos de acordo com a espécie. Para a análise de microssatélites, foi avaliado um total de 248 amostras de *G. birdiae* (RN, 71; CE, 58; BA, 52; e PE, 67) e 424 de *G. caudata* (RN, 52; CE, 75; PB, 83; PE, 53; BA, 56; ES, 54; e SP, 51). Em *G. birdiae*, genótipos multilocus repetidos foram encontrados em três das quatro populações avaliadas (BA, CE e PE). Em *G. caudata*, essa repetição foi encontrada apenas para as populações da BA e SP, sendo que as demais apresentaram somente genótipos multilocus únicos (CE, RN, PB, PE e ES). As estimativas de diferenciação genética (F_{st}) em combinação com o Teste de Mantel indicaram a existência de uma correlação entre as distâncias genética e geográfica, tanto para *G. birdiae* como para *G. caudata*; entretanto, essa correlação mostrou-se linear apenas para *G. caudata*. A análise Bayesiana (programa Structure) demonstrou a existência de uma estruturação semelhante para as populações de *G. birdiae* e *G. caudata*. Os dois agrupamentos encontrados para ambas espécies têm como limite as populações dos Estados da Bahia e Pernambuco, indicando a existência de uma possível barreira genética não específica. Em síntese, análises moleculares corroboram dados de fotossíntese e indicam a maior variabilidade genética em *G. caudata*, quando comparada à *G. birdiae*. Essas análises corroboram ainda a hipótese da existência de uma variação genética relacionada a adaptações ambientais que resultam em alterações moleculares, fisiológicas e fenológicas.

Abstract

Considering the importance of *Gracilaria birdiae* and *G. caudata* as the main agarophytes collected in northeastern Brazil, and previous knowledge on the physiological diversity of their populations, phenological characteristics, parameters related to photosynthesis, and genetic diversity were evaluated in populations selected along the Brazilian coast. During this work, were sampled four populations of *Gracilaria birdiae* (RN, CE, PE, and BA) and seven of *G. caudata* (RN, CE, PE, PB, BA, ES, and SP). Tetrasporophytes were found in greater numbers in all sampled populations. In *G. caudata*, a higher proportion of tetrasporophytes was observed for the Northeast populations, compared to the Southeast populations. The absence of infertile plants in most of the sampled populations, or their low frequency (*G. birdiae*, RN, 4%, and *G. caudata*, RN and PE, 0.95%, and SP, 8.57%), indicate the high fertility of the species. The presence of epiphytic gametophytes of tetrasporophytes was observed in both species; however, they were prevalent in *G. caudata*. The photosynthetic parameters were evaluated from data collected in nature, using the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence technique. Where both species occurred, *G. caudata* presented high levels of I_k and lower αETR , compared to *G. birdiae*, suggesting that this species may show greater sensitivity to high levels of irradiance. These responses are consistent with the position that they occupy relative to the shore: *G. caudata*, always in a higher position, compared to *G. birdiae*. Tetrasporophytes and female gametophytes from the CE population of both species showed high levels of αETR , suggesting that these are adapted to high irradiance and have mechanisms to prevent damage to the photosynthetic apparatus. The RN population of *G. birdiae* presented a decrease in photosynthetic rates at high light intensities (up to 500 $\mu\text{mol.f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) attributed to its lower position on the shore, compared to the BA and PE populations, which could indicate a greater sensitivity to irradiance in relation to others. No differences were observed in ETR_{max} values between the RN and CE populations for both species, which can be explained by their geographical proximity. The greenish tetrasporophytes of *G. birdiae* from CE had higher ETR_{max} values, when compared to the wild-type (red), suggesting a greater ability of the greenish individuals to use high irradiance for maintaining their metabolism. This feature should be considered an adaptive advantage for *G. birdiae*, since the occurrence of specimens with different photosynthetic capacity may increase the acclimation spectra of the species. Genetic diversity was accessed through plastid markers (*rbcL*), mitochondrial (*cox1* and *cox2-3*), nuclear (SSU) and microsatellites. A total of 129 sequences of *G. birdiae* and *G. caudata* were amplified for the markers *cox1*, *cox2-3*, *rbcL* and SSU. *Cox1* sequences (633 base pairs (bp)) were amplified for 42 samples of *G. birdiae*, and only three samples of *G. caudata*, due to difficulties in amplification; a difference of 64 bp (10.25%) was observed between species. *RbcL* sequence (1571 bp) and SSU (1769 bp) were obtained for: i, a sample of *G. birdiae* from RN; and ii, two samples of *G. caudata*, one from RN and another from ES. Differences of 61 bp (3.88%) and 4 bp (0.2%) were observed among species for *rbcL* and SSU sequences, respectively. *Cox2-3* sequences (363 bp) were obtained for 33 samples of *G. birdiae* and 48 samples of *G. caudata*; a difference of 35 bp (8.97%) was observed between species. Three haplotypes were found in *G. birdiae* for *cox1* sequences, 0-1 bp (0.15%), while 5 haplotypes for were found for *cox2-3* sequence of 0-3 bp (0.82%) in *G. caudata*. An average of seven microsatellites markers were developed for *G. birdiae* and 12 for *G. caudata*, from the different sampled populations. Five microsatellite loci amplified on both species; however, there were differences in the size and number of alleles according to species. For the microsatellite analysis, we evaluated a total of 248 samples of *G. birdiae* (RN, 71, CE, 58; BA, 52; and PE, 67), and 424 of *G. caudata* (RN, 52, CE, 75; PB, 83; PE, 53; BA, 56; ES, 54, and SP, 51). In *G. birdiae*, repeated multilocus genotypes were found in three of the four populations evaluated (BA, CE, and PE). In *G. caudata*, this repetition was found only for the BA and SP populations, the others presented only unique multilocus genotypes (CE, RN, PB, PE, and ES). Estimates of genetic differentiation (*Fst*) in combination with the Mantel Test indicated that there is a correlation between the genetic and geographic distances, for both *G.*

birdiae and *G. caudata*; however, this correlation was shown to be linear only for *G. caudata*. The Bayesian analysis (Structure program) and demonstrated the existence of a similar structure to the populations of *G. birdiae* and *G. caudata*. The two groups found for both species have as limit the populations of BA and PE, indicating the existence of a possible non-specific genetic barrier. In summary, molecular analyses corroborate photosynthesis data and indicate a higher genetic variability in *G. caudata*, compared to *G. birdiae*. These analyzes confirm yet the hypothesis of a genetic variation related to environmental adaptations that result in molecular, physiological and phenological changes.

Referências bibliográficas

- Abajian C (1994) SPUTNIK: <http://abajian.net/sputnik/>
- Agapow, P.M. & Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes*. 1: 101–102.
- Agapow, P.M., & Burt, A. 2000. Multilocus 1.2. Department of Biology, Imperial College: Ascot, UK.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Figueroa, F.L. & Cabello-Pasini, A. 2000. Effects of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *J. Appl. Phycol.* 12: 159-168. 667p.
- Aguirre-von-wobeser, E., Figueroa, F.L., & Cabello-Pasini, A. 2001. Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Mar. Biol.* 138: 679-686.
- Allendorf, F.W., Luikart, G.H. & Aitken, S.N. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. 2nd edition. Wiley-Blackwell. 624 pages.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anderson, R.A. 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biod. Cons.* 1: 267-292.
- Andersson, M., Schubert, H., Pedersén, M. & Snoeijs, P. 2006. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Mar. Biol.* 149: 653-665.
- Andreakis, N., Kooistra, W.H.C.F. & Procaccini, G. 2007. Microsatellite markers in an invasive strain of *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): insights in ploidy level and sexual reproduction. *Gene* 406:144-151.
- Araujo, F.O., Ursi, S. & Plastino, E.M. 2014. Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. *J. Appl. Phycol.* 26: 849-858.
- Araujo, G.C. & Rodrigues, J.A.G. 2011. Maricultura da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* em Icapuí, Ceará. *Arq Ciên Mar* 44:62-68.
- Arnaud-Haond, S. & Belkhir, K. 2007. GENECLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol Ecol Notes* 7:15–17.
- Avise, J. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York-London.

- Ayres, L.M. 2009. Efeitos da radiação UV-B em variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura. Dissertação de Mestrado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 147p.
- Ayres-Ostrock, L.M. & Plastino, E.M. 2014a. Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-013-0131-3.
- Ayres-Ostrock, L.M. & Plastino, E.M. 2014b. Effects of UVB radiation on growth rates, pigment contents, and ultrastructure of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* (aceito).
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F. & Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759–3767.
- Barufi, J.B. 2004. Efeitos da luz na reprodução, no crescimento e no conteúdo pigmentar de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 112p.
- Barufi, J.B. 2010. Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 339p.
- Barufi, J.B., Korbee, N., Oliveira, M.C. & Figueroa, F.L. (2011). Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. Appl. Phycol.* 23: 457–466.
- Beer, S. & Axelsson, L. 2004. Limitations in the use of PAM fluorometry for measuring photosynthetic rates of macroalgae at high irradiances. *Eur. J. Phycol.* 39: 1-7.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. URL:<http://www.genetix.univmontp2.fr/genetix/intro.htm>
- Bellorin, A.M., Buriyo, A., Sohrabipour, J., Oliveira, M.C. & Oliveira, E.C. 2008. *Gracilariopsis McLachlanii* sp. nov. and *Gracilariopsis persica* sp. nov. of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyceae) from the Indian Ocean. *J. Phycol.* 44: 1022-1032.
- Bellorin, A.M., Oliveira, M.C. & Oliveira, E.C. 2002. Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. *J. Phycol.* 38: 551-563.

- Bellorin, A.M., Oliveira, M.C. & Oliveira, E.C. 2004. *Gracilaria vermiculophylla*: A western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycol. Res.* 52:69–79.
- Bezerra, A.F. & Marinho-Soriano, E. 2010. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass Bioenerg* 34:1813-1817.
- Billard, E., Serrão, E., Pearson, G., Destombe, C. & Valero, M. 2010. *Fucus vesiculosus* and *spiralis* species complex: a nested model of local adaptation at the shore level. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 405: 163-174.
- Billot, C., Engel, C. R., Rousvoal, S. Kloareg, B. & Valero, M. 2003. Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 253: 111-121.
- Bixler, H.J. & Porse, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol* 23:321-335.
- Brandini, F.P. 1990. Produção primária e características fotossintéticas do fitoplâncton na região sudeste do Brasil. *Bolm. Inst. oceanogr. S Paulo.* 38:147-159.
- Brown, A.H.D., Feldman, M.W. & Nevo, E. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96:523-536.
- Burt, A., Carter, D.A., Koenig, G.L., White, T.J. & Taylor, J.W. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:770-773.
- Cabello-Pasini, A., Aguirre-von-Wobeser, E. & Figueroa, F.L. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor culture systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 57: 169-178.
- Câmara-Neto, C. 1987. Seaweed culture in Rio Grande do Norte, Brazil. *Hydrobiologia* 151/152:363–367
- Carnaval, A.C., & Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* 35:1187-1201.
- Carneiro, M.A.A., Marinho-Soriano, E. & Plastino, E.M. 2011. Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta) in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21: 317-322.
- Casey, K.S., & Cornillon, P. 1999. A comparison of satellite and in situ-based sea surface temperature climatologies. *J. Climate.* 12:1848-1863.
- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1889-1895.

- Cohen, S., Faugeron, S., Martínez, E.A., Correa, J.A., Viard, F., Destombe, C. & Valero, M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *J. Phycol.* 40: 742-747.
- Coleman, M.A., & Brawley, S.H. 2005. Are life history characteristics good predictors of genetic diversity and structure? A case study of intertidal alga *Fucus spiralis* (Heterokontophyta, Phaeophyceae). *J. Phycol.* 41:753-762.
- Costa, E., Plastino, E.M., Petti, R., Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C. 2012. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil - a DNA barcoding approach. *J. Appl. Phycol.* 24: 1643-1653.
- Costa, R.F., Salles, M.C.T. & Matias, L.G.O. 2011. Cultivating algae marines and values for the development of a coastal community in the city of Icapuí/CE. *Cadernos de Agroecologia* 6:1-5.
- Costa, V.L. & Plastino, E.M. 2001. Histórico de vida de espécimes selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria sp.* (Gracilariales, Rhodophyta). *Revta brasil. Bot.* 24: 491-500.
- Costa, V.L. & Plastino, E.M. 2011. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 23: 599-605.
- Costa, V.L. 2000. Caracterização genética, reprodutiva e pigmentar de uma linhagem selvagem e duas variantes cromáticas de *Gracilaria sp.*, (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Univ. S Paulo. São Paulo. 79p.
- Costa, V.L. 2005. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 100p.
- Couceiro, L., Maneiro, I., Mauger, S., Valero, M., Ruiz, J.M. & Barreiro, R. 2011. Microsatellite development in Rhodophyta using high-throughput sequence data. *J Phycol* 47:1258-1265.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Van Schaik, J., Luijckx, P. & Olsen, J.L. 2011. Trans-Pacific and trans-Arctic pathways of the intertidal macroalga *Fucus distichus* L. reveal multiple glacial refugia and colonizations from the North Pacific to the North Atlantic. *J. Biogeogr.* 38: 756-771.
- Dakin, E.E & Avise, J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* 93: 504–509.
- Davison, I.R., Jordan, T.L., Fegley, J.C. & Grobe, C.W. 2007. Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation. *J. Phycol.* 43: 636-646.

- Dawes, C.J. & Koch, E.W. 1990. Physiological responses of the red algae *Gracilaria verrucosa* and *G. tikvahiae* before and after nutrient enrichment. *Bull. Mar. Sci.* 46: 335-344.
- Dawes, C.J., Orduña-Rojas, J. & Robledo, D. 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. *J. Appl. Phycol.* 10: 419-425.
- Destombe, C., Godin, J., Nocher, M., Richerd, S. & Valero, M. 1993. Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. *Hydrobiologia.* 260-261: 131-137.
- Destombe, C., Valero, M. & Guillemin, M.L. 2010. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria Gracilis* and *Gracilaria Dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *J. Phycol.* 46: 720-727.
- Destombe, C., Valero, M., Vernet, P. & Couvet, D. 1989. What controls haploid-diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa*? *J. Evol. Biol.* 2: 317-338.
- Donato, R. 2005. Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 98p.
- Dorken, M.E. & Eckert, C.G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *J Ecol* 89:339-350.
- Eckert, C.G., Samis, K.E. & Loughheed, S.C. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17: 1170-1188.
- Eggert, A., van Hasselt, P.R. & Breeman, A.M. 2003. Differences in thermal acclimation of chloroplast functioning in two ecotypes of *Valonia utricularis* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 38: 123-131.
- Engel, C.R. & Destombe, C. 2002. Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, *Gracilaria gracilis*: influence of high and low tides on fertilization success. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 82: 189-192.
- Engel, C.R., Destombe, C. & Valero, M. 2004. Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effect of haploid-diploid life history and intertidal rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. *Heredity.* 92: 289-298.
- Engel, C.R., Wattier, R., Destombe, C. & Valero, M. 1999. Performance of non-motile male gametes in the sea: analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *Proc R Soc Lond B* 266:1879-1886.
- Enríquez, S. & Borowitzka, M.A. 2010. The Use of the Fluorescence Signal in Studies of Seagrasses and Macroalgae. In Suggett, D. J., Borowitzka, M. A. & Prásil, O. (eds)

- Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer. 187-208.
- Enríquez, S. 2005. Light absorption efficiency and the package effect in the leaves of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 289: 141-150.
- Espinoza-Avalos, J. 2005. Fenología de Macroalgas Marinas. *Hidrobiologica*. 15: 109-122.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Faugeron, S., Valero, M., Destombe, C., Martínez, E.A. & Correa, J.A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 705-716.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Féral, J. P. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 121-145.
- Fernandes, D.R.P., Caetano, V.S., Tenório, M.M.B., Reinert, F. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2012. Characterization of the photosynthetic conditions and pigment profiles of the colour strains of *Hypnea musciformis* from field-collected and *in vitro* cultured samples. *Braz. J. Pharmacogn.* 22: 753-759.
- Ferreira, L.B. 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 200p.
- Ferreira, L.B., Barufi, J.B. & Plastino, E.M. 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Rev. bras. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042006000100017>.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 3. Ed. 220p.
- Field, D. & Wills, C. 1996. Long, Polymorphic Microsatellites in Simple Organisms. *Proc. R. Soc. B.* 1367: 209-215.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A. & Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81-90.
- Ford, E.B. 1964. Ecological genetics. Methuen, London; John Wiley, New York. 335p.
- Frenette, J.J., Demers, S., Legendre, L. & Dodson, J. 1993. Lack of agreement among models for estimating the photosynthetic parameters. *Limnol. Oceanogr.* 38: 679-687.
- 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7281-7285.

- Gantt, E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K.M. & Sheath, K.G. (eds). *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.203-221.
- García-Rodríguez, L.D., Riosmena-Rodríguez, R., Kim, S.Y., López-Meyer, M., Orduña-Rojas, J., López-Vivas, J.M. & Boo, S.M. 2013. Recent introduction of *Gracilaria parvispora* (Gracilariales, Rhodophyta) in Baja California, Mexico. *Bot. Mar.* 56: 143-150.
- Garnier-Géré, P., & Chikhi, L. 2013. Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. *eLS*.
- Garza-Sanchez, F., Zertuche-Gonzalez, J.A. & Chapman, D.J. 2000. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). *Bot Mar* 43:205-212.
- Gaston, K.J. 2009. Geographic range limits of species. *Proc. R. Soc. B.* 276: 1391-1393.
- Gil-Kodaka, P.L., Hara, M., Akiyama, K. & Fujio, Y. 1988. Genetic Differences between Natural and Cultured Populations of *Porphyra yezoensis*. *Tohoku J. Agric. Res.* 38: 1-4.
- Goff, L.J. & Coleman, A.W. 1988. The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. *J. Phycol.* 24: 357-368.
- Goff, L.J., & Moon, D.A. 1993. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycol.* 29: 381-384.
- Goff, L.J., Moon, D.A. & Coleman, A.W. 1994. Molecular delineation of species and species' relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol.* 30: 521-537.
- Gomez, I., Figueroa, F.L., Huovinen, P., Ulloa, N. & Morales, V. 2005. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture*. 244: 369-382.
- Goudet, J. 1999. PCAGEN. Principal components analysis of gene frequency data (version 1.2). Lausanne: Population Genetics Laboratory, University of Lausanne.
- Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> . Updated from Goudet (1995).
- Grzyski, J., Johnsen, G. & Sakshaug, E. 1997. The significance of intracellular self-shading on the biooptical properties of brown, red, and green macroalgae. *J. Phycol.* 33: 408-414.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. & Pettit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591–611.
- Guillemin, M.L., Destombe, C., Faugeron, S., Correa, J.A. & Valero, M.. 2005. Development of microsatellites DNA markers in the cultivated seaweed, *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Mol. Ecol. notes.* 5: 155-157.

- Guillemin, M.L., Faugeron, S., Destombe, C., Viard, F., Correa, J.A. & Valero, M. 2008. Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution*. 62: 1500-1519.
- Guillemin, M.L., Sepúlveda, R.D., Correa, J.A. & Destombe, C. 2013. Differential ecological responses to environmental stress in the life history phases of the isomorphic red alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 25: 215-224.
- Guillemin, M.L., Valenzuela, P., Gaitán-Espitia, J.D. & Destombe, C. 2013. Evidence of reproductive cost in the triphasic life history of the red alga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-013-0072-x
- Guillemin, M.L., Valero, M., Faugeron, S., Nelson, W. & Destombe, C. (in press). Tracing the trans-Pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLoS One*.
- Guimarães, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilairales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 88p.
- Guimarães, M., Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. 1999. Life-history, reproduction, and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Bot. Mar.* 42: 481-486.
- Guimarães, M., Viana, A.G., Duarte, M.E.R., Ascêncio, S.D., Plastino, E.M. & Nosedá, M.D. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 50: 314–317.
- Gulbransen, D.J., McGlathery, K.J., Marklund, M., Norris, J.N. & Gurgel, C.F.D. 2012. *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: *cox1* analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *J. Phycol.* 48: 1278-1283.
- Gulbransen, D.J., McGlathery, K.J., Marklund, M., Norris, J.N., & Gurgel, C.F.D. 2012. *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: *cox1* analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *J. Phycol.* 48:1278-1283.
- Guo, K. 2012. Incorporating latitudinal and central-marginal trends in assessing genetic variation across species ranges. *Mol. Ecol.* 21: 5396-5403.
- Gurgel, C.F.D. & Fredericq, S. 2004. Phylogeography of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): A study of genetic discontinuity in a continuously distributed species based on molecular evidence. *J. Phycol.* 40: 748-758.

- Gurgel, C.F.D., Fredericq, S., Norris, J.N. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2008. Two New Flat Species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) From Brazil: *G. Abyssalis* sp. nov. and *G. Brasiliensis* sp. nov. *Phycologia*. 47: 249-264.
- Gylle, A.M., Nygard, C.A., Svan, C.I., Pocock, T. & Ekelund, N.G.A. 2013. Photosynthesis in relation to D1, PsaA and Rubisco in marine and brackish water ecotypes of *Fucus vesiculosus* and *Fucus radicans* (Phaeophyceae). *Hydrobiologia*. 700:109–119.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT. *Nucl. Ac. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Sci. Mar.* 60: 243-248.
- Hanelt, D., Huppertz, K. & Nultsch, W. 1993. Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 31-37.
- Hanelt, D., Wiencke, C. & Nultsch, W. 1997. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38: 40-47.
- Harper, J.T. & Saunders, G.W. 2001. Molecular systematics of the *Florideophyceae* (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data. *J. Phycol.* 37: 1073–1082.
- Harper, J.T. & Saunders, G.W. 2002. A re-classification of the *Acrochaetiales* based on molecular and morphological data, and establishment of the *Colaçonematales* ord. nov. (Florideophyceae, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 37: 463–76.
- Hartl, D.L. & Clark, A.C. 2010. Princípios de Genética de Populações. 4ª Ed. artmed®. 660 p.
- Hayashi, L., Bulboa, C., Kradolfer, P., Soriano, G. & Robledo, D. 2014. Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. *J Appl Phycol* 26:719-727
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B.* 270: 313–322.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B.* 270: S96–S99.
- Henley, W.J. & Ramus, J. 1989. Optimization of pigment content and limits of photoacclimation for *Ulva rotundata* (Chlorophyta). *Mar. Biol.* 103: 267-274.
- Hollosy, F. 2001. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*. 33: 179-197.
- Hughes, J.S. & Otto, S.P. 1999. Ecology and the Evolution of Biphasic Life Cycles. *Am. Nat.* 154: 306-320.
- Innes, D.J., 1984. Genetic differentiation among populations of marine algae. *Helgoländer Meeresunters.* 38: 401-417.

- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11:424-429.
- Jassby, A.D. & Platt, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 21: 540-547.
- Johns, W.E., Lee, T.N., Beardsley, R.C., Candela, J., Limeburner, R., & Castro, B. 1998. Annual cycle and variability of the North Brazil Current. *J. Phys. Oceanogr.* 28:103-128.
- Joyeux, J.C., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L. & Gasparini, J.L. 2001. Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *J. Biogeogr.* 28: 831–841.
- Kain, J.M. & Destombe, C. 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *J Appl. Phycol.* 7: 269-281.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106.
- Kim, M.S., Yang, M.Y. & Cho, G.Y. 2010. Applying DNA barcoding to Korean Gracilariaceae (Rhodophyta). *Cryptogamie Algol.* 31: 387-401.
- Kim, S.Y., Weinberger, F. & Boo, S.M. 2010. Genetic data hint at a common donor region for invasive Atlantic and Pacific populations of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 46: 1346-1349.
- Kimura, M. & Weiss, G. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics.* 49: 561-576.
- Koressaar, T. & Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289-1291.
- Kostamo, K., Korpelainen, H. & Olsson, S. 2012. Comparative study on the population genetics of the red algae *Furcellaria lumbricalis* occupying different salinity conditions. *Mar. Biol.* 159: 561-571.
- Krause, G.H. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. P. Physiol. P. Mol. Biol.* 42: 313-349.
- Krueger-Hadfield, S.A., Collén, J., Daguin-Thiébaud, C. & Valero, M. 2011. Genetic population structure and mating system in *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 47: 440–450.
- Krueger-Hadfield, S.A., Roze, D., Correa, J.A., Destombe, C. & Valero, M. (in press) O father where art thou? Paternity analyses in a natural population of the haploid–diploid seaweed *Chondrus crispus*. *Heredity* doi:10.1038/hdy.2014.82.
- Krueger-Hadfield, S.A., Roze, D., Mauger, S. & Valero, M. 2013. Intergametophytic selfing and microgeographic genetic structure shape populations of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus*. *Mol. Ecol.* 22: 3242–3260.

- Kusakariba, T. & Necchi, O.Jr. 2009. Daily dynamics of photosynthesis of the freshwater red alga *Sirodotia delicatula* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 57: 268-277.
- Le Gall, L. & Saunders, G.W. 2010. DNA Barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J. Phycol.* 46: 374-389.
- Librado, P., & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25:1451-1452.
- Lira, L., Wor, C., Hazin, F.H.V., Braga Jr, H.A.C. & Santos, J.C.P. 2010. Estudo das correntes marinhas por meio do lançamento de cartões de deriva no litoral do Estado de Pernambuco, Brasil. *Arq. Ciên. Mar.* 43: 30-37.
- Long, S.P., Humphries, S. & Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45: 633-62.
- Lüning, K. 1990. Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley Interscience. New York.
- Luo, H., Morchen, M., Engel, C.R., Destombe, C., Epplen, J.T., Epplen, C., Saumitou-Laprade, P. & Valero, M. 1999. Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol. Ecol.* 8: 700-702.
- Lyra, G.M. 2014. A família Gracilariaceae (Rhodophyta): abordagens taxonômicas e filogenéticas. Tese de Doutorado. Univ. Est. Feira de Santana. Bahia. 309p.
- Maneiro, I., Couceiro, L., Bárbara, I., Cremades, J., Ruiza, J.M. & Barreiro, R. 2011. Low genetic variation and isolation of northern peripheral populations of a red seaweed (*Grateloupia lanceola*). *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 21: 590-600.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Goodwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomas, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F. & Rothberg, J.M. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature* 437:376-380.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.

- Martín, L.A., Zaixso, A.L.B. & Leonardi, P. 2011. Biomass variation and reproductive phenology of *Gracilaria gracilis* in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *J. Appl. Phycol.* 23: 643–654.
- Martin, P.R. & McKay, J.K. 2004. Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. *Evolution.* 58: 938-945.
- Maruyama, T. & Fuerst, P.A. 1985. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics.* 111: 675-689.
- Mauger, S., Couceiro, L. & Valero, M. 2012. A simple and cost-effective method to synthesize an internal size standard amenable to use with a 5-dye system. *Prime Research on Biotechnology* 2:40-46.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Menéndez, M., Martínez, M. & Comín, F.A. 2001. A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256: 123-136.
- Minitab Inc. 2009. Minitab statistical software, version 16 for Windows, State College, Pennsylvania
- Miranda, G.E.C. 2010. Monitoramento, manejo e restauração de populações de *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) subsídios ao uso sustentável. Tese de Doutorado. Univ. Fed. Pernambuco. Pernambuco. 110p.
- Montecinos, A., Broitman, B.R., Faugeron, S., Haye, P.A., Tellier, F. & Guillemín, M.L. 2012. Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. *Evol. Biol.* 12:97.
- Muñoz, J., Fewtrell, J. & Fotedar, R. 2012. Seasonal Variation in Biomass, Abundance and Plant Length of Different Life Stages from *Gracilaria cliftonii* (Gracilariales, Rhodophyta). *International Journal on Algae.* 14: 294-304.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nejrup, L.B., Staehr, P.A. & Thomsen, M.S. 2013. Temperature- and light-dependent growth and metabolism of the invasive red algae *Gracilaria vermiculophylla* - a comparison with two native macroalgae. *Eur. J. Phycol.* 48: 295-308.
- Ogata, E., Matsui, T. & Nakamura, H. 1972. The life cycle of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales) *in vitro*. *Phycologia.* 11: 75-80.
- Oliveira, E.C. & Alveal, K. 1990. The mariculture of *Gracilaria* (Rhodophyta) for the production of agar. In. Akatsuka I (ed) Introduction to applied phycology, 1st edn. Academic Publishing, The Hague, Netherlands, pp 553-564.

- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1984. The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brasil. *Jap. J. Phycol.* 32: 1-6.
- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1994. Gracilariaceae. In Akatsuka I (ed.) *Biology of Economic Algae*. The Hague: SPB Academic Publishing, p. 185-226.
- Oliveira, E.C. 1984. The cultivation of seaweeds for the production of agar and agaroids in Brazil—actual state and future perspectives. *Mems Assoc Latinoam Acuicult* 5:431-435.
- Oliveira, E.C. 1997. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explotado pelo Brasil. *Panorama da Aquicultura* 6:24-26.
- Oliveira, E.C., Alveal, K. & Anderson, R. 2000. Mariculture of agar-producing gracilarioid red algae. *Rev. Fish. Sc.* 8: 345-378.
- Oliveira, E.C., Corbisier, T.N., de Eston, V.R., & Ambrósio Jr, O. 1997. Phenology of a seagrass (*Halodule wrightii*) bed on the southeast coast of Brazil. *Aquat. bot.* 56: 25-33.
- Orduña-Rojas, J. & Robledo, D. 2002. Studies on the Tropical Agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, México. II. Biomass Assessment and Reproductive Phenology. *Bot. Mar.* 45: 459-464.
- Orduña-Rojas, J., García-Rodríguez, L.D., López-Meyer, M. & Riosmena-Rodríguez, R. 2013. Photosynthetic and respiratory responses of *Gracilaria parvispora* from the southeastern Gulf of California. *J. Appl. Phycol.* 25: 1855–1861.
- Orduña-Rojas, J., Robledo, D. & Dawes, C.J. 2002. Studies on the tropical agarophytes *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, Mexico. I. Seasonal physiological and biochemical responses. *Bot. Mar.* 45: 453-458.
- Osmond, C. B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. 1-24. In Baker, N.R. & Bowyer, J.R. *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Scientific Publishers.
- Pardo, C., Peña, V., Bárbara, I., Valero, M. & Barreiro, R. 2014. Development and multiplexing of the first microsatellite markers in a coralline red alga (*Phymatolithon calcareum*, Rhodophyta). *Phycologia* 53:474-47.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 288–295.
- Pemberton, J.M. 2009. Wild pedigrees: the way forward. *P Roy Soc Lond B Bio* 275:613–621.
- Pezzuto, P.R. & Dias, M.C. 2009. Reproductive cycle and population structure of the deep-water shrimp *Aristeus antillensis* A. Milne Edwards & Bouvier, 1909 (Decapoda: Aristeidae) on southeast Brazilian continental slope. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 37: 443-454.
- Phooprong, S., Ogawa, H. & Hayashizaki, K. 2007. Photosynthetic and respiratory responses of *Gracilaria salicornia* (C. Ag.) Dawson (Gracilariales, Rhodophyta) from Thailand and Japan. *J. Appl. Phycol.* 19: 795-801.

- Phooprong, S., Ogawa, H. & Hayashizaki, K. 2008. Photosynthetic and respiratory responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss collected from Kumamoto, Shizuoka and Iwate, Japan. *J. Appl. Phycol.* 20: 743-750.
- Phooprong, S., Ogawa, H. & Namba, N. 2006. Morphological and photosynthetic studies of Gracilarian species from Trat Province, eastern Thailand. *Coast. Mar. Sci.* 30: 226-232.
- Pianka, E.R. 1966. Latitudinal Gradients in Species Diversity: A Review of Concepts. *Am. Nat.* 100: 33-46.
- Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90: 502-503.
- Plastino, E.M. & Guimarães, M. 2001. Diversidad intraespecífica. In: Alveal, K. & Antezana, T. (eds.). Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-tecnicas, teorizaciones y proyecciones. Universidad de Concepcion, Concepcion, pp. 19-27.
- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. 1988. Sterility barriers among species of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) from the São Paulo Littoral, Brazil. *Br. phycol. J.* 23: 267-271.
- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. 1997. *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) – restoring an old name for a common western Atlantic algae. *Phycologia* 36: 225-232.
- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with terere frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia* 41: 389-396.
- Plastino, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP- Aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 124p.
- Plastino, E.M. 2004. Diversidade intraespecífica em algas gracilarióides. Tese de Livre-Docência. Univ. S. Paulo. São Paulo. 52p.
- Plastino, E.M. 2008. Diversidade intraespecífica em algas. Série Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro, v. 30, p. 187-202.
- Plastino, E.M., Guimarães, M., Mاتيoli, S. R. & Oliveira, E. C. 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Gen. Mol. Biol.* 22: 105-108.
- Plastino; E.M., Ursi, S. & Fujii, M.T. 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 52: 45-52.
- Platt, T., Gallegos, C.L. & Harrison, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38: 687-701.

- Polifrone, M., Gil-Rodríguez, M.C., Álvarez, S.D., Stroobant, M. & Viera-Rodríguez, M.A. 2012. Reproductive phenology of three species of Gelidiales (Rhodophyta) in two macroalgal communities from Tenerife (Atlantic Ocean, Canary Islands, Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 69: 247-252.
- Poppe, F., Hanelt, D. & Wiencke, C. 2002. Changes in the ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic red algae *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Bot. Mar.* 45: 253-261.
- Poppe, F., Schmidt, R.A.M., Hanelt, D. & Wiencke, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.* 51: 11-19.
- Prathep, A., Lewmanomont, K. & Buapet, P. 2009. Effects of wave exposure on population and reproductive phenology of an algal turf, *Gelidium pusillum* (Gelidales, Rhodophyta), Songkhla, Thailand. *Aquat. Bot.* 90: 179–183.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Provan, J., Glendinning, K., Kelly, R. & Maggs, C. 2012. Levels and patterns of population genetic diversity in the red seaweed *Chondrus crispus* (Florideophyceae): a direct comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Biol. J. Linn. Soc.* 1-11.
- Provan, J., Maggs, C.A. 2012. Unique genetic variation at a species' rear edge is under threat from global climate change. *P Roy Soc Lond B Bio* 279:39-47.
- Ralph, P.J. & Gademann, R. 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* 82: 222-237.
- Rice, E.L. & Bird, C.J. 1990. Relationships among geographically distant populations of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) and related species. *Phycologia*. 29: 501-510.
- Richerd, S., Couvet, D. & Valero, M. 1993. Evolution of the alternation of haploid and diploid phases in life cycles. II. Maintenance of the haplo-diplontic cycle. *J. evol. Biol.* 6: 263-280.
- Rietema, H. 1991. Evidence for ecotypic divergence between *Phycodrys rubens* populations from the Baltic Sea and North Sea. *Bot. Mar.* 34: 375-381.
- Robba, L., Russell, S.J., Barker, G.L. & Brodie, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am. J. Bot.* 93: 1101-1108.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. & Ganai, M.W. 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149:2007-2023.

- Rodrigues, R.R. & Lorenzetti, J.A. 2001. A numerical study of the effects of bottom topography and coastline geometry on the Southeast Brazilian coastal upwelling. *Cont. Shelf Res.* 21: 371-394.
- Rueness, J. 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia.* 44: 120-128.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, S., Hrbek, T., Farias, I.P., Schneider, H., & Sampaio, I. 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. *Mol. Ecol.* 15:4361-4373.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1879-1888.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 109: 365-371.
- Schoebel, C.N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leys, M., Ricanova, S., Segelbacher, G., Werth, S. & Csencsics, D. 2013. Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *J Evol Biol* 26:600-611.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecol. Stud.* 100: 49-70.
- Selkoe, K.A. & Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615-629.
- Shelly, K., Holland, D. & Beardall, J. 2010. Assessing nutrient status of microalgae using chlorophyll *a* fluorescence. In In Suggett, D. J., Borowitzka, M. A. & Prášil, O. (eds) *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer. 223-235.
- Sim, M.C., Lim, P.E., Gan, S.Y. & Phang S.M. 2007. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for differentiating male from female and sporophytic thalli of *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 19: 763-769.
- Song, S.L., Lim, P.E., Phang, S.M., Lee, W.W., Lewmanomont, K., Largo, D.B. & Han, N.A. 2013. Microsatellite markers from expressed sequence tags (ESTs) of seaweeds in differentiating various *Gracilaria* species. *J. Appl. Phycol.* 25: 839-846.
- Sosa, P. & Lindstrom, S. 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. *Eur. J. Phycol.* 34: 427-442.

- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby, M. & Powell, W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol Ecol* 12:1339-1348.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol* 15:199-203.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Fisiologia vegetal. Artmed. 820p.
- Takahashi, S. & Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13: 178-182.
- Tautz, D. & Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4:832-837.
- Teasdale, B.W. & Klein, A.S. 2010. Genetic variation and biogeographical boundaries within the red alga *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 53: 417-431.
- Tellier, F., Meynard, A.P., Correa, J.A., Faugeron, S. & Valero, M. 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Mol. Phyl. Evol.* 53: 679-693.
- Tellier, F., Tapia, J., Faugeron, S., Destombe, C. & Valero, M. 2011. The *Lessonia nigrescens* species complex (Laminariales, Phaeophyceae) shows strict parapatry and complete reproductive isolation in a secondary contact zone. *Phycol. Soc. Am.* 47: 894-903.
- Terada, R., Abe, T. & Kawaguchi, S. 2010. Reproductive phenology of three species of *Gracilaria*: *G. blodgettii* Harvey, *G. vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss and *G. salicornia* (C. Agardh) Dawson (Gracilariales, Rhodophyta) from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *Coastal Marine Science.* 34: 129-134.
- Terada, R., Inoue, S. & Nishihara, G.N. 2013. The effect of light and temperature on the growth and photosynthesis of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariales, Rhodophyta) from geographically separated locations of Japan. *J. Appl. Phycol.* 25: 1863-1872.
- Terrados, J. & Ros, J.D. 1992. The influence of temperature on seasonal variation of *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux photosynthesis and respiration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 162: 199-212.
- Thomsen, M.S., Gurgel, C.F.D., Fredericq, S. & McGlathery, K.J. 2005. *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in Hog Island Bay, Virginia: a cryptic and invasive macroalga and taxonomic correction. *J. Phycol.* 42: 139-141.
- Toth, G., Gaspari, Z. & Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Gen. Res.* 10: 967-981.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T.Y.J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gks596.

- Ursi, S. & Plastino, E.M. 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revta. Bras. Bot.* 24: 587-594.
- Ursi, S. 2000. Crescimento *in vitro* de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica. Dissertação de Mestrado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 83p.
- Ursi, S. 2005. Diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 121p.
- Ursi, S., Costa, V.L., Hayashi, L., Pereira, R.T.L., Paula, E.J. & Plastino, E.M. 2013. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. *Bot. Mar.* 56: 241–248.
- Ursi, S., Pedersén, M., Plastino, E.M. & Snoeijs, P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Mar. Biol.* 142: 997-1007.
- Valera, D.A., Santelices, B., Correa, J.A. & Arroyo, M.K. 2006. Spatial and temporal variation of photosynthesis in intertidal *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Appl. Phycol.* 18: 827-838.
- Valero, M., Destombe, C., Mauger, S., Ribout, C., Engel, C., Daguin-Thiebaut, C. & Tellier, F. 2011. Using genetic tools for sustainable management of kelps: a literature review and the example of *Laminaria digitata*. *Cah. Biol. Mar.* 52: 467-483.
- Valero, M., Engel, C., Billot, C., Kloareg, B. & Destombe, C. 2001. Concepts and issues of population genetics in seaweeds. *Cah. Biol. Mar.* 42: 53-62.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4: 535–538.
- Vucetich, J.A. & Waite, T.A. 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: Null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conserv. Genet.* 4: 639-645.
- Wahl, M., Jormalainen, V., Eriksson, B.K., Coyer, J.A., Molis, M., Schubert, H., Dethier, M., Karez, R., Kruse, I., Lenz, M., Pearson, G., Rohde, S., Wikström, S.A. & Olsen, J.L. 2011. Stress Ecology in *Fucus*: Abiotic, Biotic and Genetic Interactions. In Michael Lesser (ed) *Advances in Marine Biology*, Vol 59, Oxford: Academic Press. p. 37-106.
- Wang, J., Peng, C., Liu, Z., Tang, Z. & Yang, G. 2013. Isolation and characterization of microsatellites of *Grateloupia filicina*. *Conserv Genet Resour* 5:763-766.
- Wattier, R., Dallas, J.F., Destombe, C., Saumitou-Laprade, P. & Valero, M. 1997. Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species. *J. Phycol.* 33: 868-880.

- Webb, W.L., Newton, M. & Starr, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: A mathematical model. *Oecologia*. 17: 281-291.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- White, A.J. & Critchley, C. 1998. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.* 59: 63-72.
- Xie, C.T., Chen, C.S., Ji, D.H. & Xu, Y. 2009. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 21:367-374.
- Yang, E.C., Kim, M.S., Geraldino, P.J.L., Sahoo, D., Shin, J.A. & Boo, S.M. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 20: 161-168.
- Yang, M., Han, E.G. & Kim, M.S. 2013. Molecular identification of *Grateloupia elliptica* and *G. lanceolata* (Rhodophyta) inferred from plastid *rbcL* and mitochondrial COI genes sequence data. *Genes Genom.* 35: 239–246.
- Yokoya, N.S., Necchi, O.Jr., Martins, A.P., Gonzalez, S.F. & Plastino, E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 19: 197-205.
- Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1992a. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. *J. of Appl. Phycol.* 4: 339-345.
- Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1992b. Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. *Ciencias Marinas*. 18: 49-64.
- Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporelling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *Jpn. J. Phycol. (Sôrui)* 41: 283-293.
- Yow, Y.Y., Lim, P.E. & Phang, S.M. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. *J. Appl. Phycol.* 23: 219–226.
- Yow, Y.Y., Lim, P.E. & Phang, S.M. 2013. Assessing the use of mitochondrial *cox1* gene and *cox2-3* spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. *J. Appl. Phycol.* 25: 831-838.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11:1–16.
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A. & King, R.J. 1999a. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Mol. Ecol.* 8: 1443–7.

Zuccarello, G.C., West, J.A., Kamiya, M. & King, R.J. 1999*b*. A rapid method to score plastid haplotypes in red seaweeds and its use in determining parental inheritance of plastids in the red alga *Bostrychia* (Ceramiales). *Hydrobiologia* 401: 207–14.