Emmanuelle da Silva Costa

Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira:
Uma abordagem morfológica e molecular

Gracilarioid algae (Gracilariaceae, Rhodophyta) along the Brazilian coast:
A morphological and molecular approach

VERSÃO REVISADA

São Paulo
2013

Emmanuelle da Silva Costa

Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira:
Uma abordagem morfológica e molecular

Gracilarioid algae (Gracilariaceae, Rhodophyta) along the Brazilian coast:
A morphological and molecular approach

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

Orientador: Mariana Cabral de Oliveira
Coorientador: Eurico Cabral de Oliveira

VERSÃO REVISADA

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

São Paulo
2013

Costa, Emmanuelle da Silva

Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular. Emmanuelle da Silva Costa – São Paulo: E.S.C., 2013. p.: il

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2013.

1.Gracilariales, 2.“DNA barcode”, 3. Filogenia 4. *cox*1, 5. UPA, 6. *rbc*L. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título

Comissão Julgadora

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Profª Drª.Mariana Cabral de Oliveira
Orientadora

Dedico este trabalho à minha mãe Miriam
por tanto Amor e Compreensão.

"A tarefa não é tentar ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê ".

(Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado concedida e a FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do estado de São Paulo) pelos recursos concedidos ao projeto temático Rhodo-SP.

Agradeço a Mariana Cabral de Oliveira pelos ensinamentos e orientação durante o desenvolvimento do projeto e pela pessoa tão prestativa e competente a quem eu tenho grande admiração.

Agradeço ao Eurico Cabral de Oliveira pela oportunidade de poder compartilhar de seus conhecimentos e tão valiosos ensinamentos, fundamentais na realização desse trabalho.

Agradeço a Estela Maria Plastino pelas contribuições ao longo do desenvolvimento do trabalho que foram extremamente valiosas com as quais pude aprender bastante, além dos materiais cedidos para estudo.

Agradeço ao Instituto de Biociências, em especial ao Departamento de Botânica pelo programa de pós-graduação.

Ao Rosário, por ser essa pessoa tão querida e competente com quem dei muitas risadas e a quem o laboratório tem o privilégio de tê-lo como técnico.

Aos amigos QUERIDOS Carol Franco, Nati, Fabio, Cintia Iha, Henrique e Cintia Oliveira por toda a FELICIDADE que vocês me proporcionaram, pessoas lindas que foram minha alegria diária e que serão inesquecíveis na minha vida.

Ao Fernando, por toda ajuda imprescindível, não apenas com a tese mas em tantos momentos que compartilhamos.

Aos LAMigos pelo convívio tornando o laboratório mais alegre e agradável por todos os momentos de descontração e companheirismo.

A todos que contribuíram com coletas realizadas para que este trabalho pudesse se concretizar: Silvia Guimarães, Mutue Fujii, George Miranda, Eurico Cabral, Mariana Cabral, Estela Plastino, Natália Guimarães, Fabio Nauer, Ligia Ayres, Cintia Iha e tantas outras pessoas a quem sou muito grata.

A minha mãe pelo apoio incondicional e por me incentivar a ir em busca de tudo o que eu acredito representar a felicidade na minha vida.

Este trabalho é resultado da colaboração de muitas pessoas que são parte da minha vida e que me fizeram tão bem nesses quatro anos, me proporcionando amizades queridas que levarei comigo e ensinamentos essenciais para o desenvolvimento do projeto e para me permitir sentir-se uma pessoa melhor.

MUITO OBRIGADA!

Índice

Lista de Tabelas i
Lista de Figuras ii
Abreviaturas iv
Resumo v
Abstract vii
Capítulo 1: Introdução Geral 1
Referências 6
Capítulo 2. The Gracilariaceae Germaplasm Bank of The University of São Paulo, Brazil - A DNA barcoding Approach 9
Resumo 10
Abstract 11
Introduction 12
Materials and Methods 14
- **Cultures conditions** 14
- **DNA extraction and PCR amplification** 15
- **Sequencing and alignments** 15
- **Phylogenetic inferences** 16

Results 16
Discussion 26
Conclusions 28
References 29
Capítulo 3: DNA "Barcoding" e filogenia molecular das Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) na costa brasileira. 34
Resumo 34
Abstract 34
Introdução 35
Materiais e Métodos 40
- **Extração de DNA** 40
- **Amplificação e Purificação dos marcadores moleculares** 41
- **Sequenciamento de DNA** 43
- **Análises das sequências** 44

Resultados 45
- **Análise do marcador plastidial UPA** 51
- **Análise do marcador plastidial *cox*1** 51

Análise do marcador plastidial *rbc*L 51
Diversidade intra e interespecífica para os marcadores moleculares 63
Discussão 66
Referências 70
Capítulo 4: Espécies de Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) na costa brasileira: distribuição e comentários taxonômicos 74
Resumo 74
Abstract 74
Introdução 75
Os gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis* 77
Materiais e Métodos 82
Resultados 88
Discussão 122
Referências 126
Capítulo 5: Considerações Finais 130
Referências 137

Lista de Tabelas

Tabela 1. Amostras de Gracilariaceae mantidas em cultura no Banco de Germoplasma de São Paulo.....p.24-25

Tabela 2: “Primers” para PCR e sequenciamento para os diferentes marcadores moleculares usados neste estudo. Nos “primers” do marcador *rbc*L, r = A ou G; y = C ou T; w = A ouT.....p.43

Tabela 3. Lista das amostras coletadas de Gracilariales, dados de coleta e marcadores sequenciados com número de acesso do Genbank e X para as sequências obtidas que ainda não foram submetidas ao banco.....p.46-50

Tabela 4. Divergência intraespecífica dos táxons estudados segundo os marcadores moleculares UPA, *cox*1 e *rbc*L. Na ausência de divergência usou (-) e na ausência de sequência (N).....p.65

Tabela 5. Divergências intraespecífica, interespecífica e intergenérica das espécies de algas gracilarióides estudadas segundo os marcadores moleculares UPA, *cox*1 e *rbc*L.....p.66

Tabela 6. Ocorrência das espécies de Gracilariaceae no Brasil.....p.80-81

Tabela 7. Listas das amostras coletadas de Gracilariales analisadas nos estudos morfológicos.....p.83-86

Tabela 8. Caracteres morfológicos utilizados na caracterização das espécies de Gracilariaceae.....p.87

Tabela 9. Panorama Atual das espécies de Gracilariales no Brasil.....p.135-136

Lista de Figuras

Figura 01. (a) Árvore filogenética das classes de Rhodophyta e (b) Árvore filogenética das ordens de Florideophyceae (ordem Gracilariales*). As árvores a e b foram modificadas, respectivamente, de Yoon et al. (2006) e Tree of Life (http://tolweb.org/Florideophyceae/21781).....p.2

Figura 02. Ciclos para PCR dos três marcadores utilizados neste trabalho retirados, de a) Saunders (2005), b) Sherwood & Presting (2007), c) Freshwater et al. (1994).....p.42

Figura 03: Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA, mostrando o agrupamento de espécies das algas Gracilarióides. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap (2000 réplicas). Apenas valores maiores do que 65 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do número de acesso. As amostras coletadas em campo e mantidas no Banco de Germoplasma estão precedidas de seus números (Tabelas 1 e 3 respectivamente).....p.53

Figura 04: Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador *cox*1, mostrando o agrupamento de espécies das algas Gracilarióides. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap (2000 réplicas). Apenas valores maiores do que 65 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do número de acesso. As amostras coletadas em campo e mantidas no Banco de Germoplasma estão precedidas de seus números (Tabelas 1 e 3 respectivamente).....p.57

Figura 05: Árvore consenso da Análise Bayesiana para as sequências do marcador *rbc*L mostrando o agrupamento de espécies do gênero das algas Gracilarióides. Os valores nos ramos correspondem à análise de Bootstrap para Neighbor-Joining (NJ, 2000), Máxima Parcimônia (MP, 2000) em itálico, Máxima Verossimilhança (MV,100) em negrito e a espessura dos ramos à probabilidade a posteriori da análise bayesiana *=100. As amostras sequenciadas neste trabalho estão em negrito.....p.62

Figura 6. Mapa de distribuição das espécies de Gracilariaceae na costa brasileira com base na literatura (Tabela 6).....p.76

Figura 07-10. Prancha de fotos *Gracilaria birdiae*.....p.89

Figura 11-14. Prancha de fotos *Gracilaria caudata*.....p.91

Figura 15-20. Prancha de fotos *Gracilaria cearensis*.....p.93

Figura 21-24. Prancha de fotos *Gracilaria cervicornis*.....p.95
.
Figura 25-29. Prancha de fotos *Gracilaria cornea*.....p.97

Figura 30-33. Prancha de fotos *Gracilaria cuneata*.....p.99

Figura 34-36. Prancha de fotos *Gracilaria curtissiae*.....p.101

Figura 37-42. Prancha de fotos *Gracilaria damaecornis*.....p.103

Figura 43-45. Prancha de fotos *Gracilaria domingensis*.....p.105

Figura 46-51. Prancha de fotos *Gracilaria flabelliformis*.....p.107

Figura 52-57. Prancha de fotos *Gracilaria hayi*.....p.109

Figura 58-63. Prancha de fotos *Gracilaria isabellana*.....p.111
.
Figura 64-67. Prancha de fotos *Gracilaria smithsoniensis*.....p.113

Figura 68-73. Prancha de fotos *Gracilaria yoneshigueana*.....p.116

Figura 74-78. Prancha de fotos BRA67 (SPF57182).....p.117

Figura 79-88. Prancha de fotos *Gracilariopsis silvana*.....p.119-120

Figura 89-90. Prancha de fotos *Gracilariopsis tenuifrons*.....p.121

Figura 91. Mapa de distribuição das Gracilariales de ocorrência na costa brasileira com base em análises moleculares. *Gurgel et al. 2008.....p.134

Abreviaturas

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”

BOLD: “Barcode of Life Database Systems”

***cox*1:** gene que codifica a citocromo oxidase I (COI)

DNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-ácetico

Indels: inserções/deleções

ITS: “Internal Transcribed Spacers” ou espaçadores internos transcritos dos genes ribossômicos

Kb: kilobases

MCMC: “Markov Chain Monte Carlo” ou cadeias markovianas de Monte Carlo

ML: “maximum likelihood” ou máxima verossimilhança

MP: “maximum parsimony” ou máxima parcimônia

NJ: “neighbor joining”

pb: pares de bases nucleotídicas

PCR: “Polymerase Chain Reaction” ou reação em cadeia da polimerase

PK: proteinase K

***rbc*L:** gene que codifica a subunidade grande da enzima RuBisCo (ribulose bifosfato carboxilase oxigenase)

rpm: rotações por minuto

UPA: “Universal Plastid Amplicom” domínio V do gene plastidial que codifica o RNA da subunidade ribossomal grande.

Resumo

Devido à sua importância ecológica e econômica as algas gracilarióides são alvo de diversos estudos desenvolvidos por pesquisadores de todo o mundo. No entanto, ainda persistem dificuldades em relação à taxonomia do grupo, que se tornam ainda mais problemáticas no que diz respeito às espécies achatadas, ainda pouco estudadas quando comparadas às espécies cilíndricas. Essa dificuldade taxonômica é devido principalmente a um elevado número de espécies, algumas com ampla distribuição geográfica e a morfologia simples e plástica. Devido à grande dificuldade em se identificar as espécies de Gracilariaceae utilizando-se caracteres morfológicos, o uso de dados moleculares tem se mostrado taxonomicamente útil, e em alguns casos, essencial na discriminação das espécies. Neste trabalho foram geradas sequências inéditas de dois marcadores moleculares do tipo DNA "barcodes" (UPA e *cox*1) para diversas espécies, incluindo espécies de ocorrência na costa brasileira e algumas espécies de outras localidades mantidas em cultura no Banco de Germoplasma da USP. A morfologia dos táxons encontrados foi analisada e o gene *rbc*L foi sequenciado para permitir a comparação com outras sequências nos bancos de dados e para a construção de uma filogenia para o grupo. Foram geradas 289 sequências para 135 amostras. DNA "barcodes" foram gerados para todas as 50 amostras do banco de germoplasma. Em adição, o *rbc*L foi sequenciado para os agrupamentos de *cox*1/UPA totalizando 14 amostras. Treze espécies diferentes foram identificadas no banco de germoplasma combinando análises morfológicas anteriores e análises moleculares. Nossas análises indicaram que *cox*1 e UPA foram marcadores eficientes para a delineação das espécies de Gracilariaceae e tornaram o banco ainda mais útil para pesquisas futuras. Em relação às espécies de Gracilariaceae de ocorrência na costa brasileira, a utilização dos marcadores moleculares permitiu a identificação de alguns táxons, dos quais três são novas ocorrências para o Brasil: *Gracilaria damaecornis*, *Gracilaria hayi* e *Gracilariopsis silvana*. Baseado em dados morfológicos e moleculares concluímos que *Gracilaria tepocensis* citada para a região Sul e Sudeste, não ocorre no Brasil tratando-se de *Gracilaria isabellana*, anteriormente citada para o Brasil como *Gracilaria lacinulata*. Concluímos também que os marcadores moleculares do tipo DNA "barcode" são eficientes na identificação das Gracilariaceae de talo cilíndrico

cujos caracteres morfológicos diagnósticos pouco contribuem no reconhecimento: *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria caudata* e *Gracilaria cornea*, ao contrário de estudos pretéritos que utilizaram outros marcadores moleculares mais conservados (SSU rDNA). A utilização de ferramentas moleculares na identificação e separação das Gracilariaceae de talo achatado mostrou-se bastante eficiente e necessária, uma vez que os caracteres morfológicos de valor taxonômico pouco contribuem na correta identificação. Dessa forma foi possível identificar 19 táxons de Gracilariaceae utilizando-se marcadores moleculares, dos quais 15 correspondem as Gracilariaceae de talo achatado.

Abstract

Due to its ecological and economic importance gracilarioid algae are targets of several studies developed by researchers around the world. However, there are still difficulties for the taxonomy of this group, which become even more problematic when flattened species are considered, which are poorly studied when compared to cylindrical species. This taxonomic difficulty is primarily due to a high number of species, some with broad geographic distribution and a simple and plastic morphology. Due to great difficulty in identifying the species of Gracilariaceae using morphological characteristics, molecular data has shown to be taxonomically useful, and in some cases essential to discriminate species. In this study we generated novel sequences of two DNA barcodes (UPA and cox1) molecular markers for several species, including species occurring on the Brazilian coast and some species from other localities maintained in culture in the Germplasm Bank of USP. The morphology of the taxa was analyzed and the *rbc*L gene was sequenced to enable comparison with other sequences in the databases and to construct a phylogeny for the group. A total of 289 sequences were generated for 135 samples. DNA barcodes were generated for all 50 samples of the germplasm bank. In addition, the *rbc*L was sequenced for 14 representatives of the *cox*1/UPA groups. Thirteen different species were identified in the germplasm bank combining previous morphological and molecular analyses. Our analysis indicated that cox1 and UPA markers were efficient for the delineation of Gracilariaceae species and made the bank even more useful for future research. Regarding Gracilariaceae species occurring on the Brazilian coast, the use of molecular markers allowed the identification of some taxa, of which three are new records for Brazil: *Gracilaria damaecornis, Gracilaria hayi* and *Gracilariopsis silvana*. Based on morphological and molecular data *Gracilaria tepocensis* cited for the South and Southeast of Brazil does not occur, and is in fact *Gracilaria isabellana* previously cited for Brazil as *Gracilaria lacinulata*. We also conclude that the DNA barcodes molecular markers are effective in identifying the Gracilariaceae presenting cylindrical thallus in Brazil whose diagnostic morphological characters little contribute for its recognition: *Gracilaria birdiae, Gracilaria caudata* and *Gracilaria cornea*, unlike other studies that used more conserved molecular markers (SSU rDNA). The use of molecular tools in the identification and separation of flattened Gracilariaceae proved

to be very efficient and necessary, since the morphological characters contribute little for the correct identication. Thus, in this work it was possible to identify 19 taxa of Gracilariaceae using molecular markers, of which 15 corresponds flattened species.

Capítulo 1

Introdução Geral

As algas vermelhas, pertencentes ao filo Rhodophyta, são organismos principalmente marinhos, mas que também podem ser encontrados em águas continentais, ocorrendo desde regiões tropicais até regiões polares. As algas vermelhas formam uma das principais linhagens eucarióticas monofiléticas, segundo análises filogenéticas, distinguindo-se dos demais grupos de algas por características ultra-estruturais, químicas e reprodutivas (Ragan et al. 1994; Freshwater et al. 1994).

O filo Rhodophyta representa a maior diversidade de espécies dentro das macroalgas marinhas (Norton et al. 1996). Estima-se que existam por volta de 500 a 600 gêneros de algas vermelhas, sendo representadas por mais de 6000 espécies (Graham & Wilcox 2009). No entanto, esse número vem sendo constantemente atualizado em virtude dos inúmeros trabalhos realizados com o grupo por diversos pesquisadores no Brasil e no mundo, os quais têm encontrado um grande número de espécies crípticas. Norton et al. (1996) estimam que o número de espécies no grupo possa chegar a 20.000.

Tradicionalmente as Rhodophyta eram divididas em duas classes: Bangiophyceae e Florideophyceae, ou uma classe, Rhodophyceae, com duas subclasses: Bangiophycideae e Florideophycideae (Gabrielson et al. 1985; Garbary & Gabrielson 1990). A classe Florideophyceae tem sido apontada como um grupo monofilético; entretanto, a classe Bangiophyceae tem sido considerada um grupo parafilético formado por diferentes linhagens basais dentro das Rhodophyta (Freshwater et al. 1994; Ragan et al. 1994, Oliveira & Bhattacharya 2000; Müller et al. 2001; Saunders & Hommersand 2004). Recentemente, alguns autores apresentaram novas propostas taxonômicas para as algas vermelhas, baseados em filogenias moleculares e caracteres ultraestruturais. Saunders & Hommersand (2004) propuseram o sub-reino Rhodoplantae, representado pelos filos: Cyanidiophyta e Rhodophyta.Yoon et al. (2006), com base em análises filogenéticas de múltiplos marcadores moleculares propuseram a manutenção de um único filo de algas vermelhas: Rhodophyta, com dois subfilos Rhodophytina e

Cianidiophytina, argumentando que as Cyanidiophyta proposta por Saunders & Hommersand (2004) compartilham diversas características com as Rhodophyta, e que as Cyanidiophyceae formam uma linhagem basal em relação às demais algas vermelhas, o que justificaria o status de subfilo e não de filo. O subfilo Rhodophytina é representado por seis classes: Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae (Figura 1a).

A classe Florideophyceae é representada por organismos que compartilham algumas características em comum, como a presença de tetrasporângio, gonimoblasto filamentoso, além de apresentarem crescimento apical, presença de "pit-connections", assim como histórico de vida trifásico com alternância de gerações (Freshwater et al. 1994). As Florideophyceae incluem uma grande diversidade, com cerca de 99% das espécies conhecidas de Rhodophyta (Graham & Wilcox 2009). Atualmente a classe está representada por 16 ordens (Figura1b).

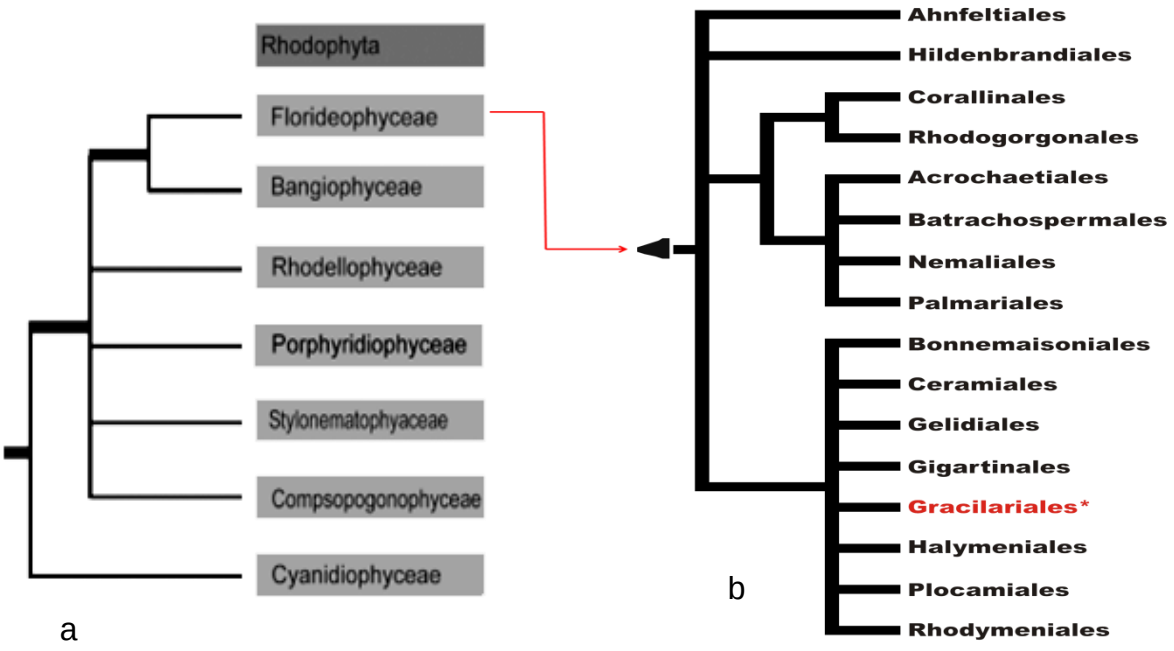


Figura 01. (a) Árvore filogenética das classes de Rhodophyta e (b) Árvore filogenética das ordens de Florideophyceae destacando a ordem Gracilariales. As árvores a e b foram modificadas, respectivamente, de Yoon et al. (2006) e Tree of Life (http://tolweb.org/Florideophyceae/21781).

Dentro de Florideophyceae, inicialmente, a família Gracilariaceae pertencia a ordem Gigartinales, proposta por Kylin (1930). Entretanto, as observações com base na morfoanatomia das espécies do grupo feitas por Fredericq & Hommersand

(1989a), levaram esses autores a concluir que Gracilariaceae não pertencia a Gigartinales, e como consequência foi estabelecida uma nova ordem, Gracilariales.

Atualmente Fredericq & Hommersand (1989b) reconhecem sete gêneros na família Gracilariaceae: *Congracilaria* Yamamoto, *Curdiea* Harvey, *Gracilaria* Greville, *Gracilariopsis* Dawson, *Gracilariophyla* Setchell & Wilson, sendo este o único gênero parasita, *Hydropuntia* Montagne (sinônimo de *Polycavernosa* Chang & Xia 1963) e *Melanthalia* Montagne. Dos sete gêneros reconhecidos para a família, apenas dois são descritos para a costa brasileira: *Gracilaria* e *Gracilariopsis* (Oliveira & Plastino 1994; Bellorin 2002).

As Gracilariaceae estão distribuídas especialmente em águas tropicais e temperadas do mundo, com exceção de *Melanthalia*, endêmica para o sul da Austrália e Nova Zelândia e de *Curdiea* que se extende mais ao Sul até a península Antártica (Fredericq & Hommersand 1989a; Oliveira et al. 2009). Entretanto, a maior biodiversidade está no gênero *Gracilaria* com a maioria das espécies concentradas na região intertropical decrescendo em direção aos pólos (Oliveira & Plastino 1994). Esta diversidade é maior no hemisfério Norte, o que parece estar relacionado à atuação das correntes frias provindas da Antártica no hemisfério Sul, especialmente nos meses de inverno, quando no lado Oeste da América do Sul, a isoterma de 20^0C chega a quase atingir o Equador (Bird & McLachlan 1982). A ampla distribuição da família em todo o mundo, exceto no Ártico, torna esse grupo de algas bastante interessante para estudos biogeográficos (Bird & McLachlan 1984). A maioria das espécies gracilarióides raramente é exposta durante as marés baixas, o que permite supor que elas não seriam capazes de tolerar longos períodos de dessecação e exposição ao ar, embora dados na literatura acerca da tolerância sejam raros (Oliveira 1984). Além desses fatores, pode-se apontar a salinidade como possível fator determinante na distribuição das espécies gracilarióides, apesar de boa parte das espécies ser apontada como eurialina. Bird (1986) mostrou que há uma maior tolerância em direção a salinidade superior do que em baixas salinidades; no entanto a literatura mostra que algumas espécies toleram baixas salinidades (Machiavello et al. 1999).

As Gracilariaceae apresentam uma limitação em relação aos caracteres taxonomicamente informativos utilizados na identificação das espécies, além de uma notória dificuldade em se estabelecer o número de espécies descritas, uma vez que a grande plasticidade fenotípica, o elevado número de espécies, a ampla

distribuição geográfica e a presença de espécies crípticas contribuem para essa grande confusão taxonômica (Oliveira 1984; Oliveira & Plastino 1994; Abbott 1995).

O reconhecimento das espécies, e em alguns casos até mesmo dos gêneros, da família Gracilariaceae é uma tarefa bastante complexa, sendo possível apenas após análise ao microscópio e estudo das características relacionadas à ontogenia do espermatângio e ao desenvolvimento do carpogônio pós-fertilização (Oliveira 1984; Fredericq & Hommersand 1989a). Mesmo assim, o estudo dessas características pode ser insuficiente para a correta identificação, sendo necessária uma combinação de análise morfológica e anatômica com testes de hibridização in vitro, e/ou uso de marcadores moleculares (Oliveira 1984; Bird & Rice 1990).

Características diagnósticas no nível genérico nas Gracilariaceae são predominantemente baseadas na morfologia e no desenvolvimento ontogenético do sistema reprodutor feminino e masculino. Algumas características anatômicas são apontadas como diagnósticas na separação das espécies (Oliveira 1984; Bird & McLachlan 1984). Essas características correspondem à distribuição dos espermatângios, à presença de filamentos de ligação ou filamentos nutritivos tubulares (Dawson 1949; Yamamoto 1978; Oliveira 1984; Bird & Rice 1990), além da divisão dos tetrasporângios, que pode se apresentar decussada cruciada ou dividida irregularmente, embora esta característica tenha-se mostrado de pouca valia (Oliveira 1984; Oliveira & Plastino 1994; Plastino & Oliveira 1996).

A utilização da distribuição dos espermatângios para separação das espécies do gênero foi inicialmente proposta por Yamamoto (1978) que reconheceu três tipos básicos: tipo “chorda”, considerado o mais primitivo é caracterizado pela distribuição dos espermatângios em uma camada na superfície do talo; tipo “textorii” onde os espermatângios se encontram em conceptáculos rasos no córtex e tipo “verrucosa” com espermatângios em conceptáculos profundos, que penetram no subcórtex. Os caracteres diagnósticos utilizados na distinção das espécies da família são detalhadamente descritos em Oliveira (1984); Fredericq & Hommersand (1989a) e Bellorin (2002).

Algumas espécies do grupo são de grande importância econômica, sendo muito utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e textil em virtude da larga aplicabilidade dos hidrocolóides (agaranas) presentes em suas paredes celulares. Além disso, representam organismos de importante papel na manutenção dos ecossistemas aquáticos por constituírem fonte de alimento para diversos

organismos marinhos, produzirem oxigênio e atuarem na ciclagem de nutrientes (Freshwater et al. 1994; Graham & Wilcox 2009).

Espécies de *Gracilaria* são consideradas a principal fonte de ágar, atualmente sendo cultivadas em diferentes partes do mundo com o objetivo de se extrair ficocolóides para serem utilizados pelas indústrias, assim como para seu uso em maricultura integrada (Soriano-Marinho 2002, 2007; Troell 2003). O problema na identificação específica adquire particular relevância, considerando-se a importância econômica de algumas espécies, mas não de outras (Santelices & Doty 1989). Algumas espécies são apontadas como ideais para o cultivo devido à alta produção de ágar, o seu rápido crescimento e fácil reprodução vegetativa. No Brasil, *Gracilaria* é um dos gêneros com maior importância econômica sendo colhido de bancos naturais na costa do Nordeste e vendido para a produção de colóides (Oliveira 1998).

Segundo Buschmann (2001) houve importante mudança na indústria de algas na década de 1980, que passou da coleta de bancos naturais para predomínio da produção baseada em maricultura como resultado do declínio em populações naturais devido à superexplotação. A expansão da maricultura levou à introdução de espécies de uma região geográfica para outra.

O interesse pelo conhecimento da biologia desse grupo, em virtude de sua importância econômica, despertou em vários pesquisadores a necessidade em se conhecer as espécies de *Gracilaria* para saber quais são as mais produtivas, de modo que o estudo das Gracilariaceae espalhou-se pelo mundo e diversos trabalhos foram publicados nas últimas décadas resultando em descrições detalhadas (e.g. Fredericq & Hommersand 1989a,b, 1990a,b; Gurgel et al. 2003).

Com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento deste importante grupo de algas propusemos estudar a diversidade das espécies de Gracilariaceae do Brasil utilizando marcadores moleculares, incluindo DNA “barcodes”, para espécimes coletados ao longo da costa brasileira, analisando-os através da comparação de sequências de DNA e através de estudos morfológicos. As sequências escolhidas para esse fim foram dos genes mitocondriais *cox*1 (DNA “barcode”) e plastidiais UPA e *rbc*L. No caso dos estudos morfológicos estes foram centrados nas descrições morfológicas e na anatomia reprodutiva das estruturas masculinas e femininas, quando presentes, apenas para validar as identificações dos materiais usados nos estudos moleculares, sem entrar em grandes detalhes,

uma vez que a maioria das espécies já foi estudada com base na morfoanatomia por outros pesquisadores.

No segundo capítulo apresentamos os resultados das análises das sequências moleculares das amostras mantidas no banco de germoplasma da Universidade de São Paulo, já publicados no Journal of Applied Phycology (DOI10.1007/s10811-0129828-y). No terceiro capítulo são apresentados os resultados das comparações de sequências, validando a ferramenta de DNA "barcoding" para a identificação de espécies de Gracilariaceae, incluindo análises filogenéticas usando o marcador molecular *rbc*L. No quarto capítulo discutem-se as dificuldades taxonômicas que ainda persistem na família, seguida de descrições das espécies estudadas e suas ocorrências na costa brasileira. No quinto e último capítulo são feitas as considerações finais sobre o trabalho desenvolvido, apresentando uma síntese das espécies que ocorrem na costa brasileira.

Referências

Abbott IA (1995) A decade of species of *Gracilaria* (sensu lato). In: Tax Econ Seaweeds 5, pp. 185-194

Bellorin AM (2002) Sistemática e Filogenia molecular de algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Bird CJ, McLachan J (1982) Some underutilized taxonomic criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales). Bot Mar 25:557-562

Bird CJ, McLachan J (1984) Taxonomy of *Gracilaria*. Evaluation of some aspects of reproductive estructure. Hydrobiologia 116/117, 41-62

Bird CJ, Oliveira EC (1986) *Gracilaria tenuifrons* sp. Nov. (Gigartinales, Rhodophyta), a species from the tropical Western Atlantic with superficial spermatangia. Phycologia 25:313-320

Bird CJ, Rice EL (1990) Recent approaches to the taxonomy of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) and the *Gracilaria verrucosa* problem. Hydrobiologia 204/205, 111-118

Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R, Hernandez-Gonzalez MC, Norambuena, R (2001) Red algal farming in Chile. Aquaculture 194:203-220

Dawson EY (1949) Studies of the northeast Pacific Gracilariaceae. Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation 7: 1-105

Fredericq S, Hommersand MH (1989a) Proposal of Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. J Phycol 25:213-27

Fredericq S, Hommersand MH (1989b) Comparative morphology and

taxonomic satatus of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Phycol 25:228-243

Fredericq S, Hommersand MH (1990a) Diagnoses and Key to the genera of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). Hydrobiologia 204/205:173-8

Fredericq S, Hommersand MH (1990b) Morphology and systematics of *Holmsella pachyderma* (Pterocladiophilaceae, Gracilariales). Br. J. Phicol 25:39-51

Freshwater DW, Fredericq S, Butler BS, Hommersand MH, Chase MW (1994) A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbc*L. Proc Natl Acad Sci USA 91:7281-7285

Gabrielson PW, Garbary DJ, Scagel RF (1985) The nature of ancestral red algae: inferences from a cladistic analysis. Biosystems 18:335-346

Garbary DJ, Gabrielson PW (1990) Taxonomy and evolution. In: K.M.Cole and R.G. Sheath (eds.), Biology of the red algal, 477-498. Cambridge University Press, Cambrigde UK

Graham LE, Wilcox LW (2009) Algae. Prentice-Hall, New Jersey. 640 pp

Kylin H (1930) Über die Entwicklungsgeschichte der Florideen. Lunds Universitets Arsskrift, ny foeljd, Avd.2 26 :1-104, pls.1-28

Machiavello J, Saito R, Garófalo G, Oliveira EC (1999) A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown *in vitro*. Hydrobiologia 399: 105-108

McLachlan J, Bird CJ (1986) *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and Productivity. Aquatic Botany, 26:27-49

Müller KM, Oliveira MC, Sheath RG, Bhattacharya D (2001) Ribossomal DNA Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. Am J Bot 88: 1390-1400

Norton TA, Melkonian M, Andersen RA (1996) Algal biodiversity. Phycologia 35: 308-326

Nunes JMC (2005) Rodofíceas Marinhas Bentônicas do Estado da Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Oliveira EC (1984) Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta): An experience with the western Atlantic species. Hydrobiologia 116/117

Oliveira EC, Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In: Akatsuka, I. (ed.) Biology of economic algae. SSB Academic Publishing, The Hague, pp 185-226

Oliveira EC (1998) The seaweed resources of Brazil. In Critchley AT & Ohno M (eds), Seaweed Resources of world, pp 366-371 (JICA), Yokosuka, Japan

Oliveira MC, Batthacharya D (2000) Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endossimbiotic origin of algal plastids. Am J Bot 87: 482-492

Oliveira EC, Absher TM, Pellizari FM, Oliveira MC (2009) The Seaweed Flora of Admiralty Bay, King George Island Antarct. Polar Biol 32: 1639-1647

Plastino EM, Oliveira EC (1996) Approaches to the identification of terete Brazilian Gracilariaceae. Hydrobiologia 326/327, 145-148

Ragan MA, Bird CJ, Rice EL, Gutell RR, Murphy CA, Singh RK (1994) A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7276-80

Santelices, D. & Doty, M.S. 1989. A review of *Gracilaria* farming. Aquaculture, 78:95-133

Saunders GW, Hommersand MH (2004) Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. Am J Bot 91: 1494-1507

Soriano-Marinho E, Morales C, Moreira WCS (2002) Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil. Aquaculture Research, 33:1081-1086

Soriano-Marinho E, Camara MR, Cabral, TM, Carneiro MAA (2007) Preliminary

evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. Aquaculture Research, 38: 182-187

Troell M, Halling,C, Neori,A., Buschmann AH, Chopin,T., Yarish C, Kautsky N (2003) Integrated Mariculture: Asking The Right Questions. Aquaculture 226:69-90

Yamamoto H (1978) Systematics and anatomical study of the genus *Gracilaria* in Japan Mem Fac Fish Hokkaido Univ. 25: 97-152

Yoon HS, Müller KM, Shealth RG, DF Bhattacharya D (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). J Phycol 42: 482-492

Capítulo 2

The Gracilariaceae Germoplasm Bank of The University of Sao Paulo, Brazil – A DNA Barcoding Approach

Emmanuelle S. Costa[1], Estela M. Plastino[1], Rosario Petti[1], Eurico C. Oliveira[1,2] and Mariana C. Oliveira[1]

[1]Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, R. do Matão 277, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

[2]Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Corresponding author: mcdolive@usp.br
Telephone: 55-11-30917630
Fax: 55-11-30917547

Resumo

O Banco de Germoplasma da Universidade de São Paulo possui 50 amostras coletadas sobretudo no Brasil, mas também em outros lugares do mundo. Este banco tem sido usado como fonte de material para pesquisas desenvolvidas localmente e no exterior. A família Gracilariaceae com mais de 200 espécies, com algumas de alto valor econômico tem sido extensivamente estudadas; buscando-se solucionar os problemas taxonômicos que ainda persistem devido à existência de espécies crípticas, plasticidade fenotípica e à ampla distribuição geográfica. O reconhecimento das espécies baseado na morfologia é possível apenas na presença de estruturas de reprodução. No caso das algas mantidas em cultura por longos períodos de tempo, a identificação é mais problemática devido à modificação morfológica considerável. O uso de marcadores moleculares tem se mostrado uma ferramenta eficiente para elucidar problemas taxonômicos do grupo. Neste trabalho nós sequenciamos a região 5' do gene *cox*1 para 41 amostras e a região plastidial UPA para 45 amostras, cobrindo todas as 50 amostras do banco. Em adição, o *rbc*L foi sequenciado para os agrupamentos de *cox*1/UPA totalizando 14 amostras. Treze espécies diferentes foram identificadas combinando análises morfológicas anteriores e análises moleculares. Nossas análises indicam que *cox*1 e UPA são marcadores eficientes para a delineação das espécies de Gracilariaceae. Em adição ao DNA "barcode" para as amostras de Gracilariaceae do Banco de Germoplasma e a identificação molecular das espécies tornará este banco ainda mais útil para futuras pesquisas como espécies que podem ser facilmente confirmadas.

Palavras chave: *cox*1, DNA barcoding, Banco de Germoplasma, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *rbc*L, UPA.

Abstract

The Gracilariaceae germplasm bank of the University of São Paulo has 50 strains collected mostly in Brazil, but also from other places in the world. This bank has been used as a source of material for research developed locally and abroad. The family Gracilariaceae, with over 200 species, some of high economic value, has been extensively studied; even so, taxonomic problems still persist due to the existence of cryptic species, phenotypic plasticity, and broad geographic distribution. Recognition of species based on morphology is usually possible only in the presence of reproductive structures. In the case of algae kept in culture for long periods of time the identification is even more problematic due to considerable morphological modification. The use of molecular markers has been shown to be an efficient tool to elucidate taxonomic problems in the group. In this work we sequenced the 5' end of the *cox*1 gene for 41 strains and the UPA plastid region for 45 strains, covering all the 50 strains in the bank. In addition, the *rbc*L for representatives of the *cox*1/UPA clusters was sequenced for 14 strains. Thirteen different species were identified combining previous morphological analysis and the molecular markers. Our analyses indicate that *cox*1 and UPA are suitable markers for the delineation of species of Gracilariales. The addition of the DNA barcode tag to the samples in the Gracilariaceae germplasm bank and the molecular identification of the species will make this bank even more useful for future research as the species can be easily traced and confirmed.

Key words: *cox*1, DNA barcoding, germplasm bank, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *rbc*L, UPA.

Introduction

The family Gracilariaceae is widely distributed on tropical and temperate marine coasts of the world. The main genera in the family are *Gracilaria* Greville with around 167 species and *Gracilariopsis* E. Y. Dawson with 20 species (Algaebase, Guiry and Guiry 2010). These seaweeds have a large economic importance as the main global source of agar (Oliveira et al. 2000). This phycocolloid, present on the cell walls, is largely used by pharmaceutical and food industries by Oliveira and Plastino (1994). The quantity and quality of the agar varies among species (Macchiavello et al. 1999; Skriptsova and Nabivailo 2009).

In spite of the great effort applied to understand the biology of the group, taxonomic problems still persist due to phenotypic plasticity, the occurrence of cryptic species, and the impossibility of species identification in the absence of male and cystocarpic reproductive structures (e.g. Fredericq and Hommersand 1989; Gurgel et al. 2003, 2004; Oliveira 1984). Many approaches have been undertaken to solve problems of species identification as an alternative to morphology (cf. Oliveira and Plastino 1994; Plastino and Oliveira 1996). One of those alternatives was attempted hybridization (Plastino and Oliveira 1988b, 1990). To accomplish that, E. C. Oliveira and E. M. Plastino have established a germplasm collection of Gracilariaceae strains for crossing experiments (Plastino et al. 1995; Plastino and Oliveira 1988b, 1990, 1996, 1997, 2000). The germplasm bank of the Laboratory of Marine Algae of University of São Paulo (LAM-USP) has at this moment 50 strains of Gracilariaceae in culture, some kept in vitro for more than 30 years, collected mostly in Brazil, but also has some strains from other parts of the world (Lourenço and Vieira 2004).

This bank has been used as a source of material for several investigations, contributing to the knowledge of different aspects of this economically important group of algae. The life history of some species, most of Brazilian coast but also from abroad, have been completed in vitro: *Gracilaria birdiae* (Costa and Plastino 2001); *G. caudata* and *G. cornea* (Oliveira and Plastino 1984); *G. chilensis* (Plastino and Oliveira 1984); *G. domingensis* (Guimarães et al. 1999); and *G. tenuistipitata* (Barufi et al. 2010). Physiological aspects related to growth rates (Ferreira et al. 2006; Plastino et al. 1998, 2004; Ursi et al. 2008; Ursi and Plastino 2001; Yokoya and Oliveira 1992a, b, 1993), pigment characterization (Barufi et al. 2010; Costa and Plastino 2011; Guimarães et al. 2003; Plastino et al. 2004), photosynthetic and

respiratory characterization (Ursi et al. 2003), enzymatic activity (Chow et al. 2004, 2007; Chow and Oliveira 2008; Collén et al. 2003; Lopes et al. 1997, 2002; Rossa et al. 2002), and polysaccharide content (Guimarães et al. 2007) have been studied using strains from the germplasm bank. Furthermore, some strains have been used in color inheritance studies (Costa and Plastino 2001, 2011; Guimarães et al. 2003; Plastino et al. 1999, 2004), ultrastructure characterization (Bouzon et al. 2000, 2011; Guimarães and Plastino 1999; Plastino and Costa 1999, 2001), axenic tissue cultures (Ramlov et al. 2009; Yokoya 2000), phylogeny and systematic studies (Bellorin et al. 2002; Bird and Oliveira 1986), and molecular studies (Falcão et al. 2008, 2010; Hagopian et al. 2002, 2004; Nyvall et al. 2011).

Once in culture strains of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* may change their morphology and, most of the time, are not reproductive, what makes species identification very difficult if not impossible. Therefore there is the need to implement a more direct approach, based on the use of molecular markers tags, for the identification and tracking of the species in the germoplasm bank.

Different molecular markers have been used for Gracilariales: the nuclear gene coding for the small subunit of ribosomal RNA (SSU rDNA); the internal transcribed spacers of ribosomal genes (ITS); and the *rbc*L gene coding for RUBISCO large subunit (Bellorin et al. 2002, 2008; Bhattacharya et al. 1990; Goff et al. 1994; Gurgel et al. 1999). These markers proved to be suitable for aiding in species identification and for phylogenetic analysis within the group, but are of relatively large size, requiring some effort for amplification and sequencing with the need for several internal primers, which adds up to a high cost of resources and time.

On the other hand, the technique of DNA barcoding is a fast, practical and an uniform system, based on PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of a relatively short (~400-700 bp) DNA fragment that can be fully sequenced with the same two primers used in PCR (Savolainen et al. 2005). Hebert et al. (2003) proposed the use of the 5’ end of the mitochondrial gene coding for cytochrome oxidase 1 (COI) to facilitate the rapid identification of specimens and as a powerful ally in the understanding the existing biodiversity. Given the difficulties that exist in species identification in several red algae, Saunders (2005) proposed and developed primers for the use of the *cox*1 for DNA barcoding in this group of organisms. Another region that has been proposed by Sherwood and Presting (2007) as a DNA

barcode for photosynthetic organisms is the UPA (Universal Plastid Amplicon), which is part of the chloroplast gene coding for the large ribosomal RNA (23SRNAr).

In this study, we have sequenced the 5´end of *cox*1 and the UPA region of Gracilariaceae kept in culture in the LAM-USP germplasm bank, with the goal to DNA barcode each strain in culture and to confirm the original species identification based on morphology. The *cox*1 and UPA sequences were compared and grouped. Chloroplast DNA sequences for the *rbc*L were obtained for each of the different groups. The determination of the species in culture was done combining the previous identification based on morphology with the molecular data obtained in this work.

Materials and Methods

Cultures conditions

Samples were collected from several locations (Table 1) and transported to the laboratory. The unialgal cultures were established from apical segments or spores. As soon as the algae were brought to the lab, a careful process for the removal of contaminants using brushes under stereoscopic microscope was performed. Successive cleanups were performed at 2-4 days, and during this period, algae are kept in sterile seawater without nutrient by Plastino and Oliveira (1990). Once isolated, cultures were maintained in von Stosch enriched seawater with modification by Ursi and Plastino (2001), diluted to 50% with sterile seawater (32 psu), and kept in a temperature-controlled room at 25±1°C, under 30 µmol photons m−2 s−1 PAR provided by 40-W daylight fluorescent tubes, and on a 14-h light/10-h dark cycle. The medium was renewed monthly.

Before DNA extraction, apical fragments of each sample were transferred to Erlenmeyer flasks with 50 mL of enriched seawater for two weeks. Cultures were maintained under 150 µmol photons m−2 s−1 PAR and aerated for 30 min h−1. The medium was renewed weekly. After this period, the algae were rapidly rinsed in fresh water, blotted dry, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C.

DNA extraction and PCR amplification

DNA was extracted from approximately 30 mg of frozen samples grinding in liquid nitrogen and using the method described by Bellorin et al. (2002). The mitochondrial *cox*1 was amplified and sequenced using the synthetic primers GazF1 and GazR1 described by Saunders (2005). The plastidial UPA was amplified and sequenced using the primers p23Sv_f1 and p23Sv_r1 described by Sherwood and Presting (2007). The plastidial *rbc*L was amplified with the primers FrbcL and RbcS described by Freshwater et al. (1994). Amplification conditions for a total volume 50 µL were: 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM each dNTP, 0.2 mM each primer, 2 - 3 ng of genomic DNA, and 1.25 U of Taq DNA polymerase (GibcoBRL, Life Tecnologies, Gaithersburg, MD, USA). All PCR reactions were performed in a termocycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).The PCR parameters for *cox*1 were: 94^0C for 5 min, 35 cycles of 94^0 C for 30 seg, 47^0C 1 min and 72^0C for 2 min followed by a final extension step at 72^0C for 7 min. For amplifying the *rbc*L region, the same parameters were used except for the annealing temperature, which was reduced to 45^0 C. To ensure the purity of reagents in all PCR reactions, negative controls that included all reagents except DNA template were performed. PCR products were purified using the GFX purification kit (GE Healthcare Life Sciences) following the manufacture's recommendation.

Sequencing and alignments

PCR products were directly sequenced using Big Dye kit and standard methods on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). For *cox*1 the same PCR primers were used; for *rbc*L the PCR primers, plus the internal primers were used described by Freshwater et al. (1994). The sequences were manually assembled using the BioEdit (Hall 1999) and divergent positions were checked using the chromatograms. Consensus sequences were compared to sequences in GenBank using BLASTN (Altschul et al. 1990).

The consensus *Gracilaria* and *Gracilariopsis cox*1, UPA, and *rbc*L sequences were aligned with the ClustalW within the BioEdit together with sequences from the GenBank including the rbcL sequences chosen as outgroups *Curdiea racovitzia* Hariot and *Melanthalia abscissa* (Turner) J.D. Hooker and Harvey. A matrix of 57

sequences and 664 positions was assembled for *cox*1, for the UPA a matrix of 56 sequences and 370 positions, and for the *rbc*L a matrix of 78 sequences and 1393 positions was assembled, all three excluding positions corresponding to amplification primers.

Phylogenetic inferences

Phylogenetic analysis were performed using PAUP* 4.0b8 (Swofford 2000) and MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Evolution models for the *rbc*L analyses were selected using MrModeltest 2.2 (Posada and Crandall 1998). For *cox*1, UPA, and *rbc*L matrices a Neighbor-Joining (NJ) analysis with 2000 replicates of bootstrap was performed. For *rbc*L trees were inferred by: Maximum Parsimony (MP) heuristic search, with starting trees obtained by stepwise addition, with random sequence addition (10 replicates) using tree bisection-reconnection (TBR) branch-swapping algorithm and with 2000 replicates of bootstrap; and MrBayes (v3.1.2) two runs with 4 chains, with 4,000,000 generations sampled every 100 (initial 100000 generations were discarded as burn in).

Results

The germplasm bank has a total of 50 samples of Gracilariaceae, of those 33 were originated from Brazil and 17 from abroad (Table 1). Sequences for the 5´end of *cox*1 were obtained for 41 samples and presented 16 unique sequences that grouped in nine clusters representing different species. Sequences for the UPA plastid region were obtained for 45 samples and presented 13 unique sequences that grouped in clusters representing different species. Sequences for *rbc*L were obtained for 14 samples selected from the *cox*1/UPA sequences clusters, plus the previously sequenced *rbc*L of *G. tenuistipitata* strain from the germplasm bank.

The UPA region was easier to amplify and sequence compared to *cox*1 based on the number of PCR and sequencing reactions needed to obtain each consensus sequence. For 45 UPA sequences, 47 PCR and 106 sequencing reactions were performed, whereas to obtain 41 *cox*1 sequences, 76 PCR and 284 sequencing reactions were performed, thus indicating that the effort spent to obtain *cox*1 sequences is higher compared to UPA. As a consequence, around 2.5 fold more

reagents were needed to obtain *cox*1 sequences, than to obtain a similar number of UPA sequences.

Intraspecific variation for *cox*1 was found for the following species: *G. caudata* (0 – 0.8%); *G. gracilis* (0 – 0.5%); *G. cornea* (0 – 0.8%); and *Gp. tenuifrons* (0 – 0.3%). No intraspecific variation was observed for UPA.

Interspecific variation for *cox*1 was: 9.1 – 13.7% for *Gracilaria* species; 5.8 – 6.5%for *Gracilariopsis* species; and 11.1% – 15.7% between *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species. Interspecific variation for UPA was: 2.2 – 5.2 % for *Gracilaria* species; 0.8 – 3.7% for *Gracilariopsis* species; and 3.9 – 7.1% between *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species.

The *cox*1 and UPA sequences obtained for the germplasm bank samples, plus available sequences in the GenBank were clustered using NJ (Fig. 1 and 2). In both analyses the genera *Gracilaria* and *Gracilariopsis* were segregated. For the *cox*1 analysis four groups were formed for *Gracilariopsis*: one containing all the *Gp. tenuifrons* from several locations of Brazil and from Venezuela; one for *Gp. longissima* from the eastern north Atlantic; one for *Gp. lemaneiformis* from Equador; and one for *Gp. andersonii* from Canadá (Fig. 1). For UPA the same clusters were formed with the exception of *Gp. andersonii* not included in the analyses due to the lack of UPA sequences and with the addition of the only UPA sequence of *Gp. mclachlanii* (Fig. 2).

Analyses *cox*1 and UPA sequences of *Gracilaria* sequences from the germplasm bank grouped in clusters or isolated branches representing six and nine lineages respectively. *Gracilaria caudata* samples from the state of Ceará, in northeastern Brazil formed a cluster sister to a sample from the state of São Paulo, in south-eastern Brazil, with a *cox*1 intraspecific divergence of 6 bp (0.8%) between them. For UPA a cluster for *G. caudata* samples was also formed, but without intraspecific variation. Samples of *G. cornea* cultivated in Israel (originally collected in the Caribbean), Brazil, and Mexico formed a cluster both in the *cox*1 and UPA analysis with a *cox*1 intraspecific variation of 0-5 bp (0 – 0.8%). For *G. birdiae* only UPA sequence was obtained, showing the close relationship of this species to *G. cornea* (only 0.3% divergence). Samples of *G. gracilis* from Argentina, Portugal, Namibia, Brazil, and Norway grouped both in the *cox*1, with an intraspecific variation of 0-2 bp (0 – 0.5%), and in the UPA analysis without intraspecific variation. Samples of *G. isabellana* from Brazil grouped both in the *cox*1 and UPA analyses without

intraspecific variation. The other samples, *G. domingensis*, *G. tenuistipitata*, *Gracilaria* sp. BG0057, and *G. rangiferina* did not group with significant support to other species in the *cox*1 and/or UPA analyses.

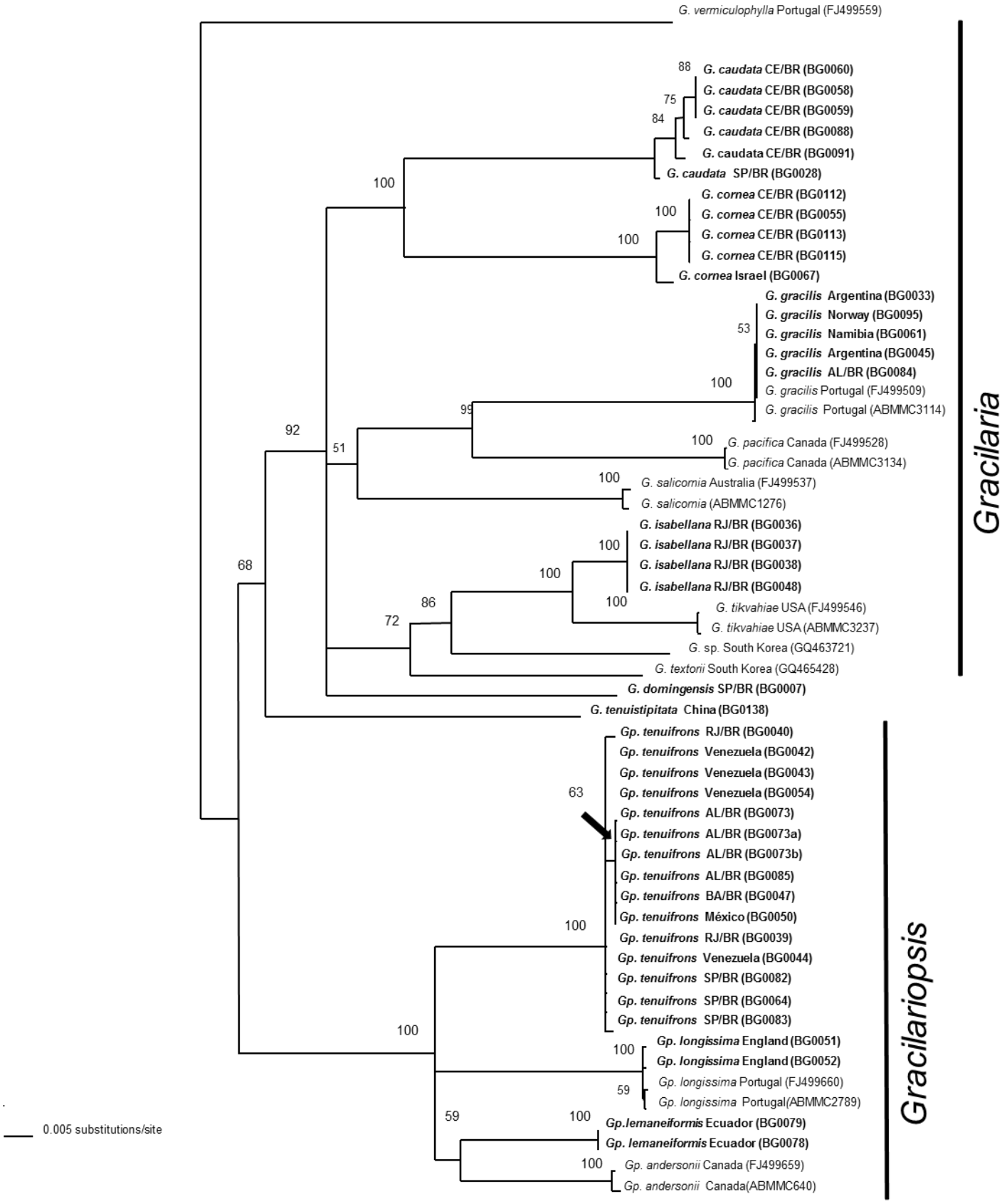


Fig 1 Neighbor-Joining (NJ) analysis for the *cox*1 region showing the relationships of the Gracilariaceae samples sequenced in this study (in bold) and available from databanks. Samples numbers are in brackets. Bootstrap support values for 2000 replicates are indicated on branches.

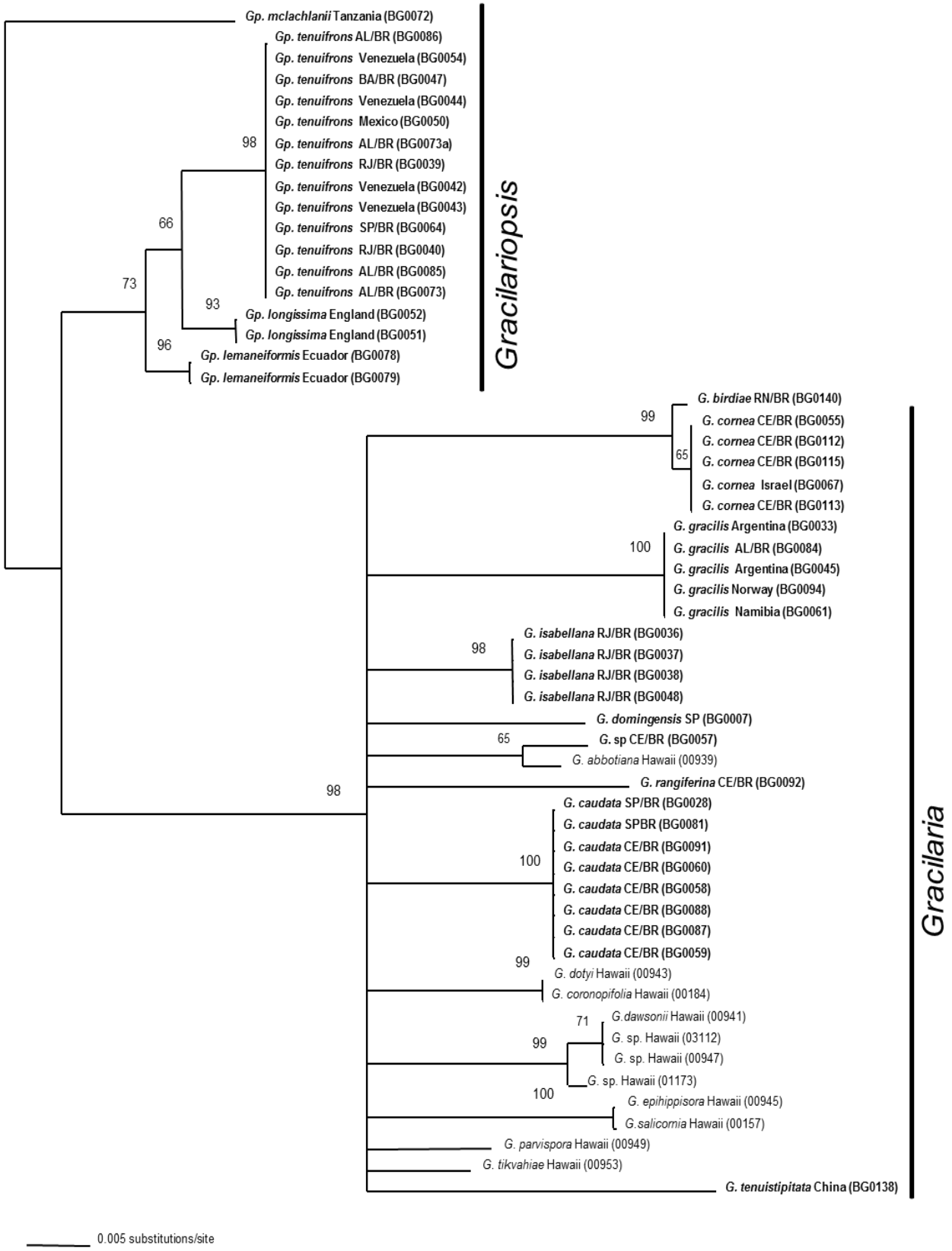


Fig 2 Neighbor-Joining (NJ) analysis for the UPA region showing the relationships of the Gracilariaceae samples sequenced in this study (in bold) and available from databanks. Samples numbers are in brackets. Bootstrap support values for 2000 replicates are indicated on branches.

The *rbc*L was sequenced for one or more representatives of each of the *cox*1 and /or UPA clusters (Table 1): *G. caudata*, *G. cornea*, *G. domingensis*, *G. gracilis*, *G. isabellana*, *G. rangiferina*, *Gp. tenuifrons*, *Gp. lemaneiformis*, *Gp. longissima*, and *Gp. mclachlanii*. The *rbc*L for *G. tenuistipitata* was previously sequenced for the same strain used in this work and was available from GenBank. The phylogenetic analyses for these *rbc*L sequences with others from Genbank are shown in Figure 3.

Using as outgroups two other Gracilariaceae genera, *Curdiea* and *Melanthalia*, the *Gracilariopsis* and *Gracilaria* species formed a monophyletic assemblage with the species of each genus forming also monophyletic groups. The genus *Gracilariopsis* was highly supported in all analyses, but *Gracilaria* was monophyletic only in the Bayesian analysis (0.89 a posteriori probability). The sequences obtained from the samples in the germplasm bank clustered with other available sequences from the same species obtained in the GenBank.

The *Gracilariopsis* species were divided in two groups, one containing species from the Atlantic and Eastern Pacific Oceans, and another group containing five species from Indian and Western Pacific Oceans, plus the flattened species *Gp. silvana* from Venezuela. The germplasm bank strains of *Gp. tenuifrons* from Brazil, Mexico, and Venezuela grouped with a *Gp. tenuifrons* from Guadaloupe in the Caribean. The sample of *Gp. longissima* from England grouped with another sample from the same species from Italy. The sample *Gp. lemaneiformis* from Ecuador grouped with another one from Peru. The sample of *Gp. mclachanii* grouped with a previously sequenced sample from Tanzania.

The *Gracilaria* species formed different clades with varying supports. A basal clade was formed only in the Bayesian analyses joining *G. vermiculophylla*, *G. chilensis*, and *G. tenuistipitata*. The strains of G. caudata from Brazil grouped with *G. caudata* from FL, USA; *G. cornea* from Brazil grouped with another one from Venezuela; *G. gracilis* from Brazil grouped with another sample of the same species from Italy; *G. domingensis* from Brazil grouped with another sample of the same species also from Brazil; *G. isabellana* from Brazil grouped with another sample of the same species from Venezuela (as *G. lacinulata* in GenBank); and *G. tenuistipitata* from China grouped with another sample of the same species from India.

Considering the original identification based only on morphology of the strains collected in nature and isolated for in vitro culture in the germplasm bank, in most

cases this identification was corroborated by the addition of the molecular markers, or the original identification could not pinpoint the species (Table 1). In a few cases the molecular markers results did not corroborate the original morphological identification: BG0007 originally identified based on morphology as *G. cervicornis* and BG0005 identified as *G. mammillaris*, based on the molecular markers are both *G. domingensis*; and BG0050 originally identified as *G. caudata* based on the molecular markers is *Gp. tenuifrons*.

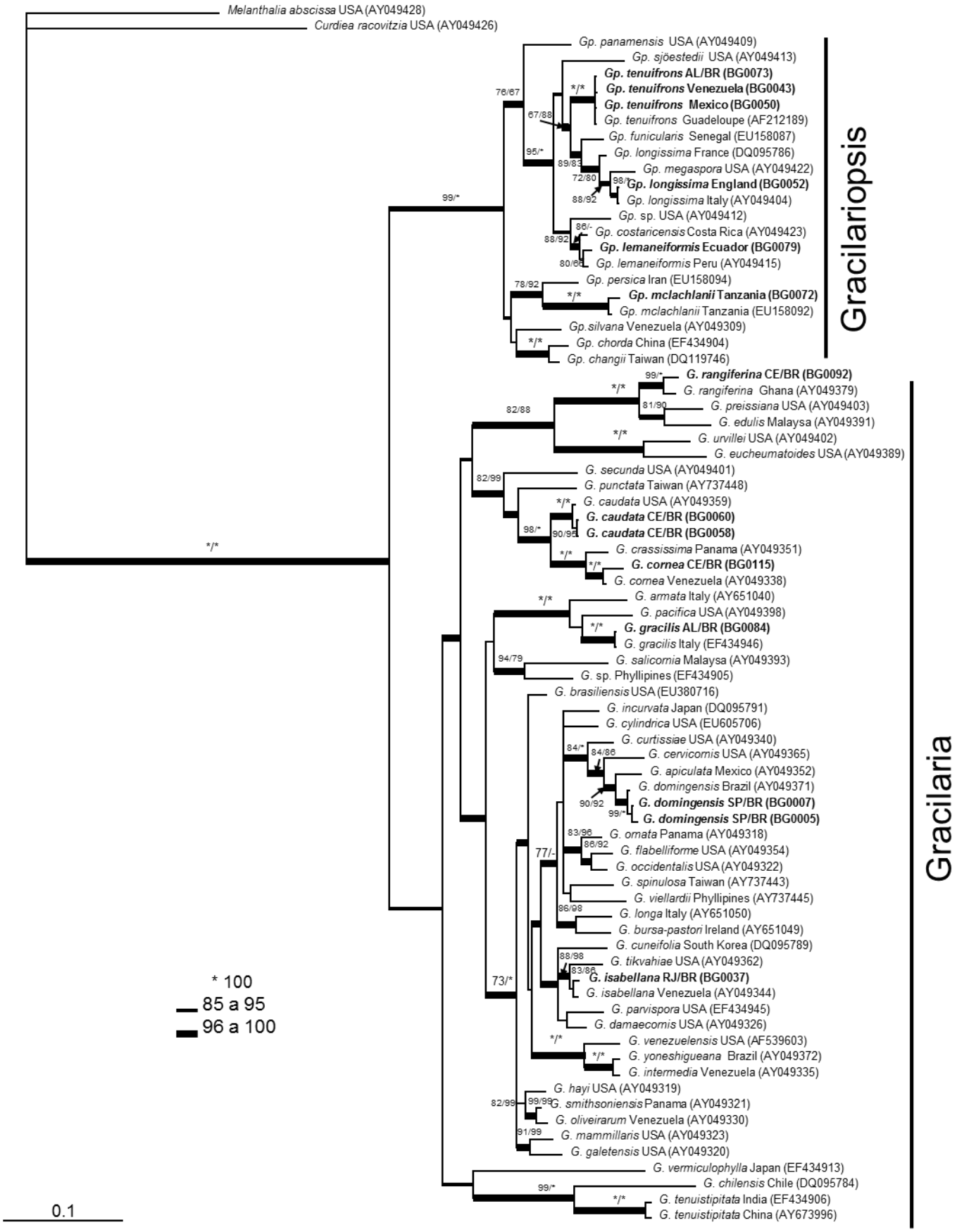


Fig 3 Consensus tree derived from Bayesian analyses of *rbc*L sequences. Bootstrap supports (2000) replicates are shown on the branches as follow: Maximum Parsimony (MP), neighbor-Joining (NJ). Thick branches indicated bayesian posterior.

Table 1. Strains maintained in culture in the Gracilariaceae Germplasm Bank at the University of São Paulo

Bank #	Collector	Date	Collection site		GPS Latitude/Longitude	SPF	*cox*1	UPA	*rbc*L
BG0005	E.Oliveira	28.10.81	Praia Dura	Ubatuba, SP	23^{0}31'40.57 S, 45^{0}12'54.60"W	26055	JQ843327	JQ907436	JQ843358
BG0007	E.Plastino	11.12.82	Saco de São Francisco	São Sebastião, SP	23^{0}49'01.0"S, 45^{0}24'26.23"W	26774	JQ843329	JQ907438	JQ843359
BG0094	E.Oliveira	82	Oslo	Noruega				JQ907441	
BG0095	E.Oliveira	82	Oslo	Noruega			JQ843333		
BG0028	E.Plastino	25.04.85	Praia Dura	Ubatuba, SP	23^{0}31'40.57"S, 45^{0}12'54.60"W		JQ843317	JQ952643	
BG0033	E. Oliveira	29.03.86	Puerto Madryn	Argentina			JQ935792	JQ952651	
BG0045	E.Oliveira	24.03.86	Puerto Madryn	Argentina			JQ935793	JQ952652	
BG0036	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W	52189	JQ843335	JQ907448	
BG0037	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W	52190	JQ843338	JQ907454	JQ843361
BG0038	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W	52191	JQ843337	JQ907453	
BG0039	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W		JQ935796	JQ952655	
BG0040	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W		JQ843354	JQ952663	
BG0048	E.Plastino	06.11.87	Cabo Frio	Cabo Frio, RJ	22^{0}45'16.89"S, 41^{0}53'03.06"W	52191	JQ935794	JQ952653	
BG0047	E.Oliveira	16.12.87	Valença	BA	13^{0}22'26.49"S, 39^{0}04'03.36"W	27958	JQ935795	JQ952654	
BG0042	M.Aponte	30.03.89	Arraya	Venezuela	10^{0}14'14.33"N, 69^{0}01'04.36"W	52027	JQ843353	JQ952662	
BG0043	M.Aponte	30.03.89	Arraya	Venezuela	10^{0}14'14.33"N, 69^{0}01'04.36"W	52027	JQ935800	JQ952661	JQ843368
BG0044	M.Aponte	30.03.89	Arraya	Venezuela	10^{0}14'14.33"N, 69^{0}01'04.36"W		JQ843351	JQ907472	
BG0054	M.Aponte	30.03.89	Arraya	Venezuela	10^{0}14'14.33"N, 69^{0}01'04.36"W		JQ843346	JQ907470	
BG0050	E.Oliveira	07.06.89	Baja California	Mexico	32^{0}29'48.12"N, 116^{0}39'47.37"W	54484	JQ935798	JQ952659	JQ843366
BG0058	E.Oliveira	16.09.89	Guajiru	Traíri, CE	3^{0}24'47.89"S, 39^{0}02'46.96"W	55510	JQ935789	JQ952644	JQ843355
BG0059	E.Oliveira	16.09.89	Guajiru	Traíri, CE	3^{0}24'47.89"S, 39^{0}02'46.96"W	55511	JQ843319	JQ952645	
BG0060	E.Oliveira	16.09.89	Guajiru	Traíri, CE	3^{0}24'47.89"S, 39^{0}02'46.96"W	55512	JQ843320	JQ952646	JQ843356
BG0055	E.Oliveira	16.09.89	Guajiru	Traíri, CE	3^{0}24'47.89"S, 39^{0}02'46.96"W	54946	JQ843324	JQ907432	
BG0057	E.Oliveira	16.09.89	Guajiru	Traíri, CE	3^{0}24'47.89"S, 39^{0}02'46.96"W			JQ907443	
BG0064		11.05.90		Itanhaém,SP	24^{0}10'34.19"S, 46^{0}47'28.11"W		JQ843349	JQ952657	

Tabela 1. Continued

Bank #	Collector	Date	Collection site		GPS Latitude/Longitude	SPF	*cox*1	UPA	*rbc*L
BG0061	A.Critchley	12.89	Lüderitz	Namíbia			JQ843331	JQ907461	
BG0087	E.Plastino	28.02.92	Praia do Meirelles	Fortaleza, CE	$3^0$44’49.12”S, $38^0$28’57.39”W	55807		JQ952642	
BG0088	E.Plastino	28.02.92	Praia do Meirelles	Fortaleza, CE	$3^0$44’49.12”S, $38^0$28’57.39”W	55807	JQ843320	JQ952647	
BG0091	E.Plastino	26.02.92	Praia do Pacheco	Fortaleza, CE	$3^0$44’49.12”S, $38^0$28’57.39”W	55813	JQ935790	JQ952648	
BG0112	E.Plastino	02.92	Guajiru	Traíri, CE	$3^0$24’47.89”S, $39^0$02’46.96”W	55662	JQ843321	JQ907428	
BG0113	E.Plastino	02.92	Guajiru	Traíri, CE	$3^0$24’47.89”S, $39^0$02’46.96”W	55662	JQ935791	JQ952650	
BG0115	E.Plastino	02.92	Guajiru	Traíri, CE	$3^0$24’47.89”S, $39^0$02’46.96”W	55662	JQ843323	JQ952649	JQ843357
BG0061	A.Critchley	12.89	Lüderitz	Namíbia			JQ843331	JQ907440	
BG0067	A.Critchley	09.92	Lüderitz	Israel			JQ843322	JQ907429	
BG0072	E.Oliveira	06.92	Zanzibar	Tanzania				JQ907469	JQ843365
BG0073	E.Plastino	21.01.93	Lagoa do Mundaú	Maceió, AL	$9^0$36’59.82”S, $35^0$48’00.92”W	55700	JQ935799	JQ952660	JQ843367
BG0073a	E.Plastino	21.01.93	Lagoa do Mundaú	Maceió, AL	$9^0$36’59.82”S, $35^0$48’00.92”W	55700	JQ843347	JQ952656	
BG0073b	E.Plastino	21.01.93	Lagoa do Mundaú	Maceió, AL	$9^0$36’59.82”S, $35^0$48’00.92”W	55700	JQ843348		
BG0092	E.Plastino	08.04.93	Guajiru	Traíri, CE	$3^0$24’47.89”S, $39^0$02’46.96”W	56055		JQ907456	JQ843362
BG0081	E.PLastino	07.93	Praia Dura	Ubatuba, SP	$23^0$31’40.57”S, $45^0$12’54.60”W	52029		JQ907427	
BG0082	E.Plastino	07.93	Praia Dura	Ubatuba, SP	$23^0$31’40.57”S, $45^0$12’54.60”W	56086	JQ935801		
BG0083	E.Plastino	07.93	Praia Dura	Ubatuba, SP	$23^0$31’40.57”S, $45^0$12’54.60”W	56987	JQ843350		
BG0084	E.Plastino	03.03.94	Puerto Madryn	Argentina		55734	JQ843332	JQ907242	JQ843360
BG0085	E.Plastino	03.03.94	Praia de Pajuçara	Maceió, AL	$9^0$40’03.27”S, $35^0$42’43.69”W	55734	JQ935797	JQ952658	
BG0086	E.Plastino	03.03.94	Lagoa do Mundaú	Maceió, AL	$9^0$36’59.82”S, $35^0$48’00.92”W	55734		JQ907471	
BG0078	E.Oliveira		Guaiqui	Equador			JQ843342	JQ907465	
BG0079	E.Oliveira		Guaiqui	Equador			JQ843343	JQ907466	JQ843363
BG0051	E.Oliveira		Menai Bridge	Inglaterra			JQ843345	JQ907468	
BG0052	E.Oliveira		Menai Bridge	Inglaterra			JQ843344	JQ907467	JQ843364
BG0138	E.Oliveira		Hainan	China				AY673996	AY673996
BG0140	M.Amaral		Rio do Fogo	Rio do Fogo, RN	$5^0$16’56.81”S, $35^0$23’22.30”W			JQ907430	

Discussion

The germplasm bank has been a very useful resource for several studies on Gracilariales. The main step in setting up the cultures is to achieve successful unialgal isolation. Once isolated, samples of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* can be maintained in vitro for a long time with relatively low cost and labor, because in low irradiance, the medium can be renewed only once a month. When someone wants to use a species from the bank in an experiment, apices are progressively cultivated in higher irradiance, and the medium is renewed weekly. Depending on the treatment, the species can be successfully propagated in one month.

The distinction of *Gracilaria* species is almost never possible, on morphological grounds, without the presence of cystocarps and male reproductive structures. On the other hand, species are distinguished based on gross morphology and vegetative anatomy what is generally subjective and cumbersome due to high morphological plasticity, what explains the frequent misidentifications and extensive synonymy. This confusion in nomenclature has practical consequences once some species have a high economic value, while most do not (Bellorin et al. 2002, 2004; Saunders 2009).

Although with a much smaller biodiversity species identification is even more difficult in the genus *Gracilariopsis*, once all taxa are terete and stringy, looking very much alike, with the sole exception of *Gp. silvana* Gurgel, which is flattened. In this genus species are separated mostly based on geographical distribution than on morphology and anatomy. This seemed adequate until some papers showed that some species of Gracilariales have a broad distribution and may be invasive (Bellorin et al. 2004; Saunders 2009)

Therefore, the use of short molecular tags for species identification, besides its academic value, is also a demand from the industry. Furthermore, molecular tags can be quite useful for field studies and to pinpoint the occurrence of invasive species. Saunders (2009) identified the invasive species *G. vermiculophylla* in Canadian waters using the 5' region of *cox*1 in routine DNA barcoding of Gracilariales.

Intraspecific variation for *cox*1 found for the *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species in this work was in some cases higher (up to 0.8%) than found by Saunders (2005; 1 or 2 bp ~0.2%) for several genera of Rhodophyta. Yang et al. (2007) used the *cox*1 (1245 bp) to evaluate the intraspecific variation in *G. vermiculophylla* from

Asia and found a pairwise divergence up to 11 bp (0.9%). These authors argue that if they were to analyze only the two extreme samples of *G. vermiculophylla* they might mistakenly identify the two as different species. They also state that due to the intraspecific variation, *cox*1 could also be used for phylogeography, the resolution of population structure, and conservation management. Similarly to what was found by Yang et al. (2007), *G. caudata* from SE coast diverged by 0.8% from strains of the same species from NE coast of Brazil, and *G. cornea* cultivated in Israel (but originally collected in the Caribbean region, A. Israel personal com.) diverged by 0.8% from strains of the same species from Brazil.

The group formed in *cox*1 analysis for *Gracilariopsis tenuifrons* from several locations of Brazil and from Venezuela corroborated previous crossing experiments performed with these strains, once populations separated by thousands of kilometers could cross and produce viable F1 generation (Plastino & Oliveira 1996).

The interspecific variation for *cox*1 found for *Gracilariopsis* (5.8 – 6.5%; 38 – 43 bp) was similar to the one found by Saunders (2005), but for *Gracilaria* (9.1 – 13.7%; 60 – 91 bp) the values were higher. Saunders (2005) found for this region that interspecific variation in several genera of Rhodophyta was around 30-40 bp, with some exceptions. Yang et al. (2007) found that for *cox*1 the interspecific nucleotide difference was also high among different species of Gracilariales (>41 bp, 3.2–16.1% of 1245 bp). Thus the use of *cox*1 proved to be adequate for DNA barcoding of species in the Gracilariales as it was previously demonstrated in various red algae by Saunders (2005, 2009) and confirmed by Robba et al. (2006).

As expected UPA sequences were more conserved and showed less intraspecific and interspecific variation, and as in *cox*1 (Sherwood et al. 2010), interspecific variation for UPA was relatively higher for *Gracilaria* species (2.2 - 5.2 %; 8 -19 bp), than observed for *Gracilariopsis* (0.8 - 3.7%; 3 -14 bp). Nonetheless, the interspecific variation found for UPA was enough to separate the species in the germplasm bank. Considering that the UPA is easier to amplify and sequence than *cox*1, UPA is a reliable molecular marker that can be used as a routine tag for the addition and tracking of strains in the culture collection. Sherwood et al. (2010) used the UPA on the survey of Rhodophyta from the Hawaiian Islands, and the marker was considered useful for biodiversity surveys.

There are still relatively few sequences of *cox*1 and UPA for Gracilariales species in the databanks. Therefore, to help in species identification, *rbc*L was

sequenced for one or more representatives of each of the *cox*1 and /or UPA clusters, as there are *rbc*L sequences for several species of Gracilariales available in GenBank. The *Gracilariopsis* species were recovered as a monophyletic assemblage with significant support in all the analysis, but the *Gracilaria* species were only recovered as a monophyletic assemblage in the Baysian analyses. Also, only in the Baysian analyses a basal clade within the *Gracilaria* species was formed joining *G. vermiculophylla*, *G. chilensis* and *G. tenuistipitata*. These results were similar to the ones obtained by Yang et al. (2007).

In a few cases the molecular markers results did not corroborate the original morphological identification: BG0007 originally identified as *G. cervicornis* and BG0005 identified as *G. mammillaris*, based on the molecular markers correspond to *G. domingensis*; while BG0050 originally identified as *G. caudata*, based on the molecular markers came out as *Gp. tenuifrons*. These discrepancies indicate that mistakes on the manipulation of the isolates along the 20 years of media and vial changes did occur. The occurrence of mistakes during manipulation of the isolates is further supported by the fact that *G. domingensis* is not found on the coast of São Paulo state. On what concerns *Gp. tenuifrons*, this species is not referred to Mexico, reinforcing the idea that there was some mistake with specimens labeling in the laboratory; besides, the original algae has a “verrucosa”-type spermatangia distribution, differently to what is found in *Gp. tenuifrons* that presents a “chorda”-type. These results highlight the importance a routine identification of the species kept in bank with molecular markers.

Conclusions

The addition of molecular markers to the germplasm bank allowed us to define 13 different species in the bank. The *cox*1 and UPA were suitable DNA barcode markers to help in the species identification of Gracilariaceae, although UPA demanded considerable less effort and material to be amplified. On the other hand, *cox*1 presents, in some cases, a low level of intraspecific variation and could be used to track individual strains of different populations of the same species, what can be also useful for the purpose of the germoplasm bank management. The addition of the DNA barcode tag to the samples in the Gracilariaceae germplasm bank and the

molecular identification of the species will make this bank even more useful for future research as the species can be easily traced and confirmed.

Acknowledgement

This research had support from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2007/51270-7) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; BrBOL 564945/2010-2). E. Costa thanks scholarship from CAPES. We thank technical support of Carolina de Oliveira Franco.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1990) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-402

Barufi JB, Oliveira EC, Plastino EM, Oliveira MC (2010) Life history, morphological variability and growth rates of the life phases of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta: Gracilariales) in vitro. Sci Mar 74: 297-303

Bellorin AM, Oliveira MC, Oliveira EC (2002) Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on SSU DNAr and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. J Phycol 38: 551-563

Bellorin AM, Oliveira MC, Oliveira EC (2004) *Gracilaria vermiculophylla*: A Western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. Phycol Res 52: 69-79

Bellorin AM, Buriyo A, Sohrabipour J, Oliveira MC, Oliveira EC (2008) *Gracilariopsis mclachlanii* sp. Nov. and *Gracilariopsis persica* sp. Nov. of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyceae) from the Indian Ocean. J Phycol 44:1022-1032

Bhattacharya D, Elwood HJ, Goff LJ, Sogin ML (1990) Phylogeny of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) based on sequence analysis of its small ribosomal RNA coding region. J Phycol 26:181-6

Bird CJ and Oliveira EC (1986) *Gracilaria tenuifrons* sp. Nov. (Gigartinales, Rhodophyta) a specie from the tropical western Atlantic with superficial spermatangia. Phycologia 25:313-320

Bouzon ZL, Miguens F, Oliveira EC (2000) Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). Cryptogamie Algologie 21: 33-47

Bouzon ZL, Schmidt EC, Almeida AC, Yokoya NS, Oliveira MC, Chow FF (2011) Cytochemical characterization and ultrastructural organization in calluses of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Micron 42: 80-86

Chow FF, Oliveira MC, Pedérsen M (2004) In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in the red alga *Gracilaria chilensis*. J Plant Physiol 161: 769-776

Chow FF, Capociama V, Faria R, Oliveira MC (2007) Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in the red

seaweed *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). Rev Bras Bot 30: 123-129

Chow FF, Oliveira MC (2008) Rapid and slow modulation of nitrate reductase activity in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta): influence of different nitrogen sources. J Appl Phycol 20: 325-332

Collén J, Pinto E, Pedersén M, Colepicolo P (2003) Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. Arch Environ Contam Toxicol 45:337-342

Costa VL and Plastino EM (2001) Histórico de vida de espécimes selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 24 (suppl): 491-500

Costa VL and Plastino EM (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

Falcão VDR, Tonon AP, Oliveira MC, Colepicolo P (2008) RNA Isolation method for polysaccharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J Appl Phycol 20:9-12

Falcão VDR, Oliveira MC, Colepicolo P (2010) Molecular characterization of nitrate reductase gene and its expression in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J Appl Phycol 22:613-622

Ferreira LB, Barufi JB, Plastino EM (2006) Growth of red and green strains of the agarophyte tropical *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 29: 185-190

Fredericq S and Hommersand MH (1989) Proposal of the Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. J Phycol 25:213-227

Freshwater DW, Fredericq S, Butler BS, Hommersand MH, Chase MW (1994) A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbc*L. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7281-7285

Goff LJ, Moon DA, Coleman AW (1994) Molecular delineation of species and species relationship in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). J Phycol 30:521-537

Guimarães M and Plastino EM (1999) Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). Acta Microsc 8 (Sup. C): 795-796

Guimarães M, Plastino EM, Oliveira EC (1999) Life-history, reproduction, and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Bot Mar 42:481-486

Guimarães M, Plastino EM, Destombe C (2003) Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Eur J Phycol 38: 165-169

Viana AG, Duarte MER, Ascêncio SD, Plastino EM, Noseda MD (2007) Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Bot Mar 50: 314-317

Guiry MD, Guiry GM (2010) Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org. Accessed 24 August 2011

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (1999) Characterization and biogeographic affinities of the red algal genus, *Gracilaria* (Gracilariales), in the Gulf of México. J Phycol 35 (suppl.):13

Gurgel CFD, Liao LM, Fredericq S, Hommersand MH (2003) Systematyics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta)

based on *rbc*L sequence analyses and Mophorlogical evidence. J Phycol 39:154-171

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (2004) *Gracilaria apiculata* and *G. flabelliformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta): restoring old names for common tropical western Atlantic species, including the recognition of three new subspecies, and a replacement name for "*G. lacinulata*". Cryptogamie, Algol. 25: 367-396

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95-98

Hagopian JC, Nyvall P, Oliveira MC (2002) Purification of Plastid DNA from an enriched rhodoplast fraction of the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. Plant Mol Biol Rep 20: 399 406

Hagopian JC, Reis M, Kitajima JP, Bhattacharya D, Oliveira MC (2004) Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights on the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. J Mol Evol 59:464-477

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B 270:313-321

Huelsenbeck JP and Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17:754-755

Lopes PF, Oliveira MC, Colepicolo P (1997) Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J Phycol 33:225-231

Lopes PF, Oliveira MC, Colepicolo P (2002) Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). Biochem Biophys Res Commun 295:50-54

Lourenço SO and Vieira AAH (2004) Culture collections of microalgae in Brazil:progress and constraints. Nova Hedwigia 79:149-173

Machiavello J, Saito R, Garófalo G, Oliveira EC (1999) A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown *in vitro*. Hydrobiologia 399: 105-108

Nyvall P, Collén J, Reis MS, Pedersén M, Setubal JC, Varani AM, Colepicolo P, Oliveira MC (2011) Analysis of expressed sequence tags from the agarophyte *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J Appl Phycol doi 10.1007/s10811-011-9681-4

Oliveira EC (1984) Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta): an experience with the Western Atlantic species. Hydrobiology 116/117:55-58

Oliveira EC and Plastino EM (1984) The life-history of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brazil. JJ Phycol 32: 203-208

Oliveira EC and Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In Akatsuka I (ed) Biology of economic algae. SSB Academic Publi. The Hague, pp 185-226

Oliveira EC, Alveal K, Anderson RJ (2000) Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. JJ Phycol 8: 345-377

Plastino EM and Oliveira EC (1988b) Sterelity barriers among species of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) from the São Paulo littoral, Brazil. British Phycological Journal 23: 267-271

Plastino EM and Oliveira EC (1990) Crossing experiments as an aid to the taxonomic recognition of the agarophyte *Gracilaria*. In Oliveira, E.C. de e Kautsky, N. (eds), Cultivation of seaweeds in Latin America**,** pp 127-133

Plastino EM, Paula EJ, Oliveira EC (1995) Técnicas de hibridación en macroalgas marinas. *In*: Alveal, K., Ferrario, M.E. & Sar, E. (eds.). Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, pp 479-487

Plastino EM and Oliveira EC (1996) Approaches to the identification of terete Brazilian Gracilariaceae. Hydrobiologia 326/327**:** 145-148

Plastino EM, Oliveira EC (1997) *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta)- restoring na old name from a common Western Atlantic alga. Phycologia 36: 225-232

Plastino EM, Ursi S, Heimbecker AMC (1998) Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta *In*: IV Congresso Latino Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Paula, E.J.; Cordeiro-Marino, M.; Pupo Santos, D.; Plastino, E.M.; Fujii, M.; Yokoya, N. (eds). Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo pp 359-369

Plastino EM and Costa VL (1999) Ultrastructure of vegetative branches of the red macroalga *Gracilaria* sp. (Gracilariales). Acta Microsc 8 (suppl): 793-794.

Plastino EM, Guimarães M, Matioli SR, Oliveira EC (1999) Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Gen Mol Biol 22: 105-108

Plastino EM and Oliveira EC (2000) *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) a new specie from the tropical South American Atlantic with terete frond and deep spermatangial conceptacles. Phycologia 41: 389-396

Plastino EM and Costa VL (2001) Anomalous plastids in a light green strain of the red macroalga *Gracilaria* sp. (Gracilariales). Acta Microsc 3(Sup. C): 315-316

Plastino EM, Ursi S, Fujii MT (2004) Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Phycol Res 52: 45-52

Posada D and Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics14: 817-818

Ramlov F, Plastino EM, Yokoya NS (2009) Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). Rev Bras Bot 32: 605-614

Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox*1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). Am J Bot 93:1101–1108

Rossa MM, Oliveira MC, Okamoto OK, Lopes PF, Colepicolo P (2002) The effect of visible light effect on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 14: 151-157

Saunders GW (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philos Trans R Soc 360:1879-1888

Saunders GW (2009) Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. Mol Ecol Resour 9: 140–150

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *Philos Trans R Soc* **360:** 1805 – 1811

Sherwood AR and Presting GG (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA

plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. J Phycol 43: 605–608

Sherwood AR, Kurihara, A, Conklin, KY, Sauvage, T, Presting, GG (2010) The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010: A summary of principal findings. Plant Biology 10: 258

Skriptsova AV and Nabivailo YV (2009) Comparison of three gracilarioids: growth rate, agar content and quality. J Appl Phycol 21:443-450

Swofford DL (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4, Sinauer, Sunderland

Ursi S and Plastino EM (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. Rev Bras Bot 24: 587-594

Ursi S, Pedérsen M, Plastino EM, Snoeijs P (2003) Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenois in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar Biol 142: 997-1007

Ursi S, Guimarães M, Plastino EM (2008) Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment contents of *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). Acta Bot Bras 22: 891-896

Yang EC, Kim MS, Geraldino PJL, Sahoo D, Shin J, Boo SM (2007) Mitochondril *cox*1 and plastid *rbc*L genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). J Appl Phycol 20: 161-168

Yokoya NS and Oliveira EC (1992a) 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 NS and Oliveira EC (1992b) Geographic distribution and growth responses to temperature variation of some South American red algae of economic importance. J Appl Phycol 4: 339-345

Yokoya NS and Oliveira EC (1993) Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development of South American agarophytes. Phycol Res 41: 283-293

Yokoya NS (2000) Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Phycol Res 48 :133-14

Capítulo 3

DNA "barcoding" e filogenia molecular das Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) na costa brasileira

Resumo

Os estudos moleculares das algas gracilarióides na costa brasileira foram baseados nos marcadores mitocondrial *cox*1 e plastidiais UPA e *rbc*L. A utilização de marcadores moleculares do tipo DNA "barcode" mostrou-se bastante eficiente na separação dos táxons estudados. As espécies de *Gracilaria* formaram um grupo monofilético claramente separado das espécies de *Gracilariopsis*. A maioria das algas gracilarióides da costa brasileira apresenta talo achatado e caracteres reprodutivos semelhantes, com espermatângio tipo "textorii", a exceção de *Gracilaria domingensis*. A aplicação da técnica de DNA "barcode" na identificação das espécies possibilitou o reconhecimento de novas ocorrências para o Brasil a exemplo de *G. hayi*, *G. damaecornis* e *Gracilariopsis silvana*, além de aumentar a área de distribuição de algumas espécies. Possibilitou também a resolução de algumas sinonímias presentes no grupo, contribuindo para diminuir a confusão taxonômica. A interpretação de nossos dados junto ao que se encontra na literatura mostra que ainda é necessário um investimento maior em estudos taxonômicos moleculares para a delimitação de algumas espécies.

Abstract

The molecular studies of gracilarioid algae on the Brazilian coast were based on mitochondrial *cox*1 and plastid markers UPA and *rbc*L. The use of DNA "barcode" molecular markers proved to be very efficient in the separation of the taxa studied. *Gracilaria* species formed a monophyletic group clearly separated from *Gracilariopsis* species. Most gracilarioid algae on the Brazilian coast have a flattened thallus and similar reproductive characters, presenting "textorii" espermatangia, except for *Gracilaria domingensis*. The application of DNA "barcode" technique on species

identification enabled the recognition of new records for Brazil such as *G. hayi*, *G. damaecornis* and *Gracilariopsis silvana*, besides increasing the area of distribution of some species. It also made possible the resolution of some synonyms present in the group, contributing to lower the taxonomic confusion. The interpretation of our data similar to what is found in the literature shows that we still need a bigger investment in molecular taxonomic studies for the delimitation of some gracilarioid species.

Introdução

A taxonomia das algas gracilarióides é bastante desafiadora devido à presença de poucas características diagnósticas utilizadas na identificação das espécies, a plasticidade morfológica apresentada pelo grupo e a grande diversidade de espécies. De modo que desde 1830 o gênero vem sendo submetido a uma história taxonômica dinâmica, baseada inicialmente em dados morfológicos (Fredericq & Hommersand 1989 a,b; Steentoft et al. 1995).

A caracterização através de dados moleculares tem-se mostrado taxonomicamente útil na discriminação das espécies de Gracilariaceae, onde várias espécies compartilham características morfológicas em comum (Bird et al. 1994). Cada vez mais se têm investido em estudos e técnicas que permitam melhorar a delimitação dos gêneros e espécies. Metodologias diversas foram empregadas na caracterização da família, dentre elas destacam-se: a contagem do número de cromossomos, restrita para algumas espécies (Bird & McLachlan 1982), testes de cruzamento (Oliveira & Plastino 1994), “fingerpriting” (McLachlan & Bird 1986), padrões de restrição do DNA (Goff et al. 1988; Bird & Rice 1990) e mais recentemente, no início da década de 1990, o uso de marcadores moleculares com base na comparação de sequências homólogas de DNA utilizada na solução de problemas taxonômicos do grupo (e.g. Bhattacharya et al. 1990, Destombe & Douglas 1991; Bird et al. 1994). Dos métodos empregados nos estudos taxonômicos da família Gracilariaceae o uso de ferramentas moleculares tem-se mostrado bastante útil pela rapidez com que se obtem os dados, podendo-se comparar as sequências, permitindo que seja aplicada a uma ampla amostragem (Bellorin et al. 2002).

Apesar dos inúmeros trabalhos desenvolvidos com as espécies da família Gracilariaceae, a maioria desses estudos foi realizado com espécies de águas

temperadas produtoras de ágar, as quais apresentam uma grande importância econômica. No entanto a maior parte das espécies que ocorrem em águas tropicais ainda é pouco estudada (Bellorin 2002).

Dados moleculares empregados no estudo dessas algas são obtidos basicamente do genoma do cloroplasto e do núcleo, mostrando-se úteis na distinção das espécies e na filogenia do grupo (Bellorin 2002, Gurgel et al. 2003; Gurgel et al. 2004a, b). Diferentes regiões do genoma vêm sendo utilizadas como marcadores moleculares, principalmente os genes nucleares que codificam para os RNAs ribossomais (rRNA), ("small subunit" rRNA gene; SSU rDNA e "large subunit rRNA gene" -LSU rDNA) e os espaçadores dos genes ribossomais ("internal transcribed spacers" - ITS) (Tai et al. 2001; Ross et al. 2003); o gene do cloroplasto que codifica a subunidade grande (*rbc*L) da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) (Hughey et al. 2001). Nas algas verdes (Chlorophyta) e plantas terrestres o gene *rbc*L está localizado no cloroplasto e o gene que codifica a subunidade pequena (*rbc*S) está localizado no núcleo, enquanto que nas algas vermelhas e nas algas cromófitas (Heterokontophyta) ambos os genes (*rbc*L e *rbc*S) estão localizados no cloroplasto com uma região espaçadora entre eles (Hagopian et al. 2004).

As sequências nucleotídicas do gene nuclear (SSU rDNA ou 18S) têm sido largamente usadas para propor a filogenia dos organismos. Essas sequências são caracterizadas por apresentar um mosaico de regiões conservadas e regiões variáveis que permitem o seu uso em um amplo espectro filogenético (Bird et al. 1992).

Sequências do *rbc*L tem-se mostrado menos conservadas e filogeneticamente mais informativas em nível abaixo de família do que outros marcadores usados em sistemática molecular de algas como SSU e LSU, além do mais o gene *rbc*L também é adequado para reconstrução filogenética (Freshwater et al. 1994; Gurgel et al. 2004b).

Espécies da família Gracilariaceae são comuns, mas de morfologia variável dificultando a sua identificação. Assim, análises de sequências de DNA têm sido largamente utilizadas para inferir parentesco filogenético, mostrando-se uma ferramenta útil na distinção de organismos que são difíceis de serem identificados através de métodos tradicionais (Maggs et al. 1992, Goff et al. 1994, Zuccarello & West 1997). Gurgel (2001) inferiu a filogenia global das Gracilariaceae com base nas sequências de *rbc*L de vários táxons, cujos resultados confirmaram a monofilia do

grupo. Bellorin (2002) mostrou três linhagens de Gracilariaceae baseado nas sequências de SSU, além de mostrar que o clado *Curdiea*/*Melanthalia* divergiu mais cedo na evolução da família.

Resultados obtidos por Bellorin (2002) mostraram que sequências de espécies de *Gracilaria* idênticas quanto ao SSU podem ser resolvidas como espécies individuais quando o espaçador ITS é comparado, indicando que sequências de SSU parecem não ser adequadas na separação de espécies proximamente relacionadas. Destombe & Douglas (1991) mostraram que uma grande quantidade de divergência genética permite sequências mais curtas de DNA serem taxonomicamente mais informativas em nível de espécie e observaram que o tamanho do espaçador em *Gracilaria* variou muito mais do que entre outras espécies de Rhodophyta e Chlorophyta.

Em resumo, o uso de marcadores moleculares na solução de problemas taxonômicos em Gracilariaceae tem gerado resultados muito satisfatórios, tendo os estudos filogenéticos se iniciado com sequências nucleotídicas dos genes SSU rDNA, *rbc*L e dos espaçadores ITS (Bhattacharya et al. 1990; Goff et al. 1994; Gurgel et al. 1999; Bellorin et al. 2002). Os dados com base em sequenciamento têm confirmado vários aspectos de sistemática e filogenia das Gracilariaceae, a exemplo da monofilia do grupo (Fredericq & Hommersand 1989a).

Os marcadores moleculares que foram empregados no início das pesquisas com biologia molecular de algas, embora tenham se mostrado adequados para as análises filogenéticas dentro do grupo das Gracilariales, são marcadores de tamanho relativamente grande (no caso do SSU rDNA e do *rbc*L) exigindo, portanto, um maior esforço para se obter as sequências, incluindo o uso de diversos “primers” internos, implicando portanto em um tempo de trabalho maior e um alto custo. O ITS, que é um espaçador nuclear já foi bastante utilizado em trabalhos desenvolvidos com o grupo, no entanto, devido à sua grande variabilidade, dificulta a obtenção de um alinhamento confiável e não tem sido tão frequentemente utilizado nos trabalhos atuais (Bellorin 2002).

Em virtude das dificuldades relatadas nos estudos taxonômicos das algas da ordem Gracilariales, uma nova técnica para auxiliar na identificação vem sendo utilizada. Denominada DNA “barcoding”, é baseada na amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de um seguimento de DNA relativamente curto (~400-700 pb) que pode ser inteiramente sequenciado com os mesmos dois

“primers” usados na PCR. O sistema de DNA “barcoding” é prático e uniforme para identificação de espécies e pode ser aplicado mesmo quando as técnicas tradicionais não são viáveis, como organismos em estado juvenil ou obtidos em conteúdo estomacal, por exemplo. As sequências de marcadores moleculares curtos que permitem a identificação de espécies têm sido denominadas de DNA “barcodes” em analogia ao sistema de código de barras usado em produtos manufaturados (Stoeckle 2003).

O uso de técnicas cada vez mais práticas e rápidas no estudo das algas vem contribuindo consideravelmente na elucidação de problemas taxonômicos, não apenas visando as espécies de grande importância econômica, mas uma ampla gama de organismos que representam a biodiversidade, o que nos possibilita entender e compreender a história evolutiva dessas espécies (Saunders 2005).

A técnica de DNA “barcoding” encontra-se entre os estudos filogenéticos e os estudos populacionais, no entanto, enquanto estes estudam, respectivamente, as relações evolutivas estabelecidas entre os grupos e a variação entre as populações e dentro delas, a proposta do DNA “barcoding” é buscar entender as espécies, focando exclusivamente na delineação das mesmas ao invés de suas relações filogenéticas (Hajibabaei et al. 2007).

Para o uso de DNA “barcoding” torna-se necessário que os marcadores moleculares tenham regiões bem conservadas para que as mesmas sejam amplificadas por um conjunto de “primers” universais, porém esses marcadores também precisam conter regiões divergentes para que possam solucionar problemas com espécies proximamente relacionadas (Hebert et al. 2003; Stoeckle 2003).

A região escolhida para ser utilizada como DNA “barcode” em vários grupos de organismos foi a porção 5’ do marcador mitocondrial *cox*1 (citocromo oxidase 1, COI) devido a existência de duas importantes vantagens relacionadas ao gene: a existência de primers relativamente universais para amplificação da região 5´ em animais (Folmer et al. 1994; Zhang & Hewitt 1997) e um amplo espectro filogenético dado pela distribuição do COI. Além disso, essa região quando comparada aos outros genes codificantes de proteínas, possui uma alta taxa de substituição na terceira base, o que leva a uma taxa de evolução molecular até três vezes maior do que outros genes mitocondriais a exemplo do 12S ou 16S (Knowlton & Weigt 1998). O DNA “barcoding” permite a detecção de espécies crípticas e fornece dados que

ajudam a entender a diversidade da vida e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação (Saunders 2009).

Baseando-se no fato de que a técnica de DNA “barcoding” foi desenvolvida para resolver problemas de grupos de animais que apresentam plasticidade fenotípica, presença de espécies crípticas e diferenças morfológicas nos estágios de vida, e que todos esses problemas também são observados em Rhodophyta, Saunders (2005) propôs a utilização da região 5’ do *cox*1 no grupo. Em um estudo abrangendo 15 famílias em seis ordens e um total de 250 indivíduos, verificou que esse marcador se mostrou adequado para a distinção de espécies nos grupos de algas vermelhas estudados. No caso das algas vermelhas, a presença de estruturas reprodutivas é muitas vezes necessária para a identificação, e na ausência dessas, a determinação da espécie e até mesmo do gênero fica impossibilitada (Saunders 2009).

Saunders (2005) utilizando a região 5’ do *cox*1 em estudos de algas vermelhas verificou que a variação intraespecífica era de 0-2 pares de base (pb), já com estudos de espécies dentro de um gênero essa divergência foi em torno de 30-40 pb com algumas exceções. Dessa forma o uso dessas regiões mostrou-se adequada para a distinção de espécies nos grupos de Rhodophyta estudados. Assim é importante estabelecer o nível de variação intraespecífica no “barcoding” para cada grupo taxonômico, tipicamente inferior a 4% acima do qual os indivíduos analisados pertenceriam a espécies diferentes (Savolainen et al. 2005).

DNA “barcodes” auxiliam na descoberta de novas espécies como um meio de complementar métodos tradicionais de identificação de táxons, e apesar de sua praticidade, o DNA “barcoding” é uma técnica que pode apresentar alguns fatores limitantes como a dificuldade de distinguir espécies muito próximas (Blaxter et al. 2005). Além disso, o DNA “barcoding” é uma ferramenta que deve ser aliada à identificação taxonômica tradicional com o potencial de permitir uma maior discriminação entre espécies crípticas, porém, depois de construído um banco confiável, a identificação torna-se rápida e prática. Assim, o uso de DNA “barcoding” exige um banco de dados através do qual a espécie “desconhecida” possa ser comparada, de modo que seu uso poderá agilizar o descobrimento de novas espécies (Meyer & Paulay 2005).

Genomas de organelas são favorecidos pelo alto número de cópias por células, resultando em fácil amplificação, sendo ideais para a seleção de DNA

“barcodes” (Sherwood et al. 2010). Dessa forma, além do *cox*1 uma região do gene do cloroplasto, o domínio V do gene 23S, que codifica o RNA da subunidade grande do ribossomo (23S rRNA), conhecido como UPA (Universal Plastid Amplicon), também tem sido utilizado como marcador para organismos fotossintetizantes (Presting 2006; Sherwood & Presting 2007; Sherwood et al. 2010).

O marcador plastidial UPA consiste de uma região de aproximadamente 400pb, flanqueada por sequências conservadas que podem ser usadas como “primers” universais permitindo avaliar amostras que contenham múltiplas linhagens de algas (Presting 2006), diferente do *cox*1, que pode possuir variação de nucleotídeos na região dos “primers”. O UPA, descrito em 2006 e testado para uma seleção de linhagens de algas em 2007, pôde ser amplificado e sequenciado para muitas cianobactérias e linhagens de algas, com poucas exceções (Presting 2006).

Neste capítulo apresentamos os dados obtidos com os marcadores moleculares do tipo DNA “barcode” *cox*1 e UPA, além do marcador *rbc*L para os espécimes coletados ao longo da costa brasileira e os mantidos em cultivo no Banco de Germoplasma da USP. Estão incluídas várias espécies cilíndricas e achatadas de gracilarióides. Para obter resultados mais robustos comparamos as nossas sequências com as sequências depositadas nos bancos de dados.

Materiais e Métodos

Extração de DNA

Para o processo de extração de DNA utilizou-se o método Faugeron (2001) com algumas modificações. Foram pesadas cerca de 30-40 mg de massa fresca ou 10-20 mg de massa seca, a qual foi macerada com nitrogênio líquido (N2) em um Eppendorf com o auxílio de um pistilo. Após a maceração obteve-se um pó fino ao qual foi adicionado 800 µL de tampão de Lise (Tris 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, KAc 5M), 100 µL de Tween 20, 16 µL de proteínase K 10mg/ml e 5 µL de RNAse 10mg/ml. A amostra ficou incubada durante 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 min a 20^0C. Em seguida a fase aquosa foi transferida para dois novos Eppendorfs num volume total de 440 µL cada e foram adicionados 350 µL de Fenol e 350 µL de Clorofórmio a cada tubo. Em seguida o material foi delicadamente misturado e centrifugado a

14.000 rpm por 5 min a 4^0C. A fase aquosa (cerca de 300 µL) foi transferida para novos Eppendorfs e adicionou-se 500 µL de clorofórmio e novamente centrifugou-se nas mesmas condições do passo anterior. A fase aquosa dos dois tubos foi unificada (~600 µL) em um novo Eppendorf e acrescentou-se 480 µL de álcool isopropílico e em seguida centrifugou-se a 14.000 rpm por 30 min a 4^0C. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol gelado a 70% e novamente centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min a 4^0C. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e secou-se a amostra no Speed Vacuum (Eppendorf) por 1h. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de água milliq autoclavada. O DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão Tris-borato-EDTA e corado com Gel Red na concentração 1:500 para observação da qualidade e quantidade de DNA extraído (Sambrook et al. 1989).

Amplificação e Purificação dos marcadores moleculares

Para amplificação da sequência alvo a partir do DNA extraído foram utilizados “primers” específicos (Tabela 2) para diferentes marcadores moleculares através da técnica de PCR (Sambrook et al. 1989). Os marcadores moleculares utilizados foram: marcador mitocondrial *cox*1 que corresponde a parte 5´ do gene que codifica a citocromo oxidase 1 com cerca de 650 pb; o marcador plastidial “Universal Plastid Amplicon” (UPA) que codifica o domínio V da subunidade plastidial 23S do rDNA com cerca de 450 pb e o gene *rbc*L que codifica para a subunidade grande da enzima Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO) com cerca de 1400 pb.

Nas reações de PCR foi utilizado o Kit da Promega (Madison, WI – EUA) conforme o protocolo do fornecedor: para 50 µL de volume final, foram adicionados 36,75 µL água milliq, 5 µL de tampão 10X, 2 µL de MgCl 50mM, 1µL de dNTP 100mM; 1 µL de cada primer 50mM; 3 µL de DNA total e 0,25 µL de Taq DNA polymerase. Para cada marcador amplificado foram utilizados diferentes ciclos de acordo com a temperatura de annealing ideal para cada primer (Figura 02). Os termocicladores utilizados para a realização da reação de PCR foram: Techne TC-512 e Techne TC-4000 (Bibby Scientific Ltda, Staffordshire, UK). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, com marcador de tamanho (1 Kb DNA Ladder- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para verificar os

tamanhos dos fragmentos amplificados, corados com corante Gel Red na concentração 1:500. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a coluna GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Burckinghamshire, UK) de acordo com o protocolo do fornecedor; quantificados com o uso do aparelho NanoDrop 2000-Spechtophotometer (Wilmington, DE - EUA) e diretamente sequenciados.

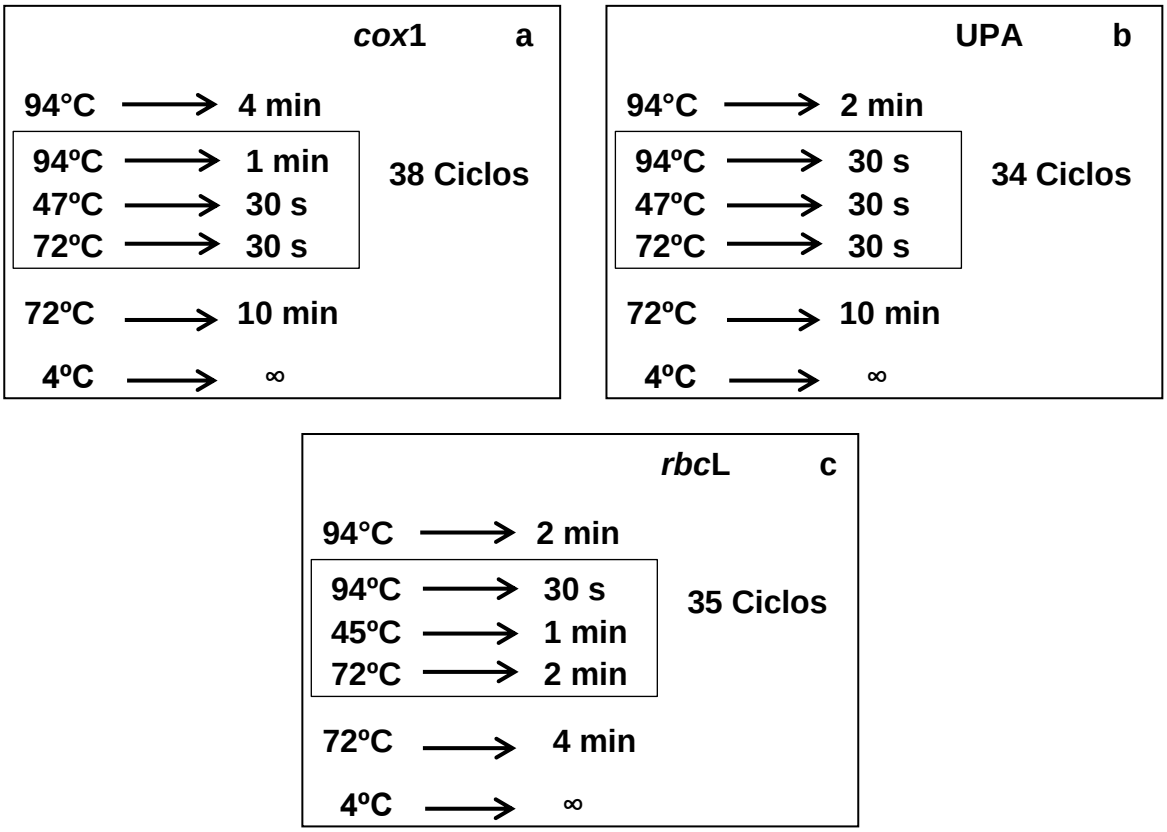


Figura 02. Ciclos para PCR dos três marcadores utilizados neste trabalho retirados, de a) Saunders (2005), b) Sherwood & Presting (2007), c) Freshwater et al. (1994).

Para a amplificação do gene *cox*1 foi necessário, em alguns casos o uso de "primers" alternativos (GHalf,GWSFn e GWSRn; Tabela 2).

Tabela 2. "Primers" para PCR e sequenciamento para os diferentes marcadores moleculares usados neste estudo. Nos "primers" do marcador *rbc*L, r = A ou G; y = C ou T; w = A ou T.

"primers"	Sequência 5'-3'	Marcador (pb)	Referência
GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	*cox*1 (~710)	Saunders (2005)
GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAAAYCA	*cox*1 (~710)	Saunders (2005)
GHalF	TCAACAAATCATAAAGATATYGG	*cox*1 (~710)	Saunders (2005)
GWSFn	TCAACAAAYCAYAAAGATATYGG	*cox*1 (~710)	Saunders (2005)
GWSRn	GGRTGNCCRAARAAYCARAA	*cox*1 (~710)	Saunders (2005)
p23SrV_f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	UPA (~370)	Sherwood & Presting (2007)
p23SrV_r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	UPA (~370)	Sherwood & Presting (2007)
F-*rbc*L start	ATGTCTAACTCTGTAGAA	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
F492*	CGTATGGATAAATTTGGTCG	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
F492a*	CGYATGGAYAAATTTGGACG	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
F993*	GGTACTGTTGTAAAATTWGAAGG	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
R1150*	GCATTTGTCCGCAGTGAATACC	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
R753*	GGAAGATATGTATGAAAGAGC	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
R753a*	GARGATATGTAYGAAAGAGC	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)
R-*rbc*S start	GTTCTTTGTGTTAATCTCAC	*rbc*L (~1500)	Freshwater & Rueness (1994)

* "Primers" internos usados no sequenciamento do *rbc*L.

Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR purificados e quantificados (de 10,6 a 30 ng DNA/µL) foram sequenciados com o kit "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, Carlsbad, California-EUA) de acordo com as recomendações do fornecedor. Após a reação de sequenciamento foi feita uma precipitação utilizando-se 1µL EDTA 125mM, 1 µL Acetato de Sódio 3M, 25 µL de etanol 100%, incubado em temperatura ambiente por 15 min e em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 25 min a 4ºC. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 35 µL de etanol 70% repetindo-se a centrifugação e em seguida descartando o sobrenadante e secando-se o material no Speed Vacuum por 1h.

As reações de sequenciamento foram feitas no sequenciador automático (ABI PRISM 3100). Para cada marcador as sequências foram obtidas nas direções direta e reversa, usando os mesmos primers da PCR (Tabela 2) e no caso do *rbc*L também os primers internos foram utilizados para o sequenciamento. As sequências consenso para cada marcador foram montadas usando o programa BioEdit (Hall

1999) a partir das sequências obtidas nas direções direta e reversa. Os cromatogramas foram checados quando ocorriam divergências entre as sequências. As sequências consenso foram comparadas a outras disponíveis no GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Análises das sequências

As sequências consenso obtidas para cada marcador foram alinhadas usando o programa ClustalW dentro do BioEdit (Hall 1999).

Para uma análise mais robusta foram adicionadas sequências retiradas do GenBanK (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), do BOLD (http://www.boldsystems.org) e do Hawaiin Algae Database (http://algae.manoa.hawaii.edu/index.html), as quais foram alinhadas usando-se o ClustalW.

Para os marcadores moleculares do tipo DNA “barcode” *cox*1 e UPA as árvores foram construídas usando os métodos de distância (neighbor-joining, NJ) com modelo de substituição (Tamura & Nei 1993) e Bootstrap de 2000 no MEGA (Tamura et al. 2011).

Para o marcador *rbc*L, após o alinhamento das matrizes foi selecionado um modelo evolutivo apropriado no MrModeltest 2.2 (Posada 1998; Nylander 2004) usando Akaike Information Criterion (AIC). Nas análises feitas com o marcador *rbc*L as árvores foram construídas utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) usando os métodos de NJ, máxima parcimônia (MP) com busca heurística, ambos com 2000 réplicas de Bootstrap (Felsestein 1985) e máxima verossimilhança (ML) com 100 réplicas de Bootstrap. A análise bayesiana foi feita utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), realizando-se 2 corridas com 4 cadeias de Markov com 1.000.000 de gerações com amostragens a cada 1000, sendo que as 100.000 gerações iniciais foram descartadas (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

Nas análises realizadas foi considerado o seguinte critério quanto às porcentagens: 50-64 baixo; 65-85 moderado, 86-100 alto. Em todas as análises os gaps foram considerados como dados ausentes e todas as posições foram consideradas com o mesmo peso.

Resultados

Foi obtido um total de 289 sequências para 135 amostras utilizando-se os marcadores moleculares mitocondrial *cox*1 (Anexo1) e os plastidiais UPA e *rbc*L (Anexos 2 e 3). Das 135 amostras 85 foram coletadas na costa brasileira (Tabela 3) e 50 são mantidas em cultura no Banco de Germoplasma da USP oriundas da costa brasileira e de outros países (Tabela 1). A amplificação do *cox*1 foi possível para 99 amostras, enquanto que para o UPA foi possível obter sequências para 134 amostras, devido a sua facilidade de amplificação, quando comparado ao *cox*1 (ver capítulo 2). O marcador *cox*1, requer em alguns casos a combinação de primers alternativos, acarretando, portanto, em um maior gasto e esforço para amplificação das amostras. Para algumas amostras não foi possível obter a sequência de *cox*1, ainda que testando a combinação de “primers” alternativos. Entretanto, o marcador mitocondrial *cox*1 mostrou-se menos conservado que o UPA e, portanto mais eficiente para separar as espécies. Para o marcador *rbc*L foram amplificadas e sequenciadas 55 amostras, incluindo pelo menos um representante de cada táxon, no entanto, em virtude de ser mais trabalhoso e custoso o *rbc*L não foi sequenciado para todos os espécimes.

De acordo com as sequências obtidas foram revelados 19 táxons distintos para o Brasil, dos quais 17 são pertencentes ao gênero *Gracilaria* e dois ao gênero *Gracilariopsis*. Do total de espécies reveladas com base nos marcadores, moleculares três são apontadas como novas ocorrências para o Brasil: *Gracilaria damaecornis*, *G. hayi* e *Gracilariopsis silvana*.

Analisando-se os agrupamentos formados pelas sequências de *cox*1 e UPA, observa-se grande similaridade nos resultados obtidos, com algumas exceções dado que no UPA tem-se pouca ou nenhuma divergência intraespecífica em agrupamentos formados pelas mesmas amostras quando comparados ao *cox*1.

Tabela 3. Lista das amostras coletadas de Gracilariales, dados de coleta e marcadores sequenciados com número de acesso do Genbank e X para as sequências obtidas que ainda não foram submetidas ao banco.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude	*cox*1	UPA	*rbc*L
G. birdiae	BRA17	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56872	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W		X	
G. birdiae	BRA18	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56871	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W	X	X	X
G. birdiae	BRA21	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57136	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W	X	X	
G. birdiae	BRA22	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57134	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W	JQ843315	JQ907426	
G. birdiae	BRA23	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57132	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W		JQ907414	
G. birdiae	BRA32	09.11.10	E.Costa	Cabo Branco, João Pessoa, PB	57165	$7^0$07'37.58"S, $34^0$49'32.40"W	X	X	
G. caudata	BRA02	10.03.00	E.Oliveira	Itajaí, SC	56119	$26^0$54'23.11"S, $40^0$04'65"W	JQ843314	JQ907425	X
G. caudata	BRA05	07.11.98	E.Oliveira	Candeias, Ipojuca, PE	-	$8^0$23'59.69"S, $35^0$03'45.71"W	X	X	X
G. caudata	BRA10	04.02.00	E.Oliveira	Praia Dura, Ubatuba, SP	-	$23^0$31'40.57"S, $45^0$24'26.23"W	X	X	
G. caudata	BRA66	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57181	$5^0$05'00.73"S, $36^0$26'01.50"W	X	X	
G. caudata	BRA72	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57187	$5^0$05'00.73"S, $36^0$26'01.50"W	X	X	
G. caudata	BRA74	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57189	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W		X	
G. caudata	BRA83	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57286	$27^0$26'00.74"S, $48^0$31'10.34"W	X		
G. caudata	BRA96	20.05.12	M.C. Oliveira	Praia da Cruz, Marataízes, ES	57338	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W	X	X	X
G. caudata	BRA98	17.05.12	M.C. Oliveira	Praia da Cruz, Marataízes, ES	57340	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W	X	X	X
G. caudata	BRA101	06.05.12	M.C. Oliveira	Enseada azul, Meaípe, ES	57343	20^0 31'14.8"S, $40^0$24'41.7"W	X		X
G. caudata	BRA104	21.05.12	C. Iha	Itapemirim, ES	57346	$20^0$55'19.26"S, $40^0$42'13.11"W	X	X	
G. caudata	BRA106	12.04.10	E.Soriano-Marinho	Rio do Fogo, RN	-	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W			
G. caudata	BRA107	06.02.11	D. Barata	Boa Viagem, PE	-	$8^0$07'32.78"S, $34^0$54'58.53"W	X	X	X
G. caudata	BRA108	06.05.12	E.Plastino/L.Ayres	Paraty, ES	-	$23^0$12'58.69"S, $44^0$42'55.03"W		X	X
G. caudata	BRA109	21.05.12	E.Plastino/L.Ayres	Paraty, ES	-	$23^0$12'58.69"S, $44^0$42'55.03"W		X	

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude	*cox*1	UPA	*rbc*L
G. caudata	BRA110	13.10.08	E.Oliveira	Praia Vermelha do Sul, Ubatuba, SP	-	23^{0}30'35.52"S, 45^{0}10'24.56"W		X	
G. caudata	BRA111	13.10.08	E.Oliveira	Ponta de Fortaleza, Ubatuba, SP	56864	23^{0}30'35.52"S, 45^{0}10'24.56"W	JQ843310	JQ907418	X
G. caudata	BRA112	12.04.10	E.Soriano-Marinho	Rio do Fogo, RN	-	5^{0}05'00.73"S, 36^{0}23'22.30"W			
G. caudata	BRA113	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta da Fortaleza, Ubatuba,SP	56863	23^{0}52'95.91"S, 45^{0}10'15.79"W	JQ843311	JQ907419	X
G. caudata	BRA114	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56858	23^{0}52'95.91"S, 45^{0}10'15.79"W	JQ843312	JQ907420	
G. caudata	BRA118	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, SP	56867	23^{0}47'42.37"S, 45^{0}30'48.36"W		JQ907421	
G. caudata	BRA119	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, SP	56856	23^{0}47'42.37"S, 45^{0}30'48.36"W		JQ907422	
G. caudata	BRA120	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia da Lagoinha, Ubatuba, SP	56866	23^{0}31'34.35"S, 45^{0}11'48.84"W		JQ907424	
G. caudata	BRA121	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia do Perez, Ubatuba, SP	56869	23^{0}25'06.37"S, 45^{0}03'45.84"W	JQ843313	JQ907425	
G. caudata	BRA122	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56860	23^{0}52'95.91"S, 45^{0}10'15.79"W			X
G. caudata	BRA128	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, SP	57016	23^{0}47'42.37"S, 45^{0}30'48.36"W		JQ907458	
G. caudata	BRA130	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, SP	57018	23^{0}47'42.37"S, 45^{0}30'48.36"W		JQ907417	
G. caudata	BRA135	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	-	23^{0}37'22.90"S, 45^{0}24'53.23"W		X	X
G. cearensis	BRA71	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57186	5^{0}51'57.04"S, 35^{0}10'42.43"W		X	
G. cervicornis	BRA16	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56873	5^{0}05'00.73"S, 36^{0}23'22.30"W		X	
G. cervicornis	BRA34	09.11.10	E.Costa	Cabo Branco, João Pessoa, PB	57166	7^{0}07'37.58"S, 34^{0}50'31.54"W	JQ843325	JQ907433	X
G. cervicornis	BRA78	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57180	5^{0}51'57.04"S, 35^{0}10'42.43"W		X	
G. cornea	BRA89	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57313	3^{0}24'30.12"S, 39^{0}02'03.37"W	X	X	
G. cornea	BRA90	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57314	3^{0}24'30.12"S, 39^{0}02'03.37"W	X	X	X
G. cornea	BRA91	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57315	3^{0}24'30.12"S, 39^{0}02'03.37"W	X	X	
G. cornea	BRA93	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57316	3^{0}24'30.12"S, 39^{0}02'03.37"W	X	X	X

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude	*cox*1	UPA	*rbc*L
G. cornea	BRA94	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57315	$3^0$24'30.12"S, $39^0$02'03.37"W	X	X	X
G. cornea	BRA95	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia Pedra Rachada, Paracurú, CE	57313	$3^0$24'30.12"S, $39^0$02'03.37"W	X	X	X
G. cuneata	BRA76	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57191	$5^0$56'54.32"S, $35^0$31'18.55"W		X	
G. curtissiae	BRA28	09.11.10	E.Costa	Cabo Branco, João Pessoa, PB	57137	$7^0$07'37.58"S, $34^0$50'31.54"W		JQ947434	
G. curtissiae	BRA68	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57183	$5^0$51'57.04"S, $35^0$10'42.43"W	X	X	X
G. damaecornis	BRA14	24.02.00	A.Bellorin	Valença, Ilhéus, BA	-		X	X	X
G. damecornis	BRA63	06.05.11	E.Oliveira	Casa da Barra, SC	57178	$28^0$27'54.73"S, $48^0$16'28.63"W	X	X	X
G. damaecornis	BRA65	21.05.11	E.Oliveira	Canal da Barra, Florianópolis, SC	57282	$26^0$15'01.49"S, $48^0$45'01.26"W	X	X	X
G. damaecornis	BRA82	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57285	$27^0$26'00.74"S, $48^0$31'10.34"W		X	
G. domingensis	BRA116	16.10.08	E.Oliveira	Praia do Costa, Ubatuba, SP	56868	$23^0$77'55.81"S, $45^0$23'35.14"W	JQ843326	JQ907435	
G. domingensis	BRA118	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56867	$23^0$47'42.37"S, $45^0$30'48.36"W		X	X
G. domingensis	BRA124	17.03.10	M.Oliveira/E.Costa	Praia de Picinguaba, Ubatuba, SP	-	$23^0$38'00.32"S, $44^0$84'07.32"W		X	
G. domingensis	BRA127	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	57015	$23^0$47'42.37"S, $45^0$30'48.36"W		JQ907459	
G. domingensis	BRA134	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57022	$23^0$37'22.90"S, $45^0$24'53.23"W		JQ907460	
G. flabelliformis	BRA26	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57168	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W		X	
G. flabelliformis	BRA73	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57188	$5^0$05'00.73"S, $36^0$26'01.50"W		X	X
G. hayi	BRA19	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56874	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W	X	X	X
G. hayi	BRA20	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56875	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W	X	X	
G. isabellana	BRA01	04.02.00	E.Oliveira	Praia Dura, Ubatuba, SP	-	$23^0$31'40.57"S, $45^0$24'26.23"W	X	X	X
G. isabellana	BRA03	15.03.00	E.Oliveira	Praia da Armação, Florianópolis, SC	56134	$27^0$35'44.70"S, $48^0$36'40.38"W	X		X

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude	*cox*1	UPA	*rbc*L
G. isabellana	BRA13	16.05.00	E.Plastino	Praia da Lagoinha, Ubatuba, SP	56136	23^{0}31'34.35"S, 45^{0}11'48.84"W	JQ843334	JQ907447	X
G. isabellana	BRA77	06.05.11	E.Oliveira	Canasvieiras, SC	57192	27^{0}26'24.40"S, 48^{0}28'23.55"W	X		
G. isabellana	BRA81	06.02.11	E.Oliveira	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57284	27^{0}26'00.74"S, 48^{0}31'10.34"W		X	X
G. isabellana	BRA117	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56862	23^{0}47'42.37"S, 45^{0}30'48.36"W		JQ907457	
G. isabellana	BRA123	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia do Perez, Ubatuba, SP	56859	23^{0}25'06.37"S, 45^{0}03'45.84"W	JQ843339	JQ907455	
G. isabellana	BRA125	18.03.10	N.Guimarães	Praia Vermelha, Ubatuba, SP	57013	23^{0}30'35.52"S, 45^{0}10'24.56"W	X	X	
G. isabellana	BRA126	19.03.10	E.Costa	Praia Vermelha, Ubatuba, SP	57014	23^{0}30'35.52"S, 45^{0}10'24.56"W		JQ907452	
G. isabellana	BRA131	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57019	23^{0}37'22.90"S, 45^{0}24'53.23"W	X	JQ907446	
G. isabellana	BRA132	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57020	23^{0}37'22.90"S, 45^{0}24'53.23"W		JQ907450	
G. isabellana	BRA133	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57021	23^{0}37'22.90"S, 45^{0}24'53.23"W		JQ907449	
G. smithsoniensis	BRA08	04.02.00	E.Oliveira	Praia Dura, Ubatuba, SP	-	23^{0}31'40.57"S, 45^{0}24'26.23"W		X	X
G. smithsoniensis	BRA11	07.11.00	E.Oliveira	Candeias, Ipojuca, PE	-	8^{0}23'59.69"S, 35^{0}03'45.71"W		X	X
G. smithsoniensis	BRA12	24.06.99	D.Teixeira	Flecheiras, Traíri, CE	-	3^{0}16'11.88"S, 39^{0}16'10.76"W			X
G. smithsoniensis	BRA69	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57184	5^{0}51'57.04"S, 35^{0}10'42.43"W	X	X	X
G. smithsoniensis	BRA73		E.Oliveira	Canal da Barra, Florianópolis, SC	57178	26^{0}15'01.49"S, 48^{0}45'01.26"W			X
G. smithsoniensis	BRA97	20.05.11	M.C. Oliveira	Praia da Cruz, Marataízes, ES	57339	20^{0}08'63.0"S, 40^{0}17'31.77"W	X		X
G. smithsoniensis	BRA99	17.05.11	F. Nauer	Castelhanos, ES	57341	20^{0}46'01.34"S, 40^{0}42'27.75"W	X	X	X
G. yoneshigueana	BRA07	16.05.00	E.Plastino	Praia da Lagoinha, Ubatuba, SP	56135	23^{0}31'34.35"S, 45^{0}11'48.84"W		JQ907464	X
G. yoneshigueana	BRA15	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56876	5^{0}05'00.73"S, 36^{0}23'22.30"W	X	X	X
G. yoneshigueana	BRA24	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57120	7^{0}15'12.60"S, 34^{0}50'31.54"W	JQ843341	JQ907463	
G. yoneshigueana	BRA25	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57131	7^{0}15'12.60"S, 34^{0}50'31.54"W	JQ843340	JQ907461	

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude	*cox*1	UPA	*rbc*L
G. yoneshigueana	BRA27	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57133	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W			X
G. yoneshigueana	BRA64	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57179	$5^0$56'54.32"S, $35^0$31'18.55"W	X	X	X
G. yoneshigueana	BRA67	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57182	$5^0$51'57.04"S, $35^0$10'42.43"W	X	X	X
G. yoneshigueana	BRA75	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57190	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W		X	
G. yoneshigueana	BRA84	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57287	$27^0$26'00.74"S, $48^0$31'10.34"W		X	
G. yoneshigueana	BRA86		E.Oliveira	Ponta das Canas, Florianópolis, SC	57304	$27^0$23'42.01"S, $48^0$25'25.21"W	X	X	
G. yoneshigueana	BRA87		E.Oliveira	Ponta das Canas, Florianópolis, SC	57305	$27^0$23'42.01"S, $48^0$25'25.21"W	X	X	
G. sp. Búzios	BRA04	17.01.00	E.Oliveira	Praia da Caravelas, Búzios, RJ	-	$22^0$45'16.89"S, $41^0$53'03.06"W	X		X
Gp. silvana	BRA70	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57185	$5^0$56'54.32"S, $35^0$31'18.55"W	X	X	X
Gp. silvana	BRA97	05.07.12	M.Oliveira	Marataízes, ES	57342	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W	X	X	X
Gp. silvana	BRA100	05.07.12	M.Oliveira	Marataízes, ES	57343	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W	X		X
Gp. silvana	BRA103	21.05.11	F. Nauer	Castelhanos, ES	57344	$20^0$46'01.34"S, $40^0$42'27.75"W	X	X	X
Gp. silvana	BRA102	21.05.11	F. Nauer	Castelhanos, ES	57345	$20^0$46'01.34"S, $40^0$42'27.75"W	X	X	X
Gp. tenuifrons	BRA06		E.Oliveira	Pajuçara, Maceió, AL	-	$9^0$40'03.27"S, $35^0$42'43.69"W	X	X	X
Gp. tenuifrons	BRA09	07.11.00	E.Oliveira	Candeias, Ipojuca, PE	-	$8^0$23'59.69"S, $35^0$03'45.71"W		X	X
Gp. tenuifrons	BRA33	09.12.10	G.Miranda	Ilha de Itamaracá, PE	-		X	X	X
Gp. tenuifrons	BRA80	21.05.11	E.Oliveira	Canal da Barra, Florianópolis, SC	57283	$26^0$15'01.49"S, $48^0$45'01.26"W	X	X	X
Gp. tenuifrons	BRA115	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56870	$23^0$52'95.91"S, $45^0$10'15.79"W	JQ843352	JQ907473	X
Gp. tenuifrons	BRA129	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, SP	57017	$23^0$47'42.37"S, $45^0$30'48.36"W		JQ907445	

Análise do marcador plastidial UPA

A árvore obtida para o marcador UPA foi gerada utilizando-se uma porção de 369 nucleotídeos do gene, alinhando 135 sequências obtidas nesse trabalho mais algumas poucas sequências disponíveis nos bancos de dados, revelando 19 espécies de Gracilariaceae sequenciadas neste estudo. A árvore, segundo a análise de Neighbor-Joining (NJ), mostrou a formação de agrupamentos representando as diferentes espécies, a maioria bem estabelecidos, com alto suporte de Bootstrap (Figura 03).

Nos agrupamentos formados com base nos dados moleculares obtidos do UPA, observa-se a segregação das espécies pertencentes aos gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis*.

Para o gênero *Gracilariopsis*, foram observados dois agrupamentos com um alto suporte de Bootstrap incluindo exemplares brasileiros: o agrupamento formado pelos espécimes de *Gp. silvana* coletados nos estados do Rio Grande do Norte e Espírito Santo; e o agrupamento formado pelas amostras de *Gp. tenuifrons* coletadas no Nordeste, Sudeste e Sul, assim como as amostras mantidas em cultivo no Banco de Germoplasma, oriundas do México e da Venezuela. Foram obtidas também sequências de UPA para amostras de *Gp. lemaneiformis* do Equador e *Gp. longissima* da Inglaterra, ambas mantidas em cultivo no Banco de Germoplasma da USP.

As amostras de *Gracilaria* de ocorrência na costa brasileira e do banco de germoplasma sequenciadas neste estudo para o marcador UPA, totalizam 17 táxons, sendo que a maioria apresentou um alto grau de suporte na análise de Bootstrap.

O agrupamento formado por *G. yoneshigueana* entre os espécimes coletados no Nordeste e no Sul e incluiu a amostra BRA67 (SPF57182; Tabela 3) inicialmente identificada com base na morfologia como *G. intermedia* (Capítulo 4).

O agrupamento formado por *G. gracilis* mantidas em cultivo no Banco de Germoplasma, oriundas da Argentina e da Noruega apresentou um alto grau de suporte na análise de Bootstrap.

As espécies *G. cearensis* e *G. cuneata*, ambas coletadas no Rio Grande do Norte, tiveram apenas um exemplar de cada sequenciado, porém não foi possível obter as sequências de *cox*1 para essas amostras.

As espécies de *G. flabelliformis* coletadas no Rio Grande do Norte e na Paraíba formaram um agrupamento com alto grau de suporte.

As amostras de *G. curtissiae* coletadas no Rio Grande do Norte e na Paraíba formaram um agrupamento com alto grau de suporte.

As espécies de *G. cervicornis* coletadas no Rio Grande do Norte e na Paraíba não se agruparam, mostrando uma divergência de 0,9% (3 nucleotídeos).

O agrupamento formado pelos espécimes de *G. domingensis* coletados no estado de São Paulo mostrou um alto grau de sustentação.

O agrupamento formado pelos espécimes de *G. smithsoniensis* coletados no Rio Grande do Norte, Pernambuco, Espírito Santo e São Paulo apresentou um alto grau de suporte.

As amostras de *G. hayi* coletadas no Rio Grande do Norte formaram um agrupamento com alto grau de suporte.

As sequências de UPA agruparam *G. cornea* e *G. birdiae* em um clado com alto grau de suporte, mas apesar da proximidade, ainda assim esse marcador foi capaz de segregar as duas espécies, embora sem suporte de Bootstrap. Os materiais coletados no Brasil e o material de Israel, oriundo de uma linhagem do México, mantidos em cultivo no Banco de Germoplasma também foram incluídos nos respectivos agrupamentos.

O agrupamento formado por *G. caudata* é representado por 22 espécimes coletados nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, revelando-se a existência de dois haplótipos, um de Pernambuco e outro com os demais espécimes.

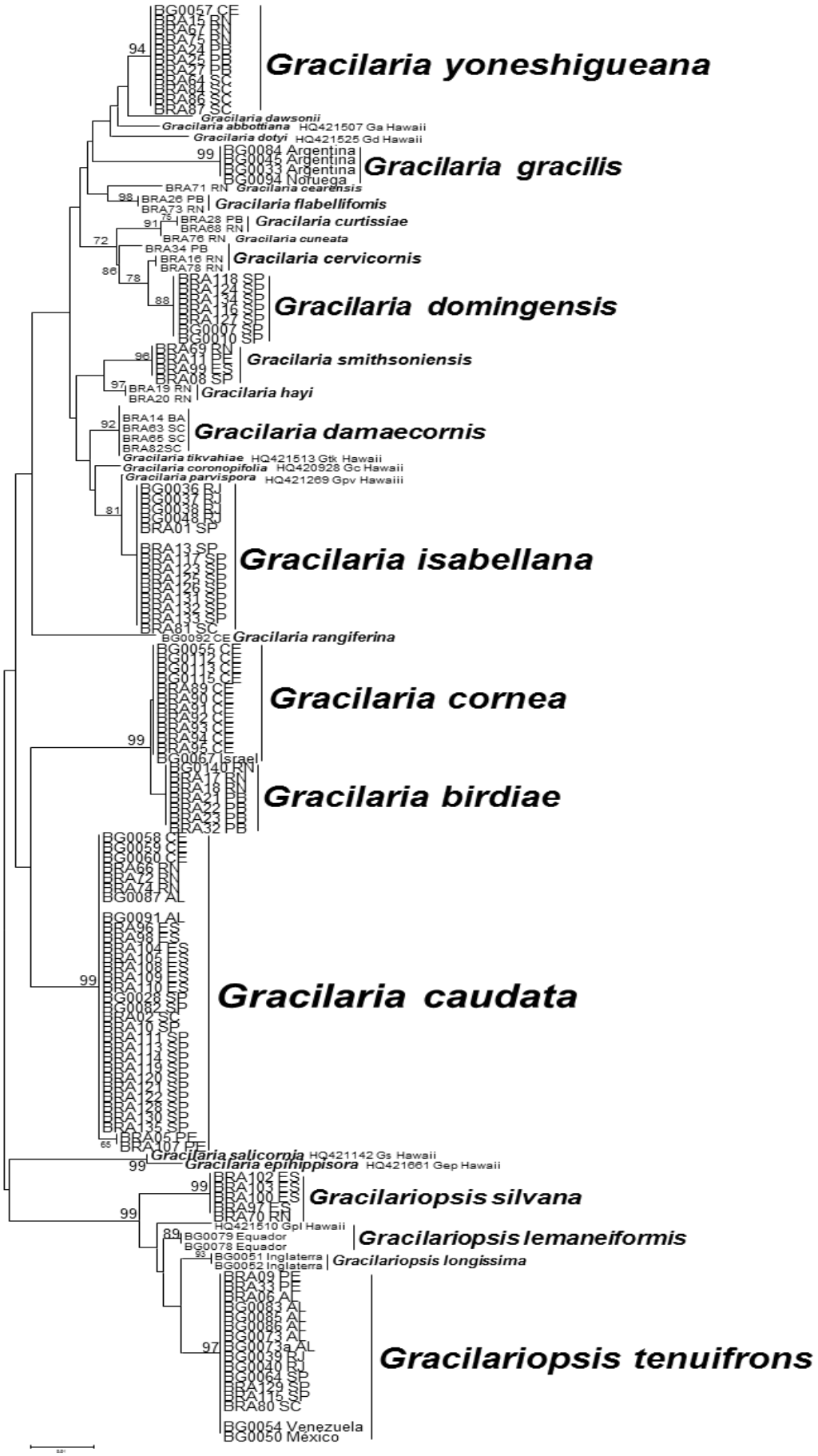


Figura 03: Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador UPA, mostrando o agrupamento de espécies das algas Gracilarióides. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap (2000 réplicas). Apenas valores maiores do que 65 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do número de acesso. As amostras coletadas em campo e mantidas no Banco de Germoplasma estão precedidas de seus números (Tabelas 1 e 3, respectivamente).

Análise do marcador mitocondrial *cox*1

Para o marcador *cox*1 uma porção de 614 nucleotídeos da região 5' do gene foi alinhada para 112 sequências, destas 99 foram geradas neste trabalho e 13 foram retiradas do Genbank, totalizando 29 espécies de Gracilariales entre as espécies obtidas no trabalho e as espécies do Genbank. A árvore, segundo a análise de Neighbor-Joining (NJ) mostrou a formação de 14 agrupamentos principais, a maioria com alto grau de bootstrap (Figura 04).

Das espécies de *Gracilariopsis* analisadas com o marcador mitocondrial *cox*1 foram identificadas as espécies *Gp. lemaneiformis* e *Gp. longissima* ambas mantidas em cultivo no Banco de Germoplasma da USP. Além dessas duas espécies de *Gracilariopsis*, foram identificadas *Gp. silvana* coletada nos estados do Rio Grande do Norte e do Espírito Santo. Esta espécie descrita por Gurgel et al. (2003) para a Venezuela é apontada como a única espécie de *Gracilariopsis* achatada do mundo. Os materiais de *Gp. silvana* estudados neste trabalho revelaram quatro haplótipos com uma divergência intraespecífica (Anexo 4) de 0 a 15 nucleotídeos (0-2,5%). A divergência existente entre esses materiais é observada tanto em dados moleculares quanto em relação à morfologia das amostras coletadas, no entanto essas sequências apresentaram alto grau de identidade para as sequências de *rbc*L quando comparadas com o material analisado pelo Gurgel et al. (2003) para a Venezuela.

Nos agrupamentos de *Gracilariopsis* também foi possível identificar a espécie *Gp. tenuifrons*, bastante comum na costa brasileira, ocorrendo desde o Ceará até o estado de Santa Catarina. Estudos pretéritos apontavam *Gp. tenuifrons* como a única espécie de *Gracilariopsis* de ocorrência no Brasil. Das amostras analisadas, encontramos uma divergência intraespecífica de 0 a 3 nucleotídeos (0-0,4%), revelando a existência de três haplótipos. Os espécimes de *Gp. tenuifrons* mantidos no Banco de Germoplasma oriundos da Venezuela e do México se agruparam com alto valor de Bootstrap com os espécimes coletados na costa brasileira.

Dos agrupamentos formados pelas espécies de *Gracilaria* sequenciadas neste estudo são observadas 12 espécies distintas para a costa brasileira, destas *G. damaecornis* e *G. hayi* são apontadas como novas ocorrências para o Brasil. No agrupamento formado por *G. damaecornis* com espécimes de Santa Catarina e da Bahia, observa-se divergência intraespecífica (Anexo 4) de 0 a 1 nucleotídeo (0-

0,2%), observando-se dois haplótipos. No agrupamento formado por dois espécimes de *G. hayi*, não se observou divergência intraespecífica.

O agrupamento de *G. isabellana* é formado por amostras mantidas no Banco de Germoplasma oriundas do Rio de Janeiro e amostras coletadas nos estados de São Paulo e Santa Catarina, apresentando uma variação intraespecífica (Anexo 4) de 0 a 1 nucleotídeo (0-0,2%) e dois haplótipos.

As amostras de *G. domingensis* coletadas no estado de São Paulo não apresentaram variação intraespecífica.

O agrupamento formado pelos espécimes de *G. gracilis* são amostras mantidas em cultivo no Banco de Germoplasma oriundas da Argentina, mostrando um alto grau de sustentação.

O agrupamento formado pelos espécimes de *G. yoneshigueana* revelaram a existência de três haplótipos com divergência (Anexo 4) de 0 a 2 nucleotídeos (0-0,4%). As amostras foram coletadas nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Santa Catarina.

O agrupamento formado com os espécimes de *G. cornea* coletadas no Ceará mostrou uma divergência de 0 a 15 nucleotídeos (0-2,3%) com o material de Israel, este proveniente de uma linhagem oriunda do México, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma.

O agrupamento formado pelas espécies de *G. birdiae* mostra um único haplótipo para as amostras coletadas no Rio Grande do Norte e na Paraíba.

O agrupamento formado pelas espécies de *G. caudata* é representado por 22 espécimes coletados nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, revelando-se a existência de cinco haplótipos. Observa-se que as *G. caudata* do Nordeste formaram um grande grupo, separando-se das *G. caudata* do Sudeste/Sul. Os espécimes apresentaram uma divergência 0 a 5 nucleotídeos (0-0,8%). Dos espécimes coletados no estado de São Paulo, apenas um material mostrou-se mais próximo dos espécimes do Nordeste em relação aos demais espécimes coletados em São Paulo.

Para as espécies de *G. brasiliensis* coletada no Rio de Janeiro, *G. cervicornis* da Paraíba, *G. curtissiae* e *G. smithsoniensis* do Rio Grande do Norte foi possível amplificar o marcador *cox*1 para apenas um exemplar de cada, mas os resultados foram corroborados quando comparados com os marcardores UPA e *rbc*L.

Os agrupamentos formados com o marcador *cox*1 revelaram resultados bastante semelhantes aos obtidos com o marcador UPA, mas apresentando uma maior divergência entre as sequências.

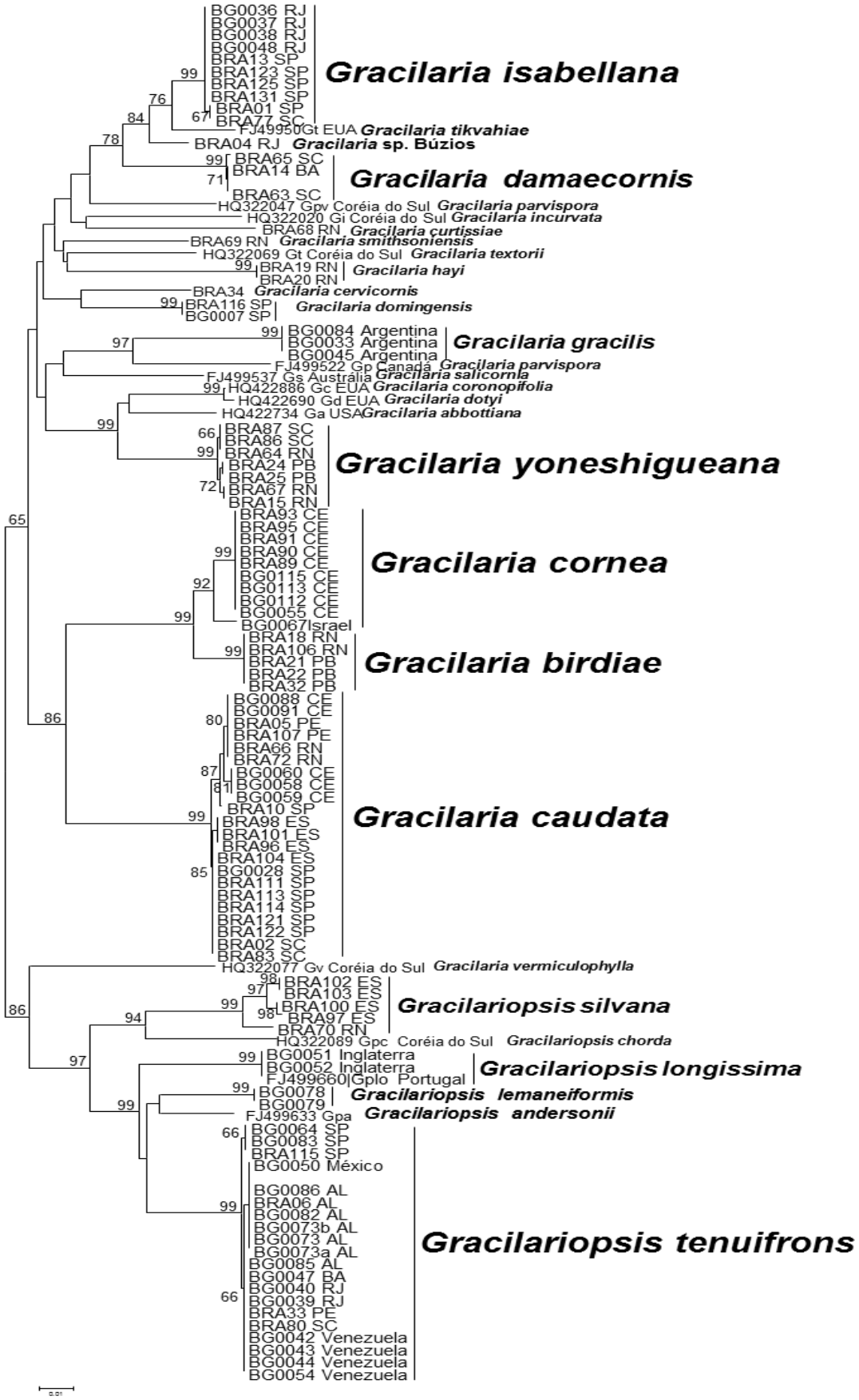


Figura 04: Análise de Neighbor-Joining (NJ) para as sequências do marcador *cox*1, mostrando o agrupamento de espécies das algas Gracilarióides. Nos ramos estão plotados os valores de Bootstrap (2000 réplicas). Apenas valores maiores do que 65 foram plotados. As sequências retiradas do GenBank estão seguidas do número de acesso. As amostras coletadas em campo e mantidas no Banco de Germoplasma estão precedidas de seus números (Tabelas 1 e 3, respectivamente).

Análise do marcador plastidial *rbc*L

Nas análises realizadas com o marcador plastidial *rbc*L utilizou-se uma porção de 1226 nucleotídeos alinhando-se 120 amostras, das quais 55 foram geradas neste trabalho e 65 foram retiradas do Genbank. O gene *rbc*L foi sequenciado para quase todas as espécies identificadas, escolhido após a análise dos marcadores curtos (UPA e *cox*1).

A árvore gerada segundo a análise bayesiana (Figura 05) mostra a relação filogenética estabelecida entre as espécies de algas gracilarióides segundo esse marcador. As espécies de gracilarióides se agruparam em dois grandes clados, separando os gêneros *Gracilaria* de *Gracilariopsis*, confirmando a monofilia dos gêneros.

As espécies estudadas neste trabalho, de modo geral, agruparam-se com bom suporte de Bootstrap com as sequências depositadas no Genbank para as mesmas espécies. Para *G. birdiae* a sequência de *rbc*L foi gerada pela primeira vez neste trabalho.

A espécie BRA04, coletada no Rio de Janeiro, comparada ao material de *G. brasiliensis* do Brasil (EU380716) depositado no Genbank apresentou uma divergência de 3,2% correspondendo a 39 nucleotídeos, indicando que possivelmente podem se tratar de duas espécies distintas. O espécime BRA04 foi originalmente coletado e estudado por Bellorin (2002) como *G*. sp. Búzios e analisado neste trabalho com base em dados moleculares. A sequência depositada no Genbank pertence ao material descrito com base em dados morfológicos e moleculares como *G. brasiliensis* por Gurgel et al. (2008).

A espécie *Gracilaria cervicornis* coletada na Paraíba, comparada a *G. cervicornis* dos Estados Unidos (AY049365), apresentou uma divergência de 3,8% correspondendo a 46 nucleotídeos. Esse resultado indica que possivelmente podem se tratar de duas espécies distintas. No entanto, considerando-se o resultado para o marcador UPA, os materiais coletados no Rio Grande do Norte (*G. cervicornis* 1 BRA16 e BRA78) divergiram do material coletado na Paraíba (*G. cervicornis* 2 (BRA34) identificados como *G. cervicornis*. Apesar dessa divergência observada para o UPA, apenas foi possível sequenciar o marcador *rbc*L para a amostra da Paraíba.

Gracilaria curtissiae coletada no Rio Grande do Norte, comparada a *G. curtissiae* dos Estados Unidos (AY049340), apresentou uma divergência de 0,2% correspondendo a dois nucleotídeos. A espécie *G. hayi*, coletada no Rio Grande do Norte, comparada a *G. hayi* dos Estados Unidos (AY049319) apresentou uma divergência de 0,4% correspondendo a cinco nucleotídeos. A espécie *G. gracilis* da Argentina, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma, comparada a *G. gracilis* da Itália (EF434946), não apresentou divergência. A espécie *G. rangiferina* do Ceará, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma, comparada a *G. rangiferina* de Ghana (AY049379) apresentou uma divergência de 1,4% correspondendo a 17 nucleotídeos.

O agrupamento formado por *G. isabellana* apresentou divergências nucleotídicas (Anexo 7) correspondendo de 0 a 6 nucleotideos (0-0,5%) nos espécimes coletados nas regiões Sudeste e Sul. Essa espécie, comparada a *G. isabellana* da Venezuela (AY049344), apresentou uma divergência de 0,5% correspondendo a seis nucleotídeos.

O agrupamento formado por *G. yoneshigueana* apresentou divergência de 0,1% correspondendo a um nucleotídeo quando comparada a *G. yoneshigueana* do Brasil (AY049372) depositada no Genbank. No entanto, comparando-se esses materiais com *G. intermedia* da Venezuela (AY049335) essa divergência é de 0,7% correspondendo a nove nucleotídeos, enquanto a comparação entre *G. intermedia* (Venezuela) e *G. yoneshigueana* (Brasil) ambas retiradas do Genbank é de 0,6% correspondendo a sete nucleotídeos. Estas espécies são proximamente relacionadas e apresentam uma morfologia bem semelhante.

O agrupamento formado por *G. smithsoniensis* apresentou divergências nucleotídicas (Anexo 4) correspondendo 0 a 2 nucleotídeos (0-0,1%) nos espécimes coletados no Rio Grande do Norte. Comparando o material coletado em São Paulo com *G. smithsoniensis* do Panamá (AY049321) tem-se uma divergência de 0,2% correspondendo a dois nucleotídeos, enquanto a divergência apresentada comparando-se com os demais espécimes amplificados neste trabalho é de 0,1% correspondendo a um nucleotídeo.

O agrupamento formado por espécimes de *G. damaecornis* coletados na Bahia e Santa Catarina, comparados à *G. damaecornis* dos Estados Unidos (AY049326) apresentou uma divergência de 2 a 4 nucleotídeos (0,2-0,3%).

O agrupamento formado por espécimes de *G. cornea* coletados no Ceará e comparados à *G. cornea* da Venezuela (AY049338) apresentou uma divergência de 0,2% correspondendo a dois nucleotídeos.

O agrupamento formado pelos espécimes de *G. caudata* apresentou divergência nucleotídica (Anexo 4) de 0 a 6 nucleotídeos (0-0,4%) nos materiais coletados em Pernambuco, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina. Comparando-se esses materiais com a *G. caudata* dos Estados Unidos (AY049359) a divergência foi de 1 a 2 nucleotídeos (0,1-0,2%).

A comparação entre *Gp. mclachlanii* oriunda da Tanzânia mantida em cultivo no Banco de Germoplasma com a *Gp. mclachlanii* da Tanzânia (EU158092) depositada no Genbank mostrou uma divergência de 0,7% correspondendo a nove nucleotídeos. *Gracilariopsis lemaneiformis* do Equador mantida em cultivo no Banco de Germoplasma comparada com *Gp. lemaneiformis* dos Estados Unidos (AY049415) apresentou uma divergência de 0,7% correspondendo a nove nucleotídeos. *Gracilariopsis longissima* da Inglaterra mantida em cultivo no Banco de Germoplasma comparada com *Gp. longissima* da França (DQ095786) apresentou uma divergência de 1,2% correspondendo a 15 nucleotídeos.

O agrupamento formado por *Gp. tenuifrons* apresentou divergência nucleotídica (Anexo 7) de 0 a 2 nucleotídeos (0-0,1%) nos materiais coletados no Nordeste, Sudeste e Sul além dos materiais mantidos em cultivo no Banco de Germoplasma oriundos do México e da Venezuela.

O agrupamento formado por *Gp. silvana* apresentou divergência nucleotídica de 0-0,6% (0-9 pb) nos espécimes coletados no Rio Grande do Norte e Espírito Santo. Comparando-se os materiais coletados no Espírito Santo com *Gp. silvana* da Venezuela (AY049309) a divergência foi de 0,4% correspondendo a cinco nucleotídeos, enquanto o material coletado no Rio Grande do Norte não apresentou divergência comparado ao material da Venezuela depositado no Genbank.

Os resultados apresentados com o sequenciamento do marcador plastidial *rbc*L corroboraram os agrupamento formados com os marcadores *cox*1 e UPA, que apesar de não serem utilizados para estudos filogenéticos, mostraram-se bastante eficientes na separação das espécies. Os clados formados pelos três marcadores moleculares são bem similares confirmando as identificações e suas relações filogenéticas. As espécies *G. birdiae*, *G. caudata* e *G. cornea* cuja morfologia é

diferenciada pelo talo cilíndrico formaram um grande grupo segregado das demais espécies de talo achatado evidenciado nas análises dos marcadores sequenciados.

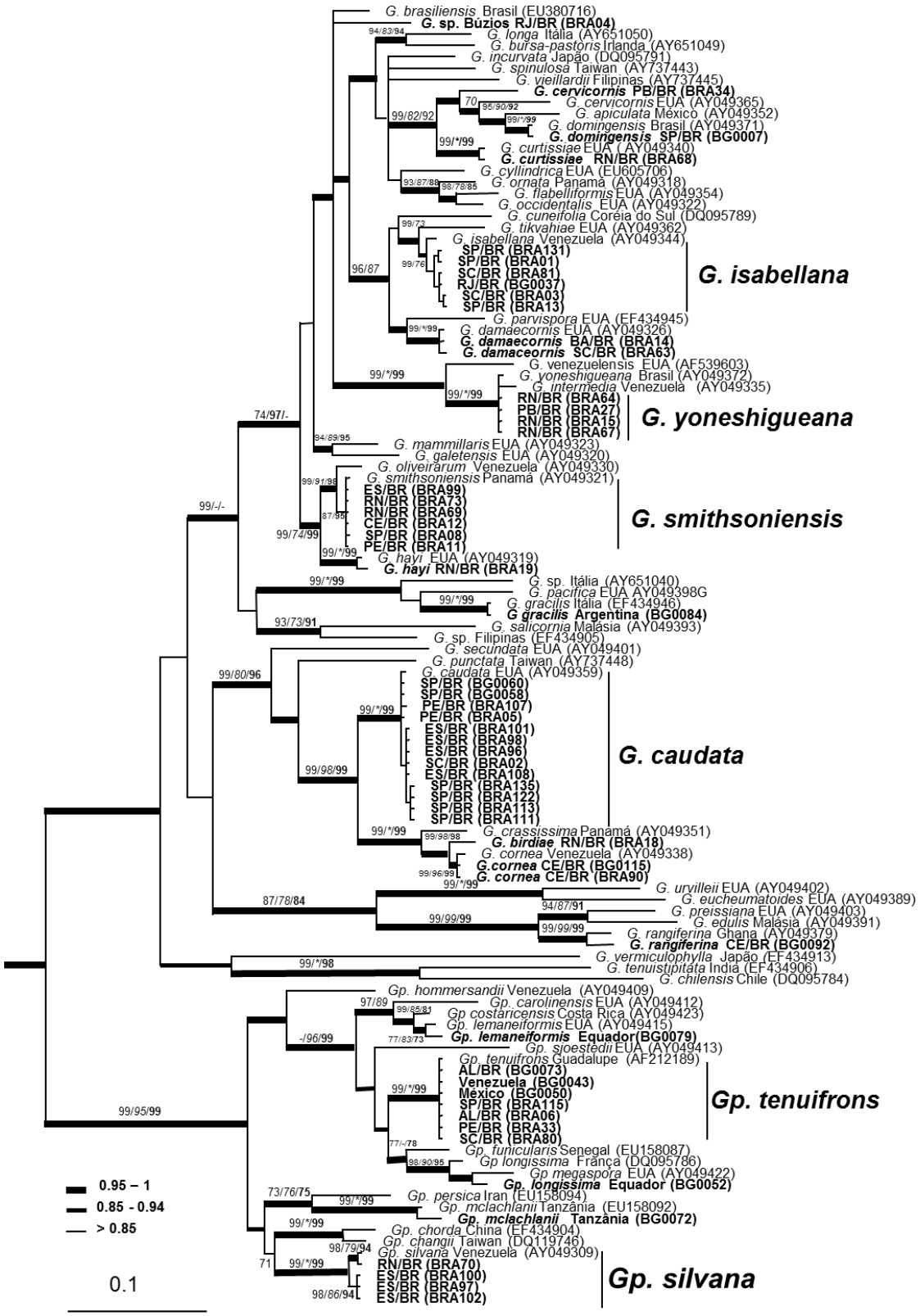


Figura 05: Árvore consenso da Análise Bayesiana para as sequências do marcador *rbc*L mostrando o agrupamento de espécies do gênero das algas Gracilarióides. Os valores nos ramos correspondem à análise de Bootstrap para Neighbor-Joining (NJ, 2000), Máxima Parcimônia (MP, 2000) em itálico, Máxima Verossimilhança (MV,100) em negrito e a espessura dos ramos à probabilidade a posteriori da análise bayesiana. *=100. As amostras sequenciadas neste trabalho estão em negrito.

Diversidade intra e interespecífica para os marcadores moleculares

Das amostras desse estudo utilizadas nas análises foi possível fazer as comparações dos níveis de divergência intra e interespecíficos dos táxons identificados para os marcadores analisados (Tabelas 4 e 5). Para o marcador plastidial UPA uma divergência intraespecífica máxima (Anexo 4) de 0,9% (3 pb) foi observada em *G. cervicornis* coletadas na Paraíba e no Rio Grande do Norte. Enquanto que para as espécies de *Gracilariopsis* não houve divergência intraespecífica. O marcador mitocondrial *cox*1 para o gênero *Gracilaria* apresentou uma divergência intraespecífica máxima (Anexo 5) de 1,3% (8 pb) entre os espécimes de *G. cornea* coletados no Ceará e o material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma oriundo de um cultivo em Israel. Enquanto que para as espécies de *Gracilariopsis* a divergência máxima (Anexo 5) encontrada foi de 2,5% (15 pb), para os espécimes de *Gp. silvana* coletados no Rio Grande do Norte e no Espírito Santo. Para o marcador *rbc*L encontramos a divergência intraespecífica máxima (Anexo 6) de 0,5% (3 pb) nos espécimes de *G. isabellana* coletados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. Enquanto a divergência máxima (Anexo 6) encontrada para o *rbc*L nas espécies de *Gracilariopsis* foi de 0,6% (9 pb), para os espécimes de *Gp. silvana*.

A divergência interespecífica (Tabela 5) encontrada para o marcador UPA foi de 0,3-5,5% (1-20 pb) nas espécies de *Gracilaria*, correspondendo essa divergência mínima (Anexo 5) entre às espécies de *G. birdiae* (Paraíba) e *G. cornea* (Ceará) e máxima entre *G. gracilis* (Argentina, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma) e *G. cornea* (Ceará). Enquanto a divergência para as espécies de *Gracilariopsis* foi de 0,9-2,2% (3-8 pb) correspondendo a divergência mínima (Anexo 5) às espécies de *Gp. lemaneiformis* (Equador, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e *Gp. mclachlanii* (Inglaterra, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e máxima *Gp. tenuifrons* (São Paulo) e *Gp. silvana* (Rio Grande do Norte). Para o marcador mitocondrial *cox*1 encontramos uma divergência interespecífica de 0,2-14,9% (15-99 pb) para as espécies de *Gracilaria*, correspondendo essa divergência mínima (Anexo 5) às espécies de *G. damaecornis* (Santa Catarina) e *G. flabelliformis* (Rio Grande do Norte) e máxima entre *G. hayi* (Rio Grande do Norte) e *G. gracilis* (Argentina, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma). Para as espécies de *Gracilariopsis* foi de 6,4-11,9% (43-79 pb)

correspondendo a divergência mínima (Anexo 6) às espécies *Gp. tenuifrons* (São Paulo) e *Gp. lemaneiformis* (Equador, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e máxima entre *Gp. longissima* (Inglaterra, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma da USP) e *Gp. silvana* (Espírito Santo). Para o marcador *rbc*L encontramos a divergência de 3,7-10,9% (54-160 pb) para as espécies de *Gracilaria* correspondendo a divergência mínima (Anexo 7) às espécies de *G*. sp. Búzios (Rio de janeiro) e *G. smithsoniensis* (Ceará) e máxima entre *G. rangiferina* (Ceará, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e *G. yoneshigueana* (São Paulo). Enquanto que para *Gracilariopsis* encontramos 3,3-8,0% (49-124 pb) correspondendo a divergência mínima (Anexo 7) às espécies de *Gp. tenuifrons* (Ceará mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e *Gp. lemaneiformis* (Equador, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma) e a máxima *Gp. mclachlanii* (Tanzânia, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e *Gp. longissima* (Inglaterra, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma).

Tabela 4. Divergência intraespecífica dos táxons estudados segundo os marcadores moleculares UPA, *cox*1 e *rbc*L. Na ausência de divergência usou (-) e na ausência de sequência (N).

	Marcador								
TÁXON	**UPA**			***cox*1**			***rbc*L**		
	Seqs*	**%**	**nt**	**Seqs***	**%**	**Nt**	**Seqs***	**%**	**nt**
Gracilaria birdiae	7	-	-	5	-	-	1	-	-
Gracilaria caudata	31	0-0,3	0-1	22	0-0,8	0-5	13	0-0,4	0-6
Gracilaria cearensis	1	-	-	N	N	N	N	N	N
Gracilaria cervicornis	3	0-0,9	0-3	N	N	N	1	-	-
Gracilaria cornea	12	-	-	10	0-1,3	0-8	2	0-0,1	0-2
Graccilaria cuneata	1	-	-	1	-	-	N	N	N
Gracilaria curtissiae	2	-	-	1	-	-	1	-	-
Gracilaria damaecornis	5	-	-	3	0-0,2	0-1	2	0-0,4	0-6
Gracilaria domingensis	7	-	-	2	-	-	1	-	-
Gracilaria flabelliformis	2	-	-	N	N	N	-	-	-
Gracilaria hayi	2	-	-	2	-	-	1	-	-
Gracilaria isabellana	14	-	-	10	0-0,2	0-1	6	0-0,5	0-7
Gracilaria gracilis	4	-	-	3	-	-	1	-	-
Gracilaria rangiferina	1	-	-	N	N	N	1	-	-
Gracilaria smithsoniensis	4	-	-	1	-	-	6	0-0,1	0-2
Gracilaria yoneshigueana	12	-	-	7	0-0,4	0-3	4	-	-
***Gracilaria* sp. Búzios**	N	N	N	1	-	-	1	-	-
Gracilariopsis lemaneiformis	2	-	-	2	-	-	1	-	-
Gracilariopsis longissima	2	-	-	2	-	-	1	-	-
Gracilariopsis mclachlanii	N	N	N	N	N	N	1	-	-
Gracilariopsis silvana	5	-	-	5	0-2,5	0-17	4	0-0,6	0-9
Gracilariopsis tenuifrons	16	-	-	20	0-0,4	0-3	7	0-0,1	0-2

***Número de Sequências geradas**

A divergência intergenérica (Tabela 5) encontrada para o marcador UPA foi de 6,3-7,1% (21-26 pb) correspondendo a mínima (Anexo 5) às espécies de *G. caudata* (Ceará) e *Gp. longissima* (Equador, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma) e máxima *Gp. tenuifrons* (São Paulo) e *G. cornea* (Ceará), enquanto para o marcador *cox*1 foi de 12,9-15,9% (86-106 pb) correspondendo a mínina (Anexo 6) *G. gracilis* (Argentina, mantida em cultivo no Banco de Germoplasma) e *Gp tenuifrons* (Alagoas) e máxima *Gp. silvana* (Rio Grande do Norte) e *G. domingensis* (São Paulo). Para o marcador *rbc*L a divergência foi de 8,8-

11,9% (129-172 pb) correspondendo a mínima (Anexo 7) *Gp. silvana* (Rio Grande do Norte) e *G. hayi* (Rio Grande do Norte) e máxima *G. rangiferina* (Ceará) e *Gp. longissima* (Inglaterra, material mantido em cultivo no Banco de Germoplasma).

Tabela 5. Divergências intraespecífica, interespecífica e intergenérica das espécies de algas gracilarióides estudadas segundo os marcadores moleculares UPA, *cox*1 e *rbc*L.

Comparação	**UPA** (370pb)		***cox*1** (664pb)		***rbc*L** (1470pb)	
	%	**Nt**	**%**	**nt**	**%**	**Nt**
Intraespecífica						
Gracilaria	0-0,9	0-3	0-1,3	0-8	0-0,5	0-7
Gracilariopsis	0	0	0-2,5	0-17	0-0,6	0-9
Interespecífica						
Gracilaria	0,3-5,5	1-20	2,3-14,8	15-99	3,7-10,9	54-160
Gracilariopsis	0,9-2,2	3-8	6,4-11,9	43-79	3,3-8,0	49-124
Intergenérica						
Gracilaria* vs *Gracilariopsis	6,3-7,1	15-26	12,9-15,9	86-106	8,8-11,9	129-172

Discussão

A flora marinha bêntica brasileira, com poucas exceções, tem afinidade tropical e subtropical e é rica em número de espécies de Gracilariaceae. Das espécies citadas previamente para a costa brasileira quatro são cilíndricas e 22 são achatadas (Tabela 6, Capítulo 4). No Brasil e no resto do mundo espécies achatadas de *Gracilaria* são possivelmente um grupo morfologicamente variável, o que gera uma enorme confusão taxonômica ainda carente de estudos mais detalhados (Bellorin 2002).

A separação bem estabelecida entre as espécies de *Gracilaria* e *Gracilariopsis* é confirmada pelos três marcadores analisados, corroborando a distinção entre esses dois gêneros e corroborando sua monofilia. Baseado nos dados moleculares, caso o gênero *Hydropuntia* fosse reconhecido como gênero distinto tornaria o gênero *Gracilaria* parafilético.

Nas análises morfológicas (Capítulo 4) as espécies cilíndricas de ocorrência no Brasil do gênero *Gracilaria*, *G. cornea*, *G. caudata* e *G. birdiae* possuem

caracteres morfológicos bem próximos, dificultando na separação dessas espécies. No entanto, essa dificuldade é acentuada quando comparamos *G. caudata* e *G. birdiae* devido à sobreposição de caracteres morfológicos (Bellorin 2002). Com base em dados moleculares foi possível distinguir essas três espécies através do sequenciamento dos marcadores *cox*1, UPA e *rbc*L que apresentaram os mesmos resultados, de modo que temos três clados formados pelos respectivos táxons, representantes cilíndricos do gênero *Gracilaria*. Os dados moleculares corroboram também a proximidade filogenética das três espécies, especialmente a proximidade entre *G. birdiae* e *G. cornea*. A região do *cox*1 mostrou ainda uma diferenciação biogeográfica, por exemplo, entre os haplótipos de *G. caudata* distribuídos ao longo da costa do Brasil, que pode ser um interessante modelo para estudos filogeográficos.

Aplicações baseadas no sequenciamento do DNA mitocondrial (DNAmt) tem despertado o interesse de pesquisadores em estudos de populações animais devido à rápida evolução, ausência de recombinação e herança uniparental do DNAmt. Em algas vermelhas, diferentes marcadores como *cox*1, ITS1 e ITS2, *rbc*L, *cox*2-3 têm sido empregados nos estudos de diversidade populacional. Análises do *cox*1 foram usadas em estudos de haplótipos de *Gracilaria changii*, mostrando que é também um marcador confiável também para estudos intraespecíficos, e útil para revelar parentesco entre as espécies, estrutura da população e a diversidade de espécies crípticas (Yow et al. 2011)

Em relação às espécies de talo achatado, *G. yoneshigueana* foi descrita por Gurgel et al. (2004b) para o estado do Rio de Janeiro. No entanto, para este trabalho, os materiais coletados no Rio Grande do Norte, na Paraíba e em Santa Catarina revelaram alta similaridade com o material da localidade tipo, ampliando assim sua área de ocorrência. Além dos dados moleculares obtidos pelos marcadores (UPA, *cox*1 e *rbc*L), essas amostras foram analisadas morfologicamente e comparadas ao material da descrição original. Essa espécie apresenta uma distância filogenética para o gene *rbc*L relativamente pequena se comparada à *G. intermedia* da Venezuela (Gurgel et al. 2008). Uma amostra coletada no Rio Grande do Norte, BRA67 (SPF57182) foi identificada inicialmente como *G. intermedia*, no entanto as sequências obtidas com os três marcadores moleculares, incluindo o *cox*1, que é relativamente mais variável foram idênticas às sequências dos materiais identificados como *G. yoneshigueana*, o que nos levou a concluir que o material de

ocorrência na costa brasileira identificado como *G. intermedia*, trata-se de *G. yoneshigueana*.

A espécie *G. lacinulata* foi posta em sinoníma com *G. isabellana* por Gurgel et al. (2004c). A espécie *G. lacinulata* foi descrita para o Brasil com ocorrência apenas para o estado da Bahia (Bellorin 2002; Nunes 2005). No entanto, as amostras inicialmente identificadas como *G. lacinulata*, analisadas nesse trabalho foram coletadas nos estados de São Paulo e de Santa Catarina. Isto se aplica também a outros materiais coletados nos estados de São Paulo e Santa Catarina que foram previamente identificados como *G. tepocensis*. Essa espécie fora citada por Cordeiro-Marino (1972) para o estado de Santa Catarina assim como em trabalhos subsequentes (Horta & Bellorin 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006). No entanto, neste estudo observamos que a espécie identificada como *G. tepocensis* trata-se de *G. isabellana*, o que nos levou a concluir que a espécie *G. tepocensis* tenha sido erroneamente identificada e, portanto, não ocorra no Brasil.

As amostras *G. cuneata* e *G. curtissiae* se mostraram molecularmente próximas para o marcador UPA, o que é corroborado pelos dados de outros trabalhos que mostram que essas espécies divergiram recentemente como espécies irmãs (Gurgel et al. 2008). A espécie de *G. curtissiae*, cujo talo apresenta-se em forma de fita ramificada, foi descrita detalhadamente pela primeira vez por Bellorin (2002). A espécie se distingue das demais em virtude de seu grande porte, além das características da anatomia da medula (organização das células) e do cistocarpo, que auxiliam na sua diferenciação de outras espécies achatadas. Mesmo assim, *G. curtissiae* pode ser confundida com *G. mammillaris* e outras espécies semelhantes, gerando muitas vezes uma série de identificações errôneas, sendo frequente a confusão entre *G. cuneata* e *G. curtissiae* nos materiais de herbário estudados por Bellorin (2002). Nesse caso, adição de dados moleculares é fundamental para auxiliar na identificação das espécies. A espécie *G. cuneata* é bastante frequente no Nordeste brasileiro, apesar da confusão estabelecida com *G. curtissiae*.

A espécie *G. smithsoniensis* foi citada apenas para o estado da Bahia (Nunes 2005) com base exclusivamente em dados morfoanatômicos. No presente trabalho as amostras sequenciadas foram coletadas nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Espírito Santo e São Paulo, com confirmação da identificação dos dados através das análises com o marcador *rbc*L.

Os materiais analisados molecularmente e identificados como *G. hayi* foram coletados no Rio Grande do Norte, previamente identificados como *G. cuneata* e *G. curtissiae* devido a sua semelhança com essas duas espécies, porém as sequências amplificadas de *cox*1, UPA e *rbc*L corroboram os resultados obtidos por Gurgel et al. (2004b) quando descreveram essa espécie oriunda do Panamá com base em dados moleculares.

Os espécimes de *G. cervicornis* coletados no Rio Grande do Norte e na Paraíba apresentaram divergência acima do esperado para o marcador UPA. Essa espécie apresenta uma morfologia externa semelhante à *G. domingensis*, porém, trabalhos desenvolvidos por Oliveira et al. (1983) e Plastino (1985) apresentam descrição detalhada dessa espécie, atestando sua identificação específica, além dos trabalhos desenvolvidos por Fredericq & Hommersand (1989a, b) cujos estudos apresentam a ontogenia do aparelho masculino e formação do cistocarpo. Apenas foi possível sequenciar o *rbc*L para a amostra da Paraíba, que comparada com a sequência disponível no GenBank para *G. cervicornis* dos E.U.A. (Atlântico) também apresentou uma divergência acima do esperado para esse marcador, indicando que talvez seja uma espécie críptica. Apesar da morfologia ser bastante característica de *G. cervicornis* e muito similar ao material coletado no Rio Grande do Norte, os resultados obtidos com dados moleculares para o espécime da Paraíba nos levam a acreditar que tratam-se de duas espécies distintas devido à alta divergência encontrada com os marcadores sequenciados.

Os espécimes de *G. damaecornis*, foram coletados nos estados da Bahia, São Paulo e Santa Catarina, são muito proximamente relacionadas com *G. domingensis* em sua morfologia. Estudos pretéritos baseados análises morfológicas e moleculares (SSU rDNA) realizados por Bellorin (2002) comparando *G. damaecornis* com *G. caudata* da Venezuela não apresentaram divergências que as separassem como entidades específicas distintas, no entanto as análises com os marcadores *cox*1, UPA e *rbc*L corroboraram os resultados de que trata-se de *G. damaecornis*, espécie estudada por Ganesan (1993) com material da Venezuela.

O agrupamento formado pelas espécies de *Gracilariopsis* mostrou que as espécies analisadas neste estudo estão bem definidas quando comparadas ao material depositado no Genbank, ficando bem estabelecido o agrupamento de *Gp. tenuifrons*, esta que até o presente trabalho fora descrita como a única espécie de *Gracilariopsis* de ocorrência no Brasil (Oliveira & Plastino 1994).

Com base em análises morfológicas (Capítulo 4) e moleculares foi possível identificar uma nova ocorrência de *Gracilariopsis silvana* como uma nova ocorrência para o Brasil, espécie que foi originalmente descrita com base em dados moleculares do marcador *rbc*L por Gurgel et al. (2003). No Brasil foram encontrados dois haplótipos na comparação dos materiais coletados no Rio Grande do Norte e no Espírito Santo.

As análises moleculares das algas gracilarióides achatadas revelaram que espécies com hábito semelhantes são de fato entidades genéticas distintas, o que explica essa confusão taxonômica (Bellorin 2002). Apesar das diferenças moleculares descobertas, a delineação morfológica de táxons geneticamente distintos, mas vegetativamente similares ainda permanece como uma tarefa difícil (Gurgel et al. 2004b). A resolução taxonômica de espécies pobremente conhecidas, a exemplo das algas de talo achatado, especialmente aquelas com morfologia similar (crípticas) só é possível de se resolver com análises de sequências de DNA e estudos morfológicos comparativos, particularmente aqueles da ontogenia das estruturas de reprodução (Bellorin 2002). Nesse sentido, o estabelecimento de um banco de sequências de marcadores curtos como os “DNA barcodes” podem ser de grande valia na rápida identificação dessas espécies.

Referências

Bellorin, AM (2002) Sitemática e Filogenia molecular de algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo,

Bellorin AM, Oliveira MC, Oliveira, EC (2002) Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on SSU DNAr and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. J Phycol 38:551-563

Bhattacharya D, Elwood HJ, Goff LJ, Sogin ML (1990) Phylogeny of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) based on sequence analysis of its small ribosomal RNA coding region. J. Phycol 26:181-6

Blaxter M, Jenna M, Tom C, Fran T, Claire W, Robin F, Eyualen A (2005) Defining operational taxonomic ubits using DNA barcodes data. Phil Trans R Soc B 360, 1935-1943

Bird CJ, McLachan J (1982) Some underutilized taxonomic criteria in Gracilaria (Rhodophyta, Gigartinales). Bot Mar 25:557-562

Bird CJ, Rice EL (1990) Recent approaches to the taxonomy of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) and the *Gracilaria verrucosa* problem. Hydrobiologia 204/205:111-8

Bird CJ, Rice EL, Murphy CA, Ragan MA (1992) Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. Phycologia 31:510-522

Bird CJ, Ragan MA, Critchley AT, Rice EL, Gutell RR (1994) Molecular relationship among the Gracilariaceae (Rhodophyta): further observations on some undetermined species. Eur J. Phycol 29:195-202

Cordeiro-Marino M (1972) Rodofíceas Marinhas do estado de Santa Catarina. Instituto de Biociências, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Destombe C, Douglas, SE (1991) Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. Curr Genet 19:395-8

Faugeron S, Valero M, Destombe C, Martinez EA, Correa JA (2001) Hierarchical spartial struture and discriminant analysisof genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodoplyta). J Phycol 37: 705-717

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783–791

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA ―primers‖ for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3, 294–299

Fredericq S, Hommersand MH (1989a) Proposal of Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. J Phycol 25:213-27

Fredericq S, Hommersand MH (1989b) Comparative morphology and taxonomic satatus of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Phycol 25:228-243

Freshwater DW, Fredericq S, Butler BS, Hommersand MH, Chase MW (1994) A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbc*L. Proc Natl Acad Sci USA 91:7281-7285.

Ganesan, EK (1993) Morphological and Taxonomic studies on some little-Knowm species of *Gracilaria* (Gracilariales: Rhodophyta) from Venezuela. 1. *G. damaecornis*. Hydrobiologia 260/261:91-6

Goff LJ, Colleman, AW (1988) The use of Plastid DNA restriction and nuclease patterns in delineating red algal species and population. J Phycol 24:357-68

Goff LJ, Moon DA, Coleman AW (1994) Molecular delineation of species and species relationship in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). J Phycol 30:521-537

Guimarães SMPB (2006) A revised checklist of benthic marine Rhodophyta from the State of Espírito Santo. Bol Inct Bot 17:143-194

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (1999) Characterization and biogeographic affinities of the red algal genus, *Gracilaria* (Gracilariales), in the Gulf of México. J Phycol 35:13

Gurgel CFD (2001) Phylogeny, Taxonomy and Biogeography of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with Emphasis on Taxa from the Western Atlantic. Ph.D. Dissertation. University of Louisiana at Lafayette, UMI microform nº 3029835, Bell & Howell-Proquest Information and Learning Press, Ann Harbor, MI. 273 pp.

Gurgel CFD, Liao LM, Fredericq S, Hommersand MH (2003) Systematyics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbc*L sequence analyses and mophological evidence. J Phycol 39:154–171

Gurgel CFD, Fredericq S (2004a) Molecular systematics and taxonomy of flattened species of *Gracilaria* Greville (Gracilariaceae, Gracilariales, Rhodophyta) from the western Atlantic. In: *Taxonomy of economic seaweeds, with reference to the Pacific and other locations.* vol.IX (Ed. By I.A. Abbott & K.J. McDermid), pp.159-199. Hawaii, Honolulu, HI,USA

Gurgel CFD, Fredericq S (2004b) Systematics the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): A critical assessment based on *rbc*L sequence analyses. J Phycol 40:138-159

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (2004c) *Gracilaria apiculata* e *G. flabelliformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta): restoring old names for common tropical western atlantic species, including the recognition of three new subspecies, and replacement name for "*G. lacinulata*". Cryptogamie, Algol 25 367-396

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris, JN, Yoneshigue-Valentim Y (2008) Two news flat species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *G. abyssalis* sp. nov. and *G. brasiliensis* sp. nov. Phycologia 47, 249-264

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp. Ser. 41:95-98

Hagopian, J.C., Reis, M., Kitajima, J.P., Bhattacharya, D. & Oliveira, M.C. 2004. Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights on the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. J Mol Evol 59:464-477

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert, PDN, Hickey DA (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics.TRENDS in Genetics Vol.23 No.4

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcoding. Proc of the Royal Society of London, B, 270: 313-322

Horta PA, Bellorin AM (2002) Observações morfo/anatômicas de *Gracilaria tepocensis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) do infralitoral do Sul e Sudeste brasileiro. Insula 29-37

Huelsenbeck JP, Ronquist FR (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17:754–755

Hughey JR, Silva PC, Hommersand, MH (2001) Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinaceae (Rhodophyta) using DNA from type material. J. Phycol. 37,1091–1109

Knowlton N, Weigt LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. Proc R Soc Lond B 265, 2257–2263

Maggs, CA, Douglas SE, Fenety J, Bird CJ (1992) A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. J Phycol 28:214-232

McLachlan J, Bird CJ (1986) *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and Productivity. Aquatic Botany, 26:27-49

Meyer CP, Paulay, G (2005)DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS* Biology. 3 2229-2238

Nunes JMC (2005) Rodofíceas Marinhas Bentônicas do Estado da Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Nylander, JAA (2004) Bayesian phylogenetics and the evolution of gall wasps. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 34p

Oliveira EC, Bird CJ, Mclachlan J (1983) The genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gigartinales) in the Westrn Atlantic. *G. domingenesis* Sond ex Küz., *G. cervicornis* (Turn.) J. Ag. & *G. ferox* J Ag Can J Bot 61:2999-3008

Oliveira EC and Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In Akatsuka I (ed) Biology of economic algae. SSB Academic Publi. The Hague, pp 185-226

Plastino EM (1985) As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Paraia Dura , Ubatuba, SP. Aspectos Biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo

Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14:817-8

Presting GG (2006) Identification of conserved regions in the plastid genomicimplications for DNA

barcoding and biological function. Canadian Journ Bot 84:1434 – 1443

Ross PJ, Donaldson SL, Saunders GW (2003) A molecular investigation of Mazzaella (Gigartinales Rhodophyta) morphologically intermediate between Mazzaella linearis and M. splendens. Bot Mar 46, 202–213. (doi:10.1515/BOT.2003.020.)

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

Saunders GW (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Phil R Soc 360:1879-1888 doi:10.1098/rstb.2005.1719

Saunders GW (2009) Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveal the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. Mol Ecol Res 9:140-150

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick KG, Lane R (2005) Towards writing the encyclopedia of life an introduction to DNA barcoding. Phil Trans R Soc B 360:1805-1811

Sherwood AR, Presting GG (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in Eukaryotic Algae and Cyanobacteria. J Phycol 43:605-608

Sherwood AR, Kurihara A, Conklin, KY, Sauvage T, Presting GG (2010) The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings BMC Plant Biology 2010, 10:258

Steentoft M, Irvine LM, Farnham WF (1995) Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. Phycology 34:113-27

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

Swofford DL (2002) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parismony, version 4.08a. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill

Tai V, Lindstrom SC, Saunders GW (2001) Phylogeny of the Dumontiaceae (Gigartinales, Rhodophyta) and associated families based on small-subunit rDNA and internal transcribed spacer sequence data. J Phycol 37: 184–196

Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol and Evol 10:512-526

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol and Evol 28: 2731-2739

Yow YY, Lim PE, Phang SM (2011) Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox*1 gene analysis. J Appl Phycol 23:219-226

Zhang DX, Hewitt GM (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial — primers ‖ in insects. Insect Mol Biol 6, 143–150

Zuccarello GC, West JA (1997) Hybridization studies in *Bostrychia*: 2. Correlation of crossing data and plastid DNA sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta). Phycologia 36 (4), 293-304

Capítulo 4

Espécies de Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) na costa brasileira: distribuição e comentários taxonômicos

Resumo

Nesse capítulo apresenta-se uma revisão da família Gracilariaceae na costa brasileira, abordando os problemas taxonômicos presentes no grupo, assim como uma discussão sobre os caracteres diagnósticos utilizados na separação e delimitação das espécies. O estudo das algas gracilarióides ainda é bastante problemático, em virtude da grande plasticidade morfológica observada nas espécies, o elevado número de espécies, a presença de espécies crípticas, além de outras dificuldades. Foram estudadas as espécies pertencentes aos gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis*, com ênfase nas espécies achatadas por serem menos conhecidas. Os caracteres morfológicos largamente utilizados na identificação das espécies, a exemplo da distribuição dos espermatângios e a anatomia do cistocarpo, mostraram-se pouco precisos na separação das espécies de talo achatado. Descreveu-se brevemente 16 táxons, posterior a identificação utilizando-se técnicas moleculares a qual se mostrou valiosa na delimitação dos táxons, contribuindo no reconhecimento de espécies crípticas.

Abstract

This chapter presents a review of the family Gracilariaceae on the Brazilian coast, addressing taxonomic problems in this group, as well as a discussion of the diagnostic characters used in separating and distinguishing the species. The study gracilarioid algae is still problematic because of the great morphological plasticity observed in the species, the large number of species, the presence of cryptic species and other difficulties. We studied the species belonging to the genera *Gracilaria* and *Gracilariopsis*, with emphasis on the flattened species, known to be less studied. Morphological characters widely used in the identification of species, such as the

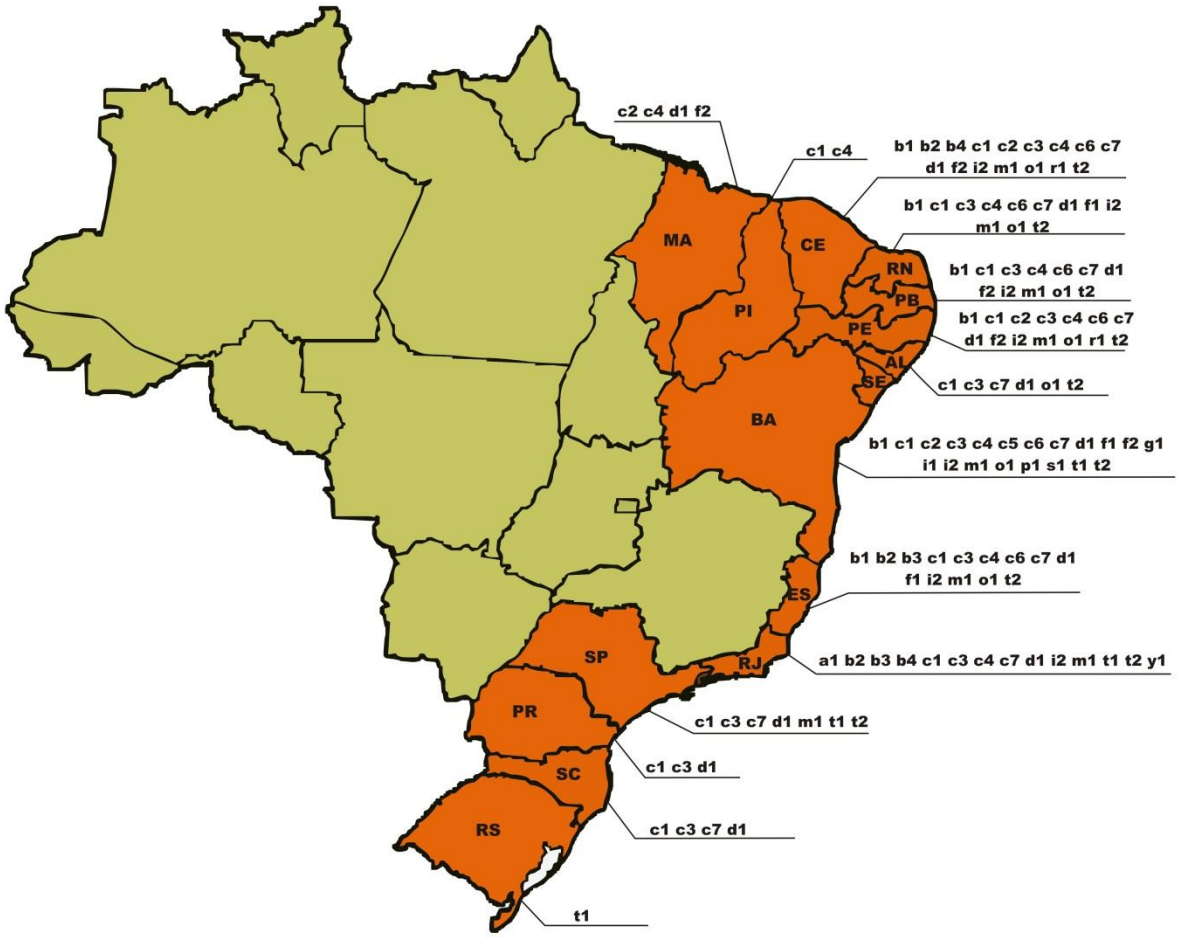
distribution of spermatangia and anatomy of the cistocarp, proved inaccurate in separating the 16 taxa of flattened species present in the coast of Brazil. The species were described briefly, after identification assisted by molecular techniques, which proved to be valuable in the delimitation of taxa, contributing in the recognition of cryptic species.

Introdução

O número de espécies de Gracilariaceae no Brasil é questionável deixando dúvidas devido à grande plasticidade fenotípica das espécies e à ampla distribuição geográfica ao longo da costa brasileira. Alguns trabalhos baseados exclusivamente em dados morfológicos foram desenvolvidos com as espécies brasileiras, no entanto as limitações de caracteres morfológicos taxonomicamente informativos levaram à algumas identificações pouco precisas, resultando em uma série de divergências quanto ao número de espécies que ocorrem no Brasil (e.g. Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Oliveira 1994; Horta & Bellorin 2002; Plastino & Oliveira 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006).

No Brasil, vários trabalhos, citados acima, foram desenvolvidos abordando aspectos taxonômicos, além de aspectos fisiológicos (Plastino et al. 1998; Costa & Plastino 2001; Ursi & Plastino 2001; Guimarães et al. 2003; Plastino et al. 2004; Ferreira et al. 2006) e estudos de maricultura (Oliveira et al. 2000, Soriano-Marinho et al. 2002, 2007) buscando o conhecimento mais refinado sobre a biologia do grupo.

Representantes dessa família ocorrem desde a região Nordeste (Maranhão) até região Sul (Rio Grande do Sul), apresentando uma morfologia bastante diversificada (Figura 6). Os estudos desenvolvidos no Brasil foram realizados principalmente com as espécies cilíndricas: *Gracilaria caudata*, *G. cornea* e *G. birdiae*, esta última descrita com base em estudos detalhados e teste de hibridização (Plastino & Oliveira 2002), além da *Gracilariopsis tenuifrons*. O interesse em se estudar primeiro as espécies de talo cilíndrico foi devido à grande importância econômica, pela presença de ágar de melhor qualidade nesse grupo. Entretanto, estudos mais recentes (Gurgel et al. 2004a; Gurgel et al. 2008) mostraram que a diversidade nas Gracilariaceae de talo achatado é bem maior que nas de talos cilíndricos.



Gracilaria abyssalis	a1
Gracilaria birdiae	b1
Gracilaria blodgetii	b2
Gracilaria brasiliensis	b3
Gracilaria bursa-pastoris	b4
Gracilaria caudata	c1
Gracilaria cearensis	c2
Gracilaria cervicornis	c3
Gracilaria cornea	c4
Gracilaria crassissima	c5
Gracilaria cuneata	c6
Gracilaria curtissiae	c7
Gracilaria domingensis	d1
Gracilaria flabelliformis	f1
Gracilaria foliifera	f2
Gracilaria galetensis	g1
Gracilaria intermedia	i1
Gracilaria isabellana	i2
Gracilaria mammillaris	m1
Gracilaria ornata	o1
Gracilaria pauciramosa	p1
Gracilaria rangiferina	r1
Gracilaria smithsoniensis	s1
Gracilaria tepocensis	t1
Gracilaria yoneshigueana	y1
Gracilariopsis tenuifrons	t2

Figura 6. Mapa de distribuição das espécies de Gracilariaceae na Costa brasileira com base na literatura (Tabela 6)

No Brasil são apontadas cerca de 26 espécies de Gracilariaceae, sendo 25 representantes do gênero *Gracilaria* Greville e uma do gênero *Gracilariopsis* Dawson (Tabela 6)

Poucos estudos moleculares foram desenvolvidos com as espécies brasileiras (Gurgel et al. 2001, 2004a, 2008; Bellorin 2002), o que motivou a realização desse trabalho, contribuindo para a descrição de novas espécies e auxiliando na elucidação taxonômica do grupo.

Os gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis*

Os gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis* são descritos para a família Gracilariaceae, distinguindo-se principalmente pela ausência de filamentos nutritivos tubulares em *Gracilariopsis*, assim como o tamanho das células do gonimoblasto, que são supostamente menores, e a distribuição dos espermatângios do tipo "chorda". Essas características foram apontadas por Dawson (1949) sugerindo assim a validação do gênero *Gracilariopsis*. Vários trabalhos baseados em dados moleculares (Scholfield et al. 1991; Steentoft et al. 1995; Bellorin et al. 2002; Gurgel et al. 2003; Gurgel 2004b) apresentaram evidências robustas para a sustentação de que *Gracilariopsis* e *Gracilaria* são gêneros distintos. No entanto, a separação entre *Hydropuntia* e *Gracilaria* ainda é bastante questionada, uma vez que os dois gêneros diferem apenas em detalhes anatômicos do espermatângio e do cistocarpo, o que para alguns autores não representam características suficientes para a separação dos dois gêneros (Plastino & Oliveira 1996). Além disso, filogenias baseadas na comparação de sequências de DNA apontaram que *Hydropuntia* não é uma linhagem separada de *Gracilaria* (Bird et al. 1992, 1994; Bellorin 2002).

O gênero *Gracilaria* foi descrito por Greville (1830), baseado em algumas espécies do gênero *Sphaerococcus* (Stackhouse), resultando na transferência de 16 espécies para o novo gênero, mas descrevendo completamente apenas quatro espécies: *Gracilaria confervoides*, *G. compressa*, *G. ereta* e *G. purpurascens*. Em sua descrição original Greville (1830) não especificou uma espécie tipo para o gênero, de tal forma que Schimtz (1889) nomeou *Gracilaria confervoides* como a espécie tipo. Posteriormente Papenfuss (1950) demonstrou que *Fucus verrucosus* era o nome correto, prevalecendo sobre *Fucus confervoides* (Linnaeus), o que foi aceito mais tarde por outros autores, propondo a combinação *G. verrucosa* (Hudson)

como espécie tipo. Estudos posteriores demonstraram que a espécie *G. verrucosa* designada como espécie tipo pertencia ao gênero *Gracilariopsis*. Dessa forma, uma revisão criteriosa realizada por Steentoft et al. (1991) propôs que *Gracilaria compressa* uma das espécies originalmente descritas por Greville (1830) fosse considerada a espécie tipo (Lectotipo).

Embora o gênero *Gracilaria* seja razoavelmente bem definido dentro das Gracilariales, sua taxonomia é bastante complexa e confusa (Bird & McLachlan 1982; Bird et al. 1982; Oliveira 1984). *Gracilaria* está entre os gêneros de algas vermelhas mais diversificado, compreendendo um grande número de espécies distribuídas pelo mundo, muitas das quais são de importância econômica e ecológica. Atualmente, são aceitas cerca de 167 espécies de *Gracilaria* (Guiry & Guiry 2010).

Sjöestedt (1926) foi o primeiro pesquisador a fazer investigações detalhadas da morfologia e da anatomia de três espécies de *Gracilaria*. A história taxonômica das espécies de *Gracilaria* é caracterizada por uma permanente instabilidade no que diz respeito à sua nomenclatura, o que resulta numa confusa polêmica quanto ao número de espécies descritas. As razões disto residem na falta e na dificuldade de se obter caracteres morfológicos diagnósticos e na ampla distribuição geográfica (Oliveira 1984; Fredericq & Hommersand 1989a).

Dawson (1949) propôs a separação do gênero *Gracilariopsis* de *Gracilaria* com base em dados morfoanatômicos do cistocarpo. Dessa forma a separação foi proposta considerando-se que *Gracilariopsis* não apresentava gonimoblastos conectados ao pericarpo por filamentos nutritivos tubulares como em *Gracilaria*, a organização das células do espermatângio é caracterizada pelo tipo “chorda” e diferenças na anatomia do cistocarpo com gonimoblastos em forma de domo, além de células com protoplasma denso de onde surgem cadeias de carposporângios simetricamente radiadas (Eldestein et al. 1978). Essas diferenças inicialmente não foram consideradas como suficientes para a proposição de um novo gênero, uma vez que Papenfuss (1966) analisando a espécie tipo de *Gracilaria* (*Gracilaria verrucosa*) concluiu que alguns espécimes apresentavam características típicas de Gracilaria enquanto outros apresentavam características típicas de *Gracilariopsis*. Diante desses resultados, Papenfuss considerou *Gracilaria* e *Gracilariopsis* como sinônimos, ignorando o fato de ele estar trabalhando com espécies simpátricas, como mostrado posteriormente por Steentoft et al. (1995).

Alguns trabalhos com *Gracilariopsis* apontavam para a presença de outros caracteres que o distinguiam como gênero válido, assim Yamamoto (1975) descreveu um material do Japão como correspondente a *Gracilariopsis* com base na distribuição dos espermatângios. Apesar da importância das características apontadas como exclusivas de *Gracilariopsis*, sua aceitação ainda permaneceu bastante questionável por boa parte dos pesquisadores.

O gênero *Gracilariopsis* só foi aceito posteriormente aos trabalhos publicados por Fredericq e Hommersand (1989b), baseados na anatomia e ontogenia reprodutiva em *Gracilaria lemaneiformis* (Bory) Weber Van Bosse, atualmente *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory de Saint-Vicent) E.Y. Dawson, Acleto & Foldvik. Atualmente, são descritas cerca de 20 espécies de *Gracilariopsis* em todo o mundo (Gurgel et al. 2003).

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição dos táxons auxiliada pela literatura do grupo (e.g. Oliveira & Plastino 1994; Plastino & Oliveira 2002; Bellorin 2002; Nunes 2005), abordando alguns caracteres encontrados nos espécimes estudados, assim como uma revisão das espécies descritas com base na morfologia seguida de comentários acerca do material estudado.

Tabela 6. Ocorrência das espécies de Gracilariales no Brasil.

Espécie	Estado	Referências
1. *Gracilaria abyssalis* Gurgel & Yoneshigue-Valentin	RJ	Gurgel et al. 2008
2. *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C.Oliveira	CE, RN, PB, PE, ES	Plastino & Oliveira 2002; Guimarães 2006
3. *Gracilaria blodgettii* Harvey	CE, ES, RJ	Oliveira 1977; Guimarães 2006; Pacheco 2011
4. *Gracilaria brasiliensis* Gurgel & Yoneshigue-Valentin	ES, RJ	Gurgel et al. 2008
5. *Gracilaria bursa-pastoris* (S.G. Gmelin) P.C. Silva	CE, RJ	Taylor 1960
6. *Gracilaria caudata* J.Agardh	PI, CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Cordeiro-Marino 1972; Nunes 2005
7. *Gracilaria cearensis* (A.B. Joly & Pinheiro) A.B. Joly & Pinheiro	MA, CE, PE, BA	Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Nunes 2005
8. *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Taylor 1960; Joly 1965; Cordeiro-Marino 1972; Oliveira 1977; Oliveira et al. 1983; Guimarães 2006; Nunes 2005
9. *Gracilaria cornea* J. Agardh	MA, PI, CE, RN, PB, PE, BA, ES, RJ	Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Nunes 2005
10. *Gracilaria crassissima* (P.L. Crouan & H. Crouan) P.L. Crouan & E H. Crouan	BA	Nunes 2005
11. *Gracilaria cuneata* Areschoug	CE, RN, PB, PE,BA, ES	Oliveira 1977; Bellorin 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006
12. *Gracilaria curtissiae* J. Agardh	CE,RN, PB,PE,AL, BA, ES, RJ, SP, SC	Oliveira 1977; Bellorin 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006
13. *Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie	MA, CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Cordeiro-Marino 1972; Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Oliveira et al. 1983; Nunes 2005; Guimarães 2006
14. *Gracilaria flabelliformis* (P.L. Crouan & H.M. Crouan) Fredericq & Gurgel	ES, RN	Gurgel et al. 2004b; Nunes 2005; Guimarães 2006

Tabela 6. Continuação

Espécie	Estado	Referências
15. *Gracilaria foliifera* var *angustissima* W.R. Taylor	MA, CE, PB, BA	Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Nunes 2005
16. *Gracilaria galetensis* C.F.D.Gurgel, S.Fredericq & J.N.Norris	BA	Nunes 2005
17. *Gracilaria intermedia* J. Agardh	BA	Nunes 2005
18. *Gracilaria isabellana* Gurgel, Fredericq & J.N. Norris	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ	Nunes 2005
19. *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M. A. Howe	CE, RN, PB, PE, BA, ES, RJ, SP	Taylor 1960; Joly 1965b; Oliveira 1977; Bellorin 2002; Guimarães 2006
20. *Gracilaria ornata* Areschoug	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES	Oliveira 1977; Gurgel 2001; Nunes 2005; Guimarães 2006
21. *Gracilaria pauciramosa* (N. Rodríguez de Ríos) A.M.Bellorin, M.C.& E.C.Oliveira	BA	Nunes 2005
22. *Gracilaria rangiferina* (Kützing) Piccone	PE	Silva et al. 1996
23. *Gracilaria smithsoniensis* Gurgel, Fredericq & J.N. Norris	BA	Nunes 2005
24. *Gracilaria tepocensis* (E.Y. Dawson) E.Y. Dawson	BA, RJ, SP, SC, RS	Cordeiro-Marino 1972; Oliveira 1977; Nunes 2005
25. *Gracilaria yoneshigueana* Gurgel, Fredericq & J.N.Norris	RJ	Gurgel et al. 2004b
26. *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J.Bird & E.C.Oliveira) Fredericq & Hommersand	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP	Oliveira 1984; Nunes 2005

Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado com amostras oriundas de coletas pretéritas depositadas no herbário da Universidade de São Paulo, SPF (Index Herbariorum: http://207.156.243.8/emu/ih/index.php), e coletas recentes, de modo a abranger uma ampla gama da biodiversidade.

As amostras coletadas em campo (Tabela 7) foram triadas com o auxílio de uma lupa. Para as análises morfológicas utilizou-se a porção remanescente dos exemplares de onde foram removidas as amostras para DNA, além de outros indivíduos inteiros da mesma população que foram fixadas em formol 4%. Após a análise morfológica, o material preservado em formol foi utilizado para confecção das exsicatas que foram posteriormente depositadas no Herbário SPF.

Os cortes anatômicos foram feitos à mão-livre com auxílio de lâmina de barbear e corados com azul de anilina a 1%, acidificada com HCl 1N. Algumas lâminas semi-permanentes foram confeccionadas e preservadas com Karo ® 50%. A etapa de identificação com base em caracteres morfológicos (Tabela 8) foi feita utilizando-se ampla literatura. As fotografias que ilustram o texto foram feitas em microscópio da NIKON Eclipse E200 munido de escala e fotografados com câmera digital da Sony Cyber-shot de 14 megapixels.

Tabela 7. Listas das amostras coletadas de Gracilariales analisadas nos estudos morfológicos.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude
Gracilaria birdiae	BRA17	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56872	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W
Gracilaria birdiae	BRA18	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56871	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W
Gracilaria birdiae	BRA21	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57136	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W
Gracilaria birdiae	BRA22	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57134	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W
Gracilaria birdiae	BRA23	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57132	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W
Gracilaria caudata	BRA66	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57181	$5^0$05'00.73"S, $36^0$26'01.50"W
Gracilaria caudata	BRA72	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57187	$5^0$05'00.73"S, $36^0$26'01.50"W
Gracilaria caudata	BRA74	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57189	$7^0$15'12.60"S, $34^0$50'31.54"W
Gracilaria caudata	BRA83	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57286	$27^0$26'00.74"S, $48^0$31'10.34"W
Gracilaria caudata	BRA96	20.05.12	M.C. Oliveira	Praia da Cruz, Marataízes, ES	57338	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W
Gracilaria caudata	BRA98	17.05.12	M.C. Oliveira	Praia da Cruz, Marataízes, ES	57340	$20^0$08'63.0"S, $40^0$17'31.77"W
Gracilaria caudata	BRA101	06.05.12	M.C. Oliveira	Enseada azul, Meaípe, ES	57343	20^0 31'14.8"S, $40^0$24'41.7"W
Gracilaria caudata	BRA104	21.05.12	C. Iha	Itapemirim, ES	57346	$20^0$55'19.26"S, $40^0$42'13.11"W
Gracilaria caudata	BRA106	12.04.10	E.Soriano-Marinho	Rio do Fogo, RN	-	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W
Gracilaria caudata	BRA107	06.02.11	D. Barata	Boa Viagem, PE	-	$8^0$07'32.78"S, $34^0$54'58.53"W
Gracilaria caudata	BRA108	06.05.12	E.Plastino/L.Ayres	Paraty, ES	-	$23^0$12'58.69"S, $44^0$42'55.03"W
Gracilaria caudata	BRA109	21.05.12	E.Plastino/L.Ayres	Paraty, ES	-	$23^0$12'58.69"S, $44^0$42'55.03"W
Gracilaria caudata	BRA109	06.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Paraty, ES	-	$23^0$12'58.69"S, $44^0$42'55.03"W
Gracilaria caudata	BRA110	13.10.08	E.Oliveira	Praia Vermelha do Sul, Ubatuba, SP	-	$23^0$30'35.52"S, $45^0$10'24.56"W
Gracilaria caudata	BRA111	13.10.08	E.Oliveira	Ponta de Fortaleza, Ubatuba, SP	56864	$23^0$30'35.52"S, $45^0$10'24.56"W
Gracilaria caudata	BRA112	12.04.10	E.Soriano-Marinho	Rio do Fogo, RN	-	$5^0$05'00.73"S, $36^0$23'22.30"W

Tabela 7. Continuação

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude
Gracilaria caudata	BRA113	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta da Fortaleza, Ubatuba,SP	56863	23^{0}52’95.91”S, 45^{0}10’15.79”W
Gracilaria caudata	BRA114	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56858	23^{0}52’95.91”S, 45^{0}10’15.79”W
Gracilaria caudata	BRA118	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56867	23^{0}47’42.37”S, 45^{0}30’48.36”W
Gracilaria caudata	BRA119	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56856	23^{0}47’42.37”S, 45^{0}30’48.36”W
Gracilaria caudata	BRA120	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia da Lagoinha, Ubatuba, SP	56866	23^{0}31’34.35”S, 45^{0}11’48.84”W
Gracilaria caudata	BRA121	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia do Perez, Ubatuba, SP	56869	23^{0}25’06.37”S, 45^{0}03’45.84”W
Gracilaria caudata	BRA122	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56860	23^{0}52’95.91”S, 45^{0}10’15.79”W
Gracilaria caudata	BRA128	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	57016	23^{0}47’42.37”S, 45^{0}30’48.36”W
Gracilaria caudata	BRA130	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	57018	23^{0}47’42.37”S, 45^{0}30’48.36”W
Gracilaria caudata	BRA135	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	-	23^{0}37’22.90”S, 45^{0}24’53.23”W
Gracilaria cearensis	BRA71	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57186	5^{0}51’57.04”S, 35^{0}10’42.43”W
Gracilaria cervicornis	BRA16	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56873	5^{0}05’00.73”S, 36^{0}23’22.30”W
Gracilaria cervicornis	BRA34	09.11.10	E.Costa	Cabo Branco, João Pessoa, PB	57166	7^{0}07’37.58”S, 34^{0}50’31.54”W
Gracilaria cervicornis	BRA78	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57180	5^{0}51’57.04”S, 35^{0}10’42.43”W
Gracilaria cornea	BRA89	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia da Pedra Rachada, Paracurú, CE	57313	3^{0}24’30.12”S, 39^{0}02’03.37”W
Gracilaria cornea	BRA90	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia da Pedra Rachada, Paracurú, CE	57314	3^{0}24’30.12”S, 39^{0}02’03.37”W
Gracilaria cornea	BRA91	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia da Pedra Rachada, Paracurú, CE	57315	3^{0}24’30.12”S, 39^{0}02’03.37”W
Gracilaria cornea	BRA92	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia da Pedra Rachada, Paracurú, CE	57316	3^{0}24’30.12”S, 39^{0}02’03.37”W
Gracilaria cornea	BRA93	11.02.12	E.Plastino/L.Ayres	Praia da Pedra Rachada, Paracurú, CE	57316	3^{0}24’30.12”S, 39^{0}02’03.37”W
Gracilaria cuneata	BRA28	09.11.10	E.Costa	Cabo Branco, João Pessoa, PB	57137	7^{0}07’37.58”S, 34^{0}50’31.54”W
Gracilaria cuneata	BRA76	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57191	5^{0}56’54.32”S, 35^{0}31’18.55”W

Tabela 7. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude
Gracilaria curtissiae	BRA68	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57183	$5^0$51’57.04”S, $35^0$10’42.43”W
Gracilaria damecornis	BRA63	06.05.11	E.Oliveira	Casa da Barra, SC	57178	$28^0$27’54.73”S, $48^0$16’28.63”W
Gracilaria damaecornis	BRA79	21.05.11	E.Oliveira	Canal da Barra, Florianópolis, SC	57282	$26^0$15’01.49”S, $48^0$45’01.26”W
Gracilaria damaecornis	BRA82	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57285	$27^0$26’00.74”S, $48^0$31’10.34”W
Gracilaria domingensis	BRA26	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57168	$7^0$15’12.60”S, $34^0$50’31.54”W
Gracilaria domingensis	BRA116	16.10.08	E.Oliveira	Praia do Costa, Ubatuba, SP	56868	!$3^0$77’55.81”S, $45^0$23’35.14”W
Gracilaria domingensis	BRA118	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56867	$23^0$47’42.37”S, $45^0$30’48.36”W
Gracilaria domingensis	BRA124	17.03.10	M.Oliveira/E.Costa	Praia de Picinguaba, Ubatuba, SP	-	$23^0$38’00.32”S, $44^0$84’07.32”W
Gracilaria domingensis	BRA127	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	57015	$23^0$47’42.37”S, $45^0$30’48.36”W
Gracilaria domingensis	BRA134	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57022	$23^0$37’22.90”S, $45^0$24’53.23”W
Gracilaria flabelliformis	BRA73	20.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Diogo Lopes, RN	57188	$5^0$05’00.73”S, $36^0$26’01.50”W
Gracilaria isabellana	BRA77	06.05.11	E.Oliveira	Canasvieiras, SC	57192	$27^0$26’24.40”S, $48^0$28’23.55”W
Gracilaria isabellana	BRA81	06.02.11	E.Oliveira	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57284	$27^0$26’00.74”S, $48^0$31’10.34”W
Gracilaria isabellana	BRA85		E.Oliveira	Torres, RS	57289	$29^0$20’17.41”S, $49^0$43’01.40”W
Gracilaria isabellana	BRA88		P. Horta	Torres, RS	57306	$29^0$20’17.41”S, $49^0$43’01.40”W
Gracilaria isabellana	BRA117	08.05.09	M.Oliveira	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	56862	$23^0$47’42.37”S, $45^0$30’48.36”W
Gracilaria isabellana	BRA123	16.11.09	E.Oliveira/F.Nauer	Praia do Perez, Ubatuba, SP	56859	$23^0$25’06.37”S, $45^0$03’45.84”W
Gracilaria isabellana	BRA125	18.03.10	N.Guimarães	Praia Vermelha, Ubatuba, SP	57013	$23^0$30’35.52”S, $45^0$10’24.56”W
Gracilaria isabellana	BRA126	19.03.10	E.Costa	Praia Vermelha, Ubatuba, Sp	57014	$23^0$30’35.52”S, $45^0$10’24.56”W
Gracilaria isabellana	BRA131	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57019	$23^0$37’22.90”S, $45^0$24’53.23”W
Gracilaria isabellana	BRA132	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57020	$23^0$37’22.90”S, $45^0$24’53.23”W

Tabela 7. Continuação.

Espécie	Nº de Campo	Data da Coleta	Coletor	Local	SPF	Latitude /Longitude
Gracilaria isabellana	BRA133	19.03.10	S.Guimarães	Martim Sá, Caraguatatuba, SP	57021	23^{0}37’22.90”S, 45^{0}24’53.23”W
Gracilaria smithsoniensis	BRA99	17.05.11	F. Nauer	Castelhanos, ES	57341	20^{0}46’01.34”S, 40^{0}42’27.75”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA15	03.12.09	E.Plastino	Rio do Fogo, RN	56876	5^{0}05’00.73”S, 36^{0}23’22.30”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA24	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57120	7^{0}15’12.60”S, 34^{0}50’31.54”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA25	08.11.10	G.Miranda/E.Costa	Praia de Carapibús, Conde, PB	57131	7^{0}15’12.60”S, 34^{0}50’31.54”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA64	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57179	5^{0}56’54.32”S, 35^{0}31’18.55”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA67	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57182	5^{0}51’57.04”S, 35^{0}10’42.43”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA75	17.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Ponta Negra, RN	57190	7^{0}15’12.60”S, 34^{0}50’31.54”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA84	06.02.11	E.Oliveira/M.Batista	Praia do Forte, Florianópolis, SC	57287	27^{0}26’00.74”S, 48^{0}31’10.34”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA86		E.Oliveira	Ponta das Canas, Florianópolis, SC	57304	27^{0}23’42.01”S, 48^{0}25’25.21”W
Gracilaria yoneshigueana	BRA87		E.Oliveira	Ponta das Canas, Florianópolis, SC	57305	27^{0}23’42.01”S, 48^{0}25’25.21”W
Gracilariopsis silvana	BRA70	18.05.11	E.Oliveira/M.Oliveira	Pirangi, RN	57185	5^{0}56’54.32”S, 35^{0}31’18.55”W
Gracilariopsis silvana	BRA102	21.05.11	F. Nauer	Castelhanos, ES	57345	20^{0}46’01.34”S, 40^{0}42’27.75”W
Gracilariopsis tenuifrons	BRA115	15.10.08	E.Oliveira/M.Oliveira	Praia da Fortaleza, Ubatuba, SP	56870	23^{0}52’95.91”S, 45^{0}10’15.79”W
Gracilariopsis tenuifrons	BRA129	19.03.10	S.Guimarães	Praia das Cigarras, São Sebastião, SP	57017	23^{0}47’42.37”S, 45^{0}30’48.36”W

Tabela 8. Caracteres morfológicos utilizados na caracterização das espécies de Gracilariaceae.

Caracteres morfológicos
Altura do talo
Diâmetro do talo (região próxima ao ápice)
Forma do talo (achatado, foliáceo e cilíndrico)
Padrão de ramificação (dicotômica, politômica, alterna, irregular)
Margens do talo (lisa, ondulada ou crispada)
Padrão medular (gradual ou microcistidiado e abrupta ou macrocistidiado)
Número de camadas corticais
Anatomia do cistocarpo (com constrição na base ou sem constrição na base)
Células nutritivas tubulares (presente ou ausente)
Distribuição dos espermatângios (chorda, textorii, verrucosa e henriquesiana)
Tetrasporângio (cruciado, decussado)

Resultados

Gracilaria Greville 1830

Espécie Tipo: *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville

Gracilaria birdiae Plastino & E.C.Oliveira

Localidade tipo: Praia de Guajiru, Ceará

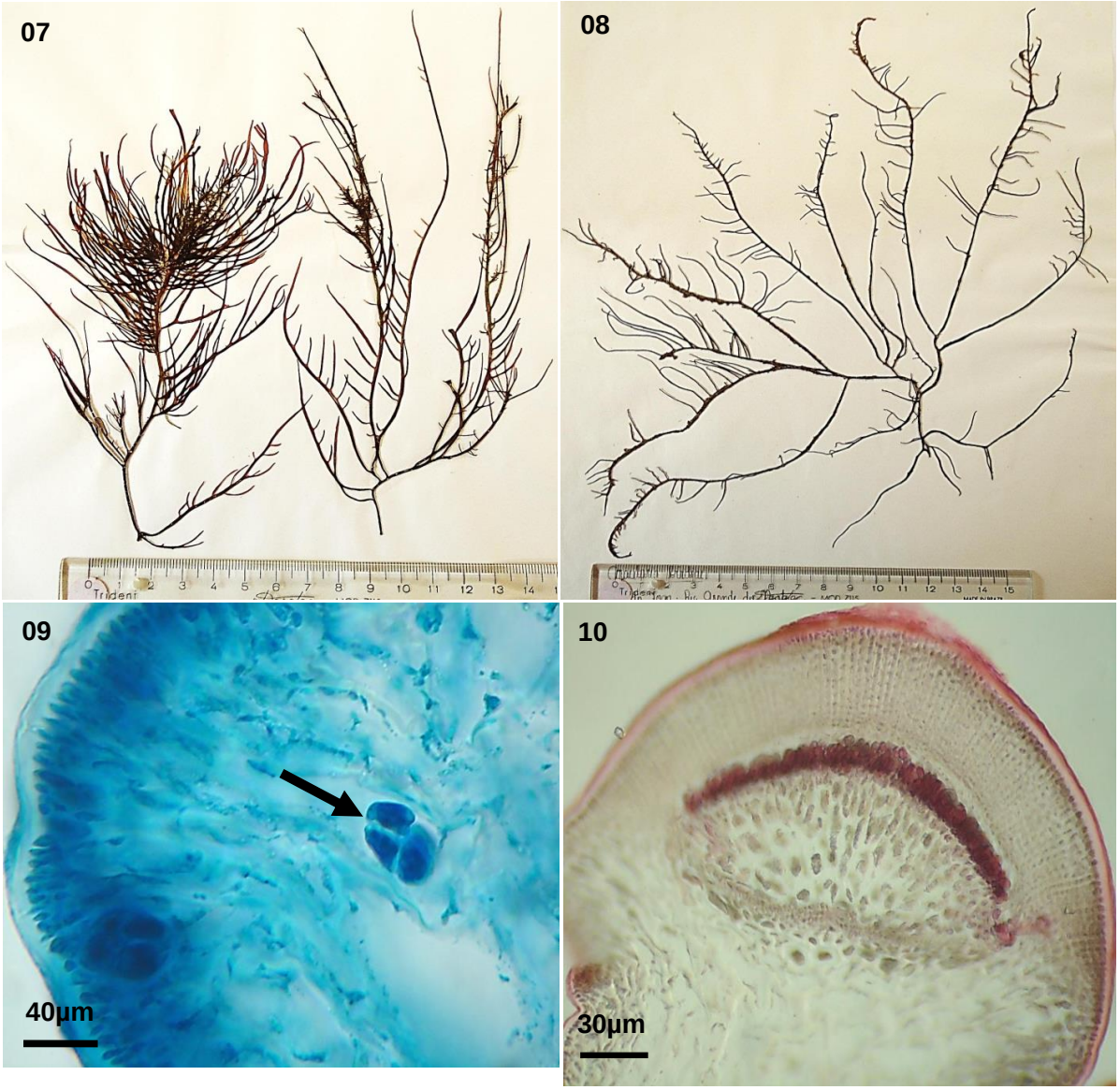
Distribuição no litoral brasileiro: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Espírito Santo.

Figuras: 07-10

Talo completamente cilíndrico de aspecto carnoso, cor rosada a vermelha predominante chegando a medir 25 cm de altura, com algumas ramificações irregulares, tendência à dística com ápices arredondados, padrão medular microcistidiado com uma medula heterogênea. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria birdiae* encontra-se em Plastino & Oliveira (2002), assim como dados de alguns aspectos fisiológicos e ultraestruturais.

Comentário: *Gracilaria birdiae* apresenta semelhanças tanto morfológica quanto anatomicamente com *G. caudata* e *G. cornea*, além de serem espécies proximamente relacionadas segundo dados moleculares (Bellorin 2002), de modo que os limites que separam essas três espécies torna-se bastante complicado. Dessa forma o reconhecimento de *G. birdiae* como espécie diferente das demais foi possível a partir de testes de hibridização, possibilitando considerá-la uma espécie reprodutivamente isolada (Plastino & Oliveira 2002), embora com morfologia intermediária entre *G. caudata* e *G. cornea*. A utilização de marcadores moleculares do tipo DNA “barcode” (Capítulos 2 e 3) possibilitou a separação dessas três espécies.

Material examinado: Rio do Fogo (RN) **Plastino, E.M**. SPF 5787, SPF 57872; Conde (PB) **Costa, E.S. & Miranda**, G.E. SPF 57134; Marataízes (ES) **Oliveira, M.C**. SPF 57338, SPF 57340; Itapemirim (ES) **Iha, C**. SPF 57346; Meaípe (ES) **Oliveira, M.C**. SPF 57342.



Figuras 07-10: *Gracilaria birdiae*. Figuras 07 e 08. Aspecto Geral do talo bastante ramificado. Figura 09. Corte transversal da região mediana do talo mostrando detalhe de um tetrasporângio deslocado do córtex (seta). Figura 10. Detalhe do cistocarpo em corte transversal de um ramo fértil.

Gracilaria caudata J. Agardh

Localidade Tipo: Golfo do México

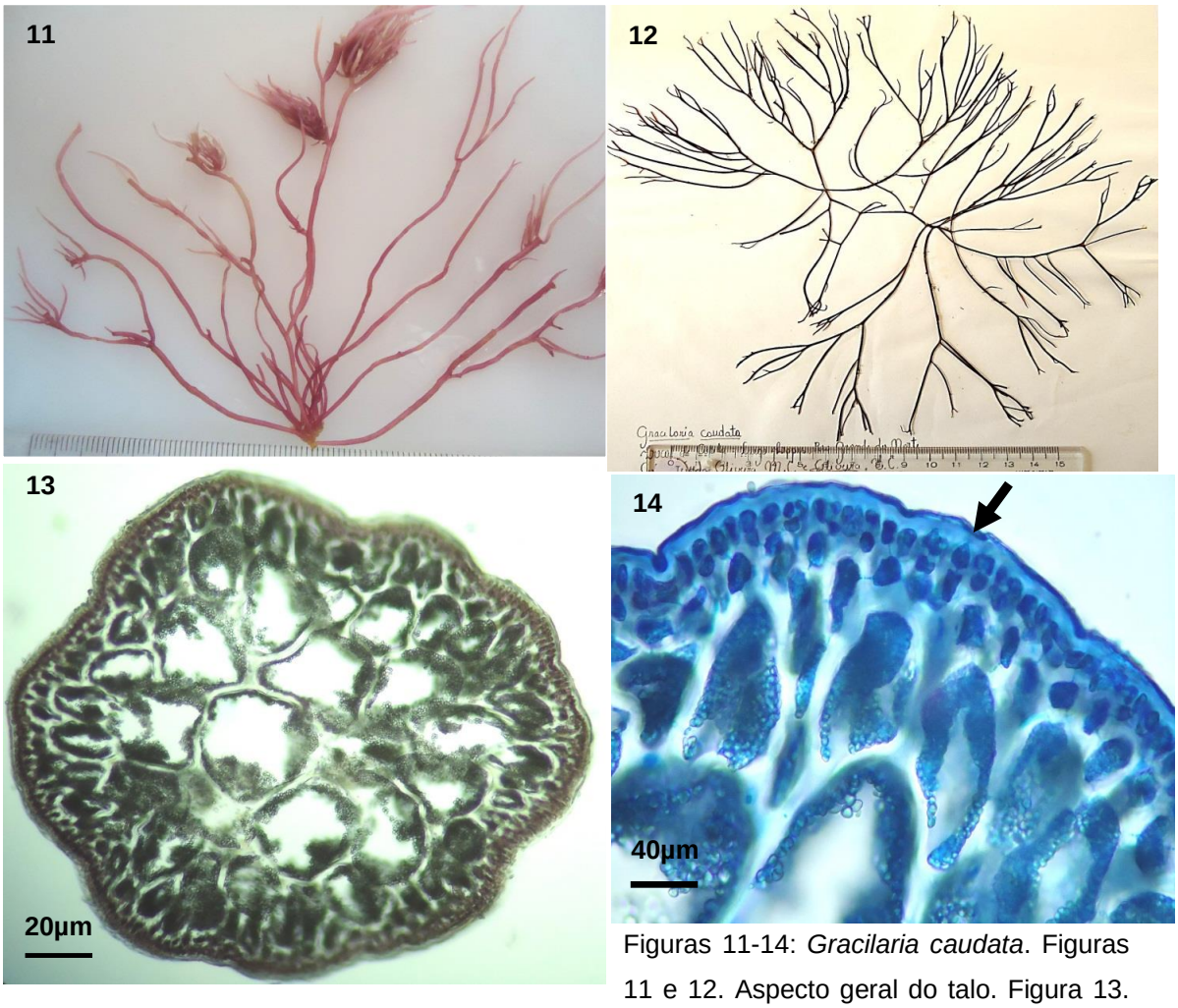
Distribuição no litoral brasileiro: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

Figuras: 11-14

Talo completamente cilíndrico, com algumas ramificações irregulares, chegando a medir 28 cm de altura e 2 mm de espessura; padrão medular microscistidiado com medula heterogênea. A descrição morfológica detalhada e anatomia reprodutiva de *Gracilaria caudata* encontram-se bem caracterizadas em (Bellorin 2002), além do processo de formação do aparelho masculino e do cistocarpo.

Comentário: *Gracilaria caudata* é uma das espécies exploradas como agarófita na região Nordeste. Apresenta grande semelhança com *G. birdiae*, sendo as duas espécies morfológica e molecularmente muito próximas. Dados moleculares que obtivemos (Capítulos 2 e 3) com os marcadores moleculares *cox*1 e UPA permitem a separação dessas duas espécies.

Material examinado: Trairi (CE) **Oliveira, E.C**. SPF 55510, SPF 55511, SPF 55512; Fortaleza (CE) **Plastino, E.M**. SPF 55029, SPF 55813; Diego Lopes (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 57181, SPF 57187, SPF 57189; São Sebastião (SP) **Oliveira, E.C**. SPF 57017, SPF 57018, SPF 56865; Ubatuba (SP) **Oliveira, E.C**. SPF 52029, SPF 56858, SPF 56860, SPF 56863, SPF 56864, SPF 56866; Florianópolis (SC) **Oliveira, E.C.** SPF 57286.



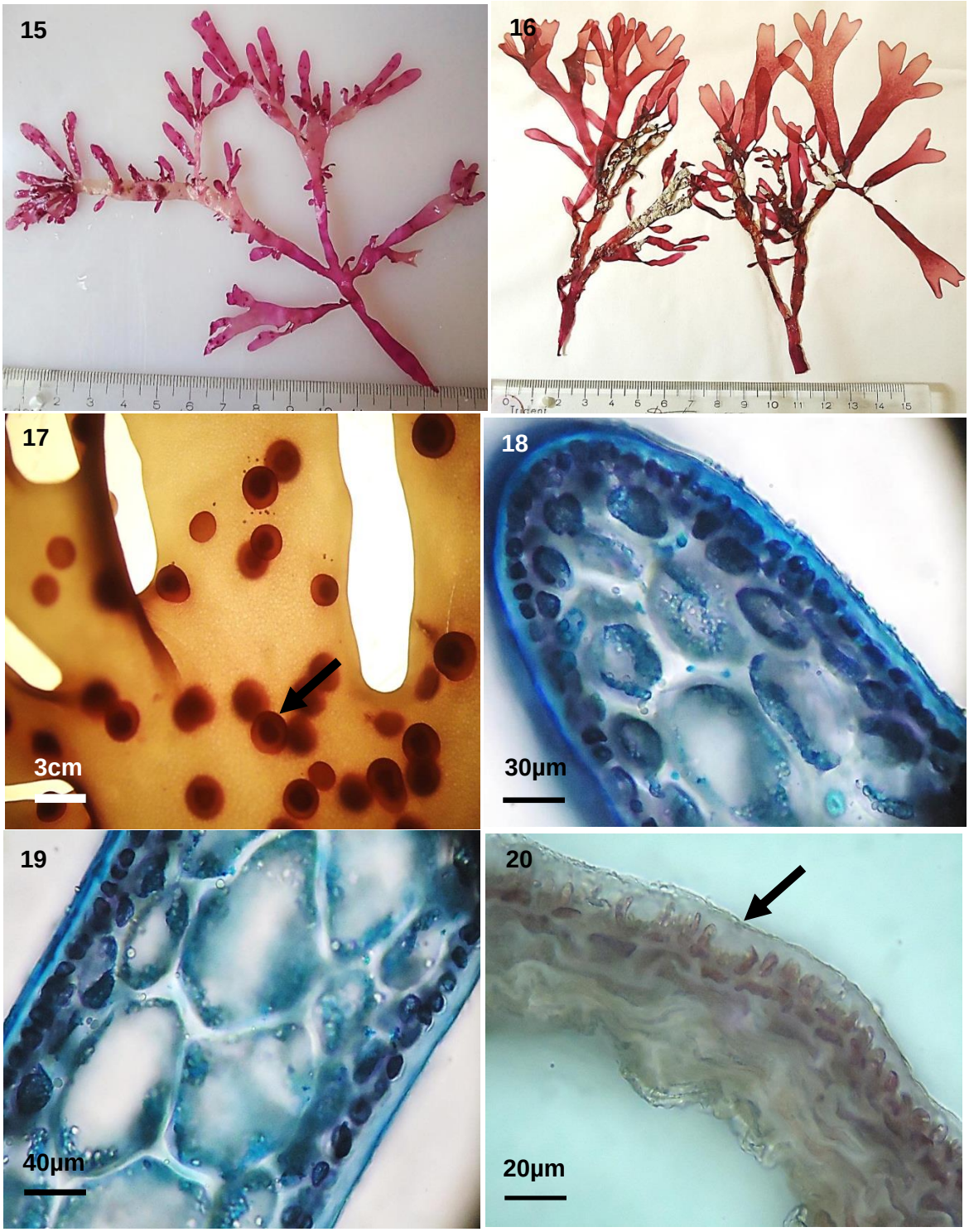
Figuras 11-14: *Gracilaria caudata*. Figuras 11 e 12. Aspecto geral do talo. Figura 13. Corte transversal mostrando as células do córtex e da medula. Figura 14. Detalhe da região do córtex com célula de pelo (seta) e células da medula apresentando bastante amido.

Gracilaria cearensis (A.B. Joly & Pinheiro) A.B. Joly & Pinheiro
Localidade Tipo: Ceará
Distribuição no litoral brasileiro: Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia.
Figuras: 15-20

Talo completamente achatado, de cor rosada medindo 15 cm de altura, bastante ramificado com ápices arredondados, com bordas lisas de onde partem pequenas ramificações, espessura do talo 137 µm e largura de 3 mm, padrão medular macrocistidiado, célula da medula medindo 45 µm de altura e 57 µm de largura, células medulares alongadas. Córtex formado por 2-3 camadas de células. Planta feminina com cistocarpos espalhados por todo o talo. Conceptáculos espermatangiais tipo “textorii”.

Comentário: *Gracilaria cearensis* é o nome taxonomicamente aceito. A espécie foi originalmente descrita como *Tylotus cearensis* (A.B. Joly & Pinheiros 1965). Esta espécie apresenta características de sua morfologia externa muito semelhante ao material identificado como *Gracilaria smithsoniensis*, podendo ser confundida em campo.

Material examinado: Ponta Negra (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C.** SPF 57186.



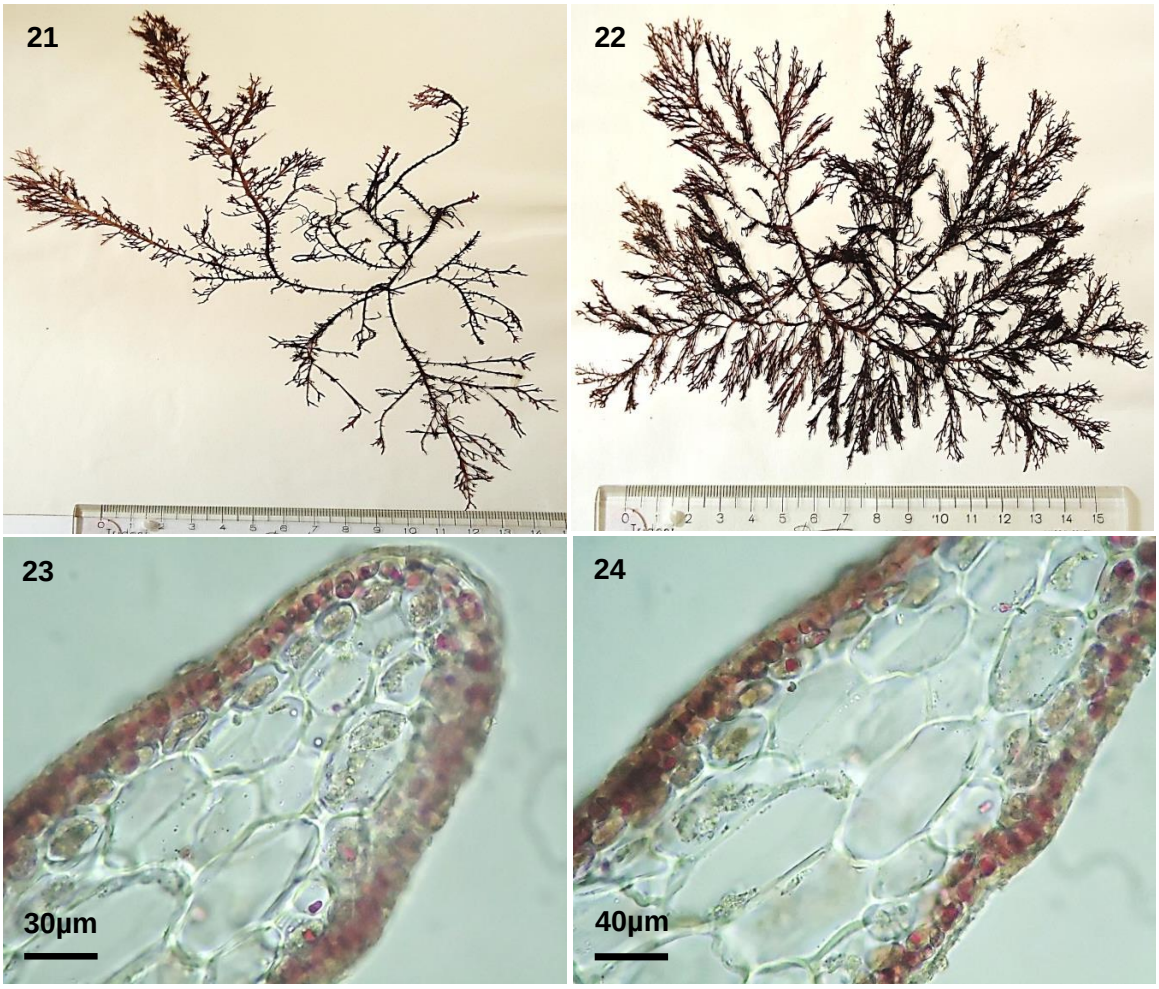
Figuras 15-20: *Gracilaria cearensis*: Figuras 15 e 16: Aspecto geral do talo. Figura 17. Detalhe do cistocarpo (seta). Figura 18. Corte transversal próximo ao ápice, mostrando as células do córtex e da medula. Figura 19. Corte da região mediana do talo. Figura 20. Conceptáculos espermatangiais em criptas rasas tipo “textorii”.

Gracilaria cervicornis (Turner) J. Agardh
Localidade Tipo: Jamaica
Distribuição no litoral brasileiro: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.
Figuras: 21-24

A descrição morfológica detalhada e anatomia reprodutiva de *Gracilaria cervicornis* encontra-se em Oliveira et al. (1983) e Plastino (1985). A ontogenia do aparelho reprodutor masculino e a formação do cistocarpo podem ser encontradas em Fredericq & Norris (1985).

Comentário: *Gracilaria cervicornis* é uma espécie comum na costa brasileira, podendo ser muitas vezes confundida com *G. domingensis* em virtude da sua morfologia externa, no entanto o modo de distribuição dos espermatângios presentes em *G. cervicornis* é tipo “textorii” enquanto que em *G. domingensis* é tipo “verrucosa”. Oliveira et al. (1983) discutiram as relações entre *G. cervicornis* e *G. ferox* J. Agardh, esta referida como sinônimo da primeira.

Material examinado: Rio do Fogo (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 56873, SPF 57180; São Sebastião (SP) **Oliveira, M.C.** SPF 56867.



Figuras 21-24: *Gracilaria cervicornis*. Figura 21 e 22. Aspecto geral do talo. Figura 23. Corte transversal da região próxima ao ápice. Figura 24. Corte transversal da região mediana do talo, mostrando as células do córtex e da medula.

Gracilaria cornea J. Agardh

Localidade Tipo: Pernambuco

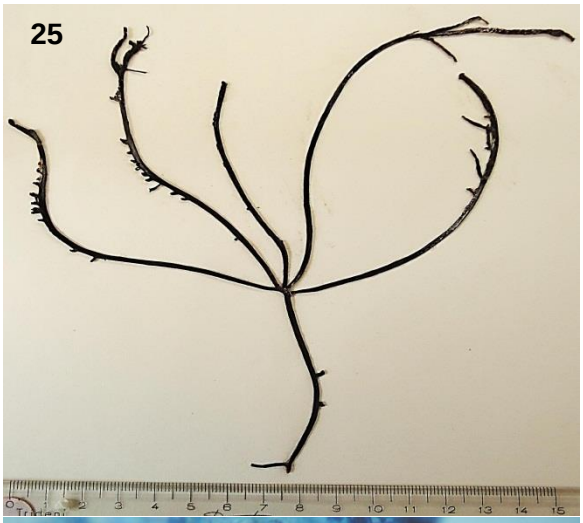
Distribuição no litoral brasileiro: Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro.

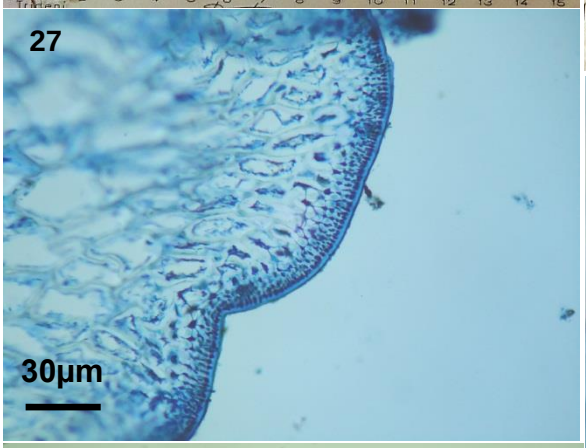
Figuras: 25-29

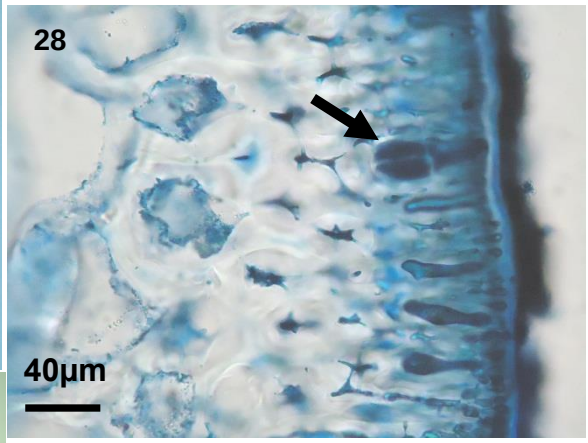
Apresenta talo cilíndrico espesso, de consistência carnosa, com um padrão microcistidiado, formado por uma medula heterogênea composta por várias camadas bastante evidente, medindo 13 cm de altura e diâmetro do talo de 3 mm, ramificação dicotômica, ramos laterais presentes nas margens das ramificações, células da medula com 226 µm. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria cornea* encontra-se em Bird et al. (1986b) e o estudo da formação do aparelho masculino, o processo de pós-fecundação e a ontogenia do cistocarpo encontram-se em Fredericq & Norris (1985).

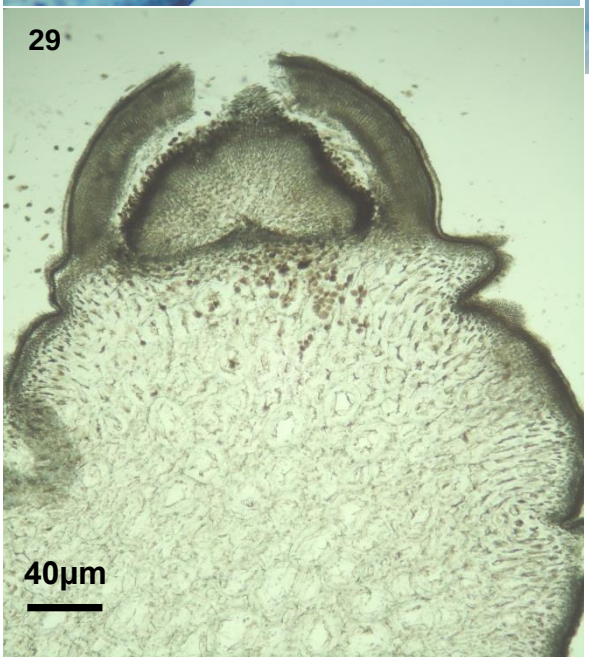
Comentário: *Gracilaria cornea* apresenta o talo mais rígido e espesso das algas gracilarióides cilíndricas, no entanto em alguns casos pode ser confundida com as demais espécies cilíndricas. Devido à grande plasticidade fenotípica presente pode apresentar talos parcialmente achatados. Bellorin (2002) considera *G. cornea* e *G. crassissima* espécies proximamente relacionadas, apresentando as mesmas características na anatomia reprodutiva. No entanto, segundo Bird et al. (1986b) o reconhecimento de *G. cornea* é dado pelo seu habito comprimido e decumbente e pela anastomose dos seus ramos.

Material examinado: Paracuru (CE) **Plastino, E.M. & Ayres, L**. SPF 57313, SPF 57314, SPF 57315, SPF 57316; Traíri (CE) **Plastino, E.M**. SPF 55662; Conde (PB) **Costa, E.C. & Miranda, G.E.** SPF 57132, SPF 57136, SPF 57165.









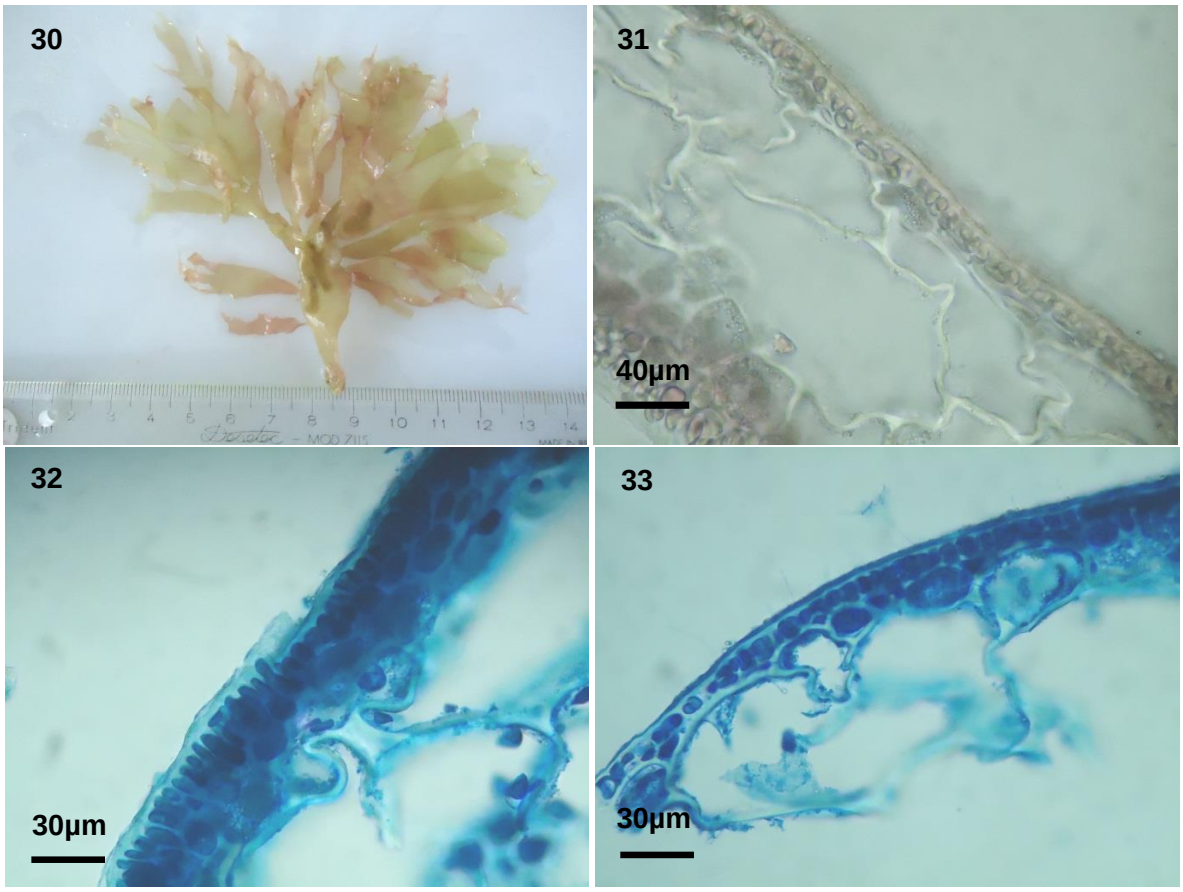
Figuras 25-29: *Gracilaria cornea*. Figuras 25 e 26. Aspecto geral do talo. Figura 27. Corte transversal da região mediana do talo. Figura 28. Detalhe da região cortical mostrando tetrasporângio (seta). Figura 29. Corte transversal do cistocarpo.

Gracilaria cuneata Areschoug
Localidade Tipo: Pernambuco
Distribuição no litoral brasileiro: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Espírito Santo.
Figuras: 30-33

Apresenta talo foliáceo com textura coriácea; os espécimes que coletamos não passaram de 5 cm de altura e 8 mm de largura, diferindo de outros exemplares descritos na literatura que costumam apresentar-se bem maiores; de coloração vermelho alaranjado. A transição da medula para o córtex se dá de forma macrocistidiada com até seis camadas de células, as quais apresentam abundantes grãos de amido e ao longo do talo apresentando pelos hialinos, os quais são frequentes entre as células corticais. As características diagnósticas e relações taxonômicas de *Gracilaria cuneata* encontram-se descritas detalhadamente em Bellorin (2002).

Comentário: Segundo Bellorin (2002), os materiais de *G. cuneata* analisados mostraram que *G. cearensis* pode ser considerada como sinômino de *G. cuneata*, no entanto no presente trabalho com base em dados moleculares (Capítulo 3) esses materiais se mostraram espécies distintas. Outra confusão apontada por Bellorin (2002), frequente nas coleções de herbário, é entre *G. cuneata* e *G. curtissiae*.

Material examinado: Cabo Branco (PB) **Costa, E.S.** SPF 57166; Pirangi (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C.** SPF 57191.



Figuras 30-33: *Gracilaria cuneata.* Figura 30. Aspecto geral do talo. Figura 31. Corte transversal da região mediana do talo. Figuras 32 e 33. Detalhe da região cortical do talo.

Gracilaria curtissiae J. Agardh

Localidade Tipo: Flórida

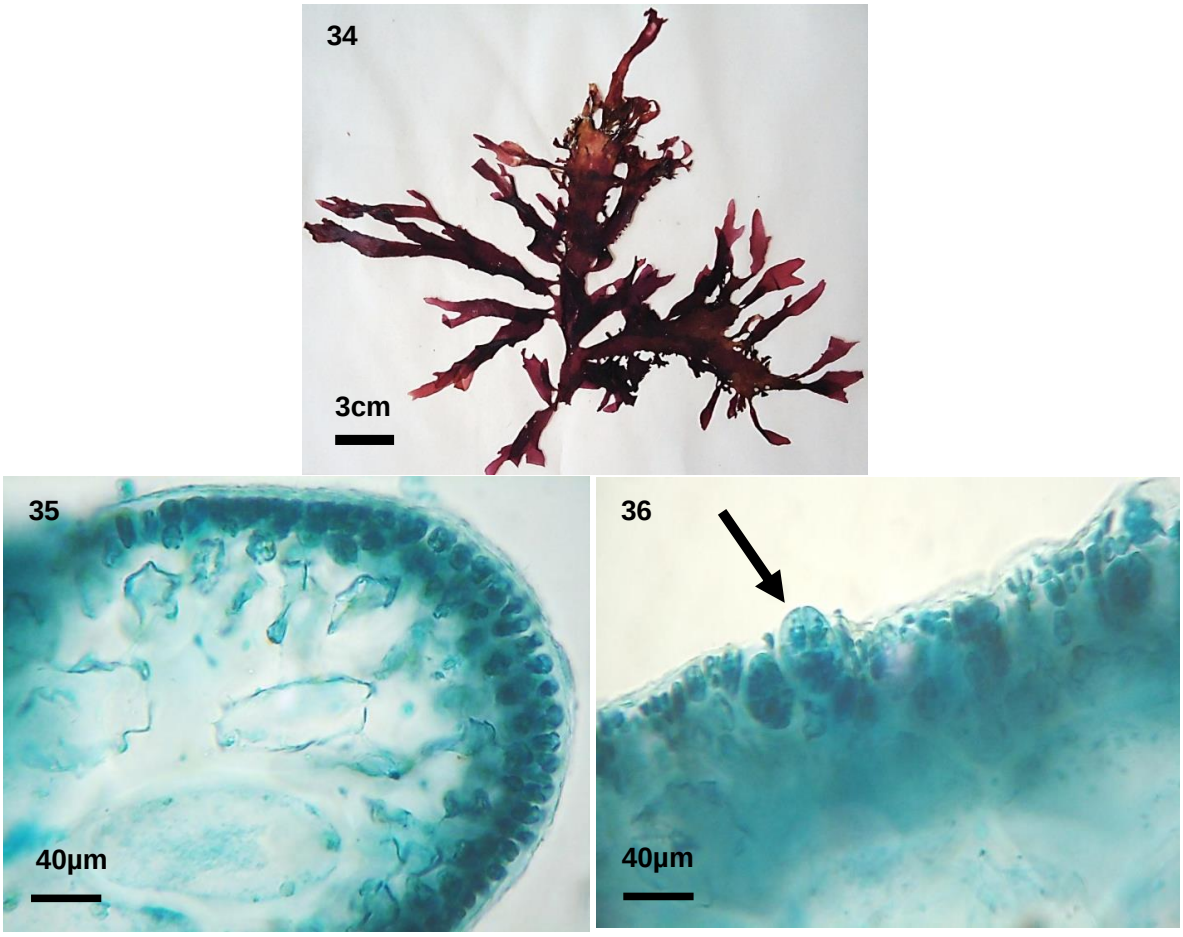
Distribuição no litoral Brasileiro: Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Espírito Santo.

Figuras: 34-36

Alga com talo completamente achatado, apresentando constrições na base das ramificações, com cerca de 6 cm de altura. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva e ontogenia do aparelho masculino de *Gracilaria curtissiae* encontram-se bem caracterizadas em Bellorin (2002).

Comentário: *Gracilaria curtissiae* é uma espécie bastante frequente no litoral nordestino extendendo-se até o estado do Espírito Santo. Segundo Bellorin (2002) alguns espécimes podem ser confundidos com *G. mammillaris* e outras espécies assemelhadas, no entanto *G. curtissiae* apresenta-se em forma de fita com margens crispadas e onduladas, além de constrições na base das ramificações e proliferações laterais cuneiformes, caracteres esses que contribuem para a sua distinção.

Material examinado: Ponta Negra (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C.** SPF 57183; João Pessoa (PB) **Costa, E.S**. SPF 57137.



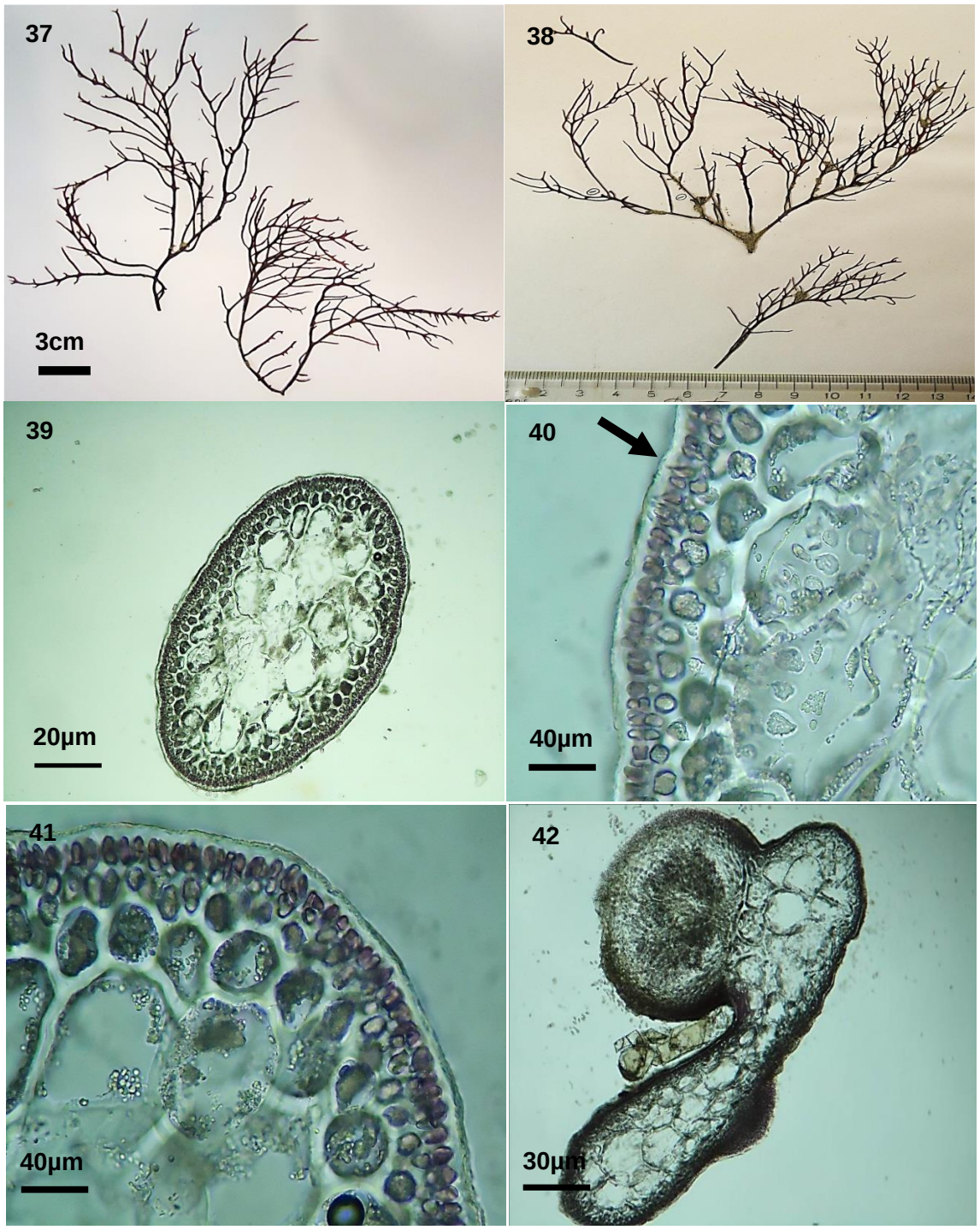
Figuras 34-36: *Gracilaria curtissiae*. Figura 34. Aspecto geral do talo. Figura 35. Corte transversal próximo a região apical. Figura 36. Detalhe da região cortical mostrando tetrasporângio (seta).

Gracilaria damaecornis J. Agardh
Localidade Tipo: Mar do Caribe
Distribuição no litoral brasileiro: Bahia e Santa Catarina.
Figuras: 37-42

Apresentando talo comprimido a achatado medindo de 6 a 9 cm de altura, bastante ramificado, com padrão medular macrocistidiado ao longo do talo percebe-se a presença de curtas ramificações semelhantes à chifres; córtex apresentando duas camadas enquanto a medula apresentou 4-5 camadas com 8-19 µm de altura e 14-26 µm de diâmetro. Plantas femininas com cistocarpos apresentando constrição na base. Não foram encontrados espécimes masculinos.

Comentário: *Gracilaria damaecornis* é uma espécie subcilíndrica descrita por Agardh (1852), para o Caribe. Esta espécie foi estudada por Ganesan (1993) concluindo que entre *G. damecornis* e *G. albornozii* não havia diferenças significativas o que levou à sua sinonímia aceita por Wynne (1998). Posteriormente Bellorin (2002) comparou o material da Venezuela tratado por Ganesan (1993) como *G. damaecornis* com *G. caudata*, não encontrando diferenças significativas nos dados morfoanatômicos e moleculares, aplicando o nome *G. caudata* para o material da Venezuela, mas não propondo a sinonímia. O material descrito aqui como *G. damaecornis* se diferencia por dados morfoanatômicos e moleculares de *G. caudata*, sendo considerado portanto *G. damaecornis* referida pela primeira vez para o Brasil neste trabalho.

Material examinado: Florianópolis (SC) **Oliveira, E.C**. SPF 57177,SPF 57178, SPF 57282, SPF 57285.



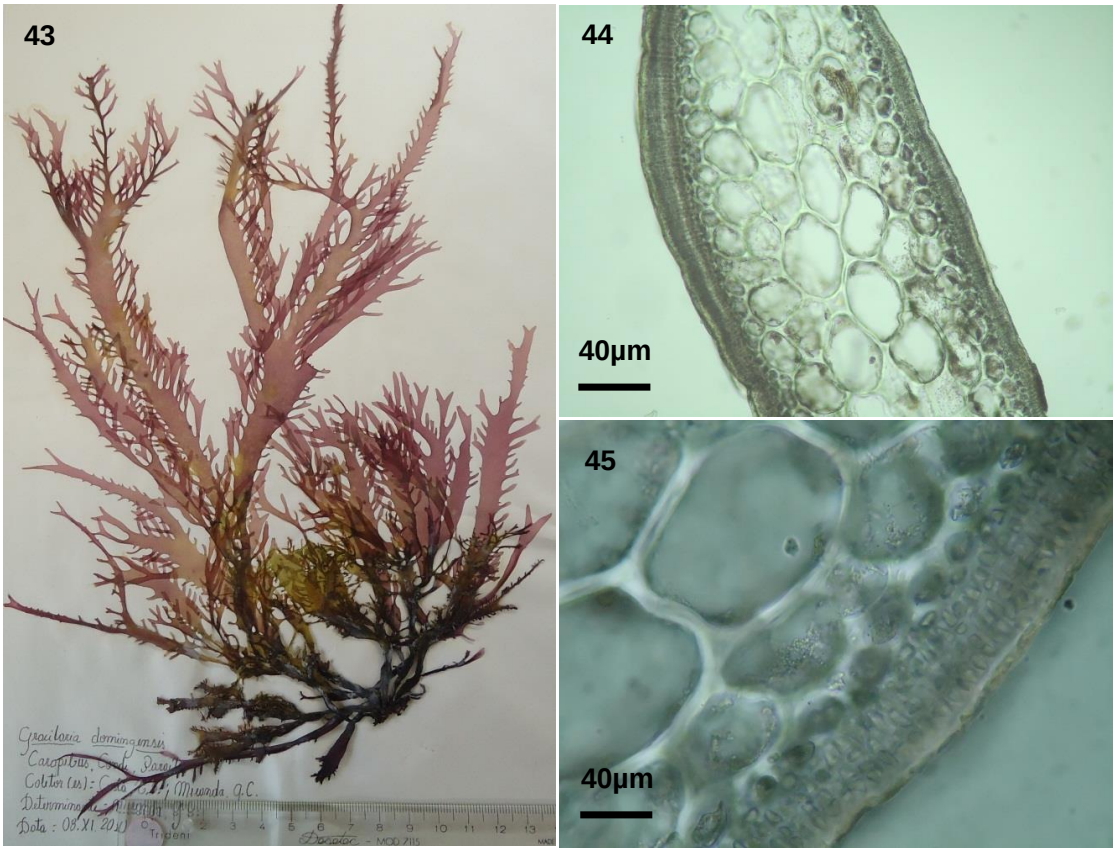
Figuras 37-42: *Gracilaria damaecornis*. Figuras 37 e 38. Aspecto geral do talo. Figura 39. Corte transversal próximo à região apical. Figuras 40 e 41. Detalhe da região cortical, célula basal de pelo (seta). Figura 42. Corte transversal do cistocarpo.

Gracilaria domingensis (Kützing) Sonder ex Dickie
Localidade Tipo: República Dominicana
Distribuição no litoral brasileiro: Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.
Figuras: 43-45

Apresenta talo com porções achatadas de aspecto carnoso com ramificações curtas saindo paralelamente ao longo do talo e porções cilíndricas, com ápices dicotômicos, chegando a medir 26 cm de altura e largura variando de 2-8 mm, de cor enegrecida à amarelada. Plantas femininas apresentando cistocarpos bastante proeminentes. Córtex apresentando de 2-3 camadas de células medindo de 7-10 µm de altura e 25-50 µm de largura, padrão medular macrocistidiado, com células medulares medindo 25-145 µm de altura por 12-87 µm de largura. Na transição da medula oberva-se 8-9 camadas de células. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria domingensis* encontra-se em Oliveira et al. (1983) e Guimarães et al. (1999). A descrição detalhada do aparelho reprodutor masculino e do cistocarpo encontra-se em Bellorin (2002).

Comentário: Seus espécimes apresentam uma grande variabilidade morfológica, além da presença de variantes cromáticas Plastino et al. (1999). Representante de espécies achatadas que apresentam espermatângios produzidos em conceptáculos profundos tipo “verrucosa”, o que as diferencia das espécies *G. cervicornis* e *G. yoneshigueana* que apresentam uma morfologia externa bastante semelhante.

Material examinado: Conde (PB) **Costa, E.S. & Miranda, G.E.** SPF 57168; Caraguatatuba (SP) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 57022; São Sebastião (SP) **Plastino, E.M.** SPF 26774; Ubatuba (SP) **Oliveira, E.C**. SPF 26055, SPF 56868.



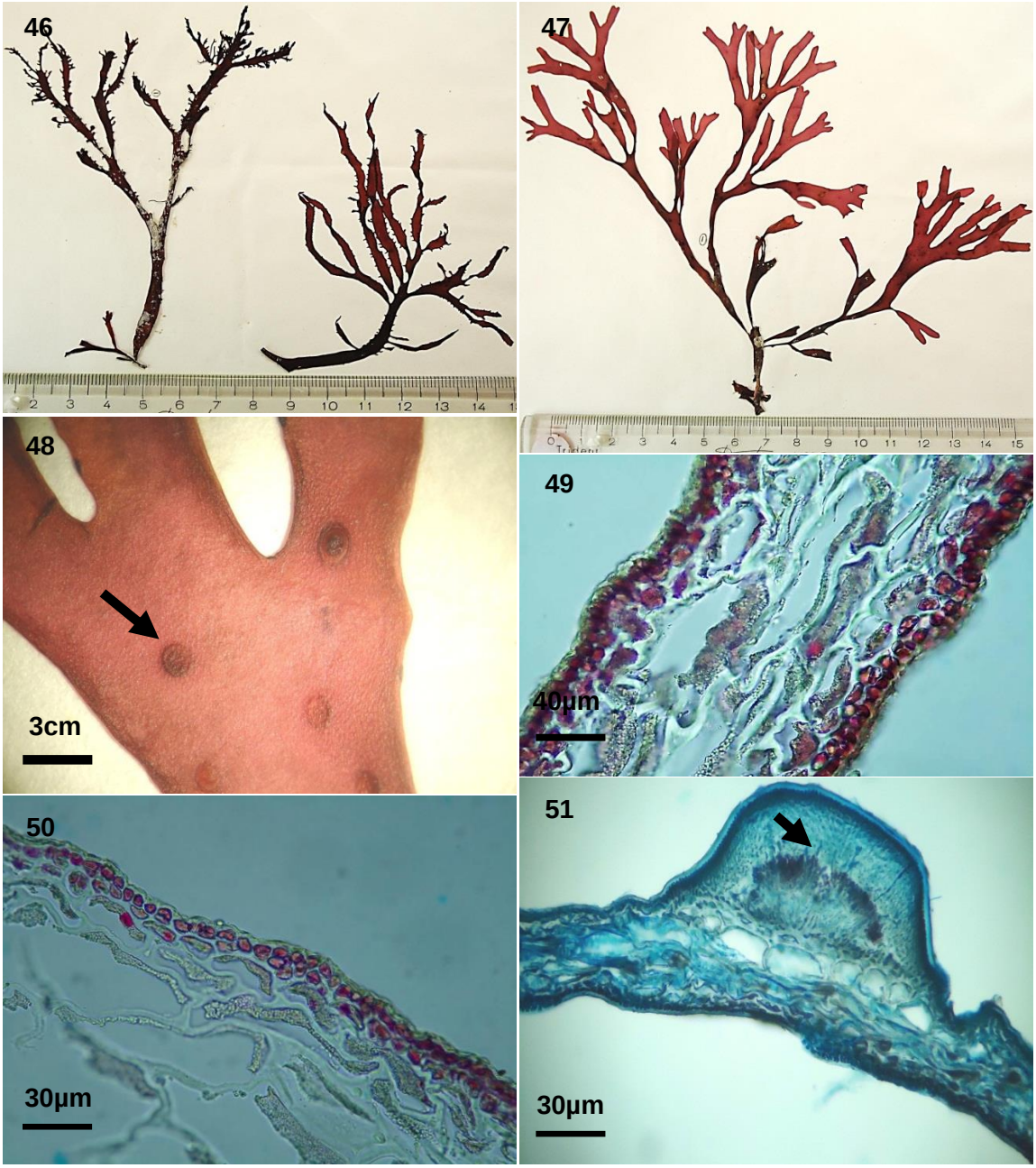
Figuras 43-45: *Gracilaria domingensis*. Figura 43. Aspecto geral do talo. Figura 44. Corte transversal próximo da região do ápice. Figura 45. Detalhe da região cortical.

Gracilaria flabelliformis (P.L. Crouan & H.M. Crouan) Fredericq & Gurgel
Localidade Tipo: Guadalupe, México
Distribuição no litoral brasileiro: Rio Grande do Norte e Bahia
Figuras: 46-51

Apresenta talo achatado com margens dotadas de proliferações filiformes com ramificações em um só plano, com constrição na base das ramificações medindo 10 cm de altura e largura de 1-4 mm. Padrão medular macrocistidiado, apresentando duas camadas de células no córtex e 4-5 camadas de células na medula, com grande quantidade de amido. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria flabelliformis* encontra-se em Gurgel et al. (2004a).

Comentário: *Gracilaria flabelliformis* é uma espécie pouco estudada no Brasil e apenas descrita com base em dados morfológicos (Nunes 2005). Com base em dados moleculares (Capítulo 3) encontramos diferenças que permitem a caracterização molecular dessa espécie.

Material examinado: Diego Lopes (RN) Oliveira, **E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 57188, Pirangi (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 57193.



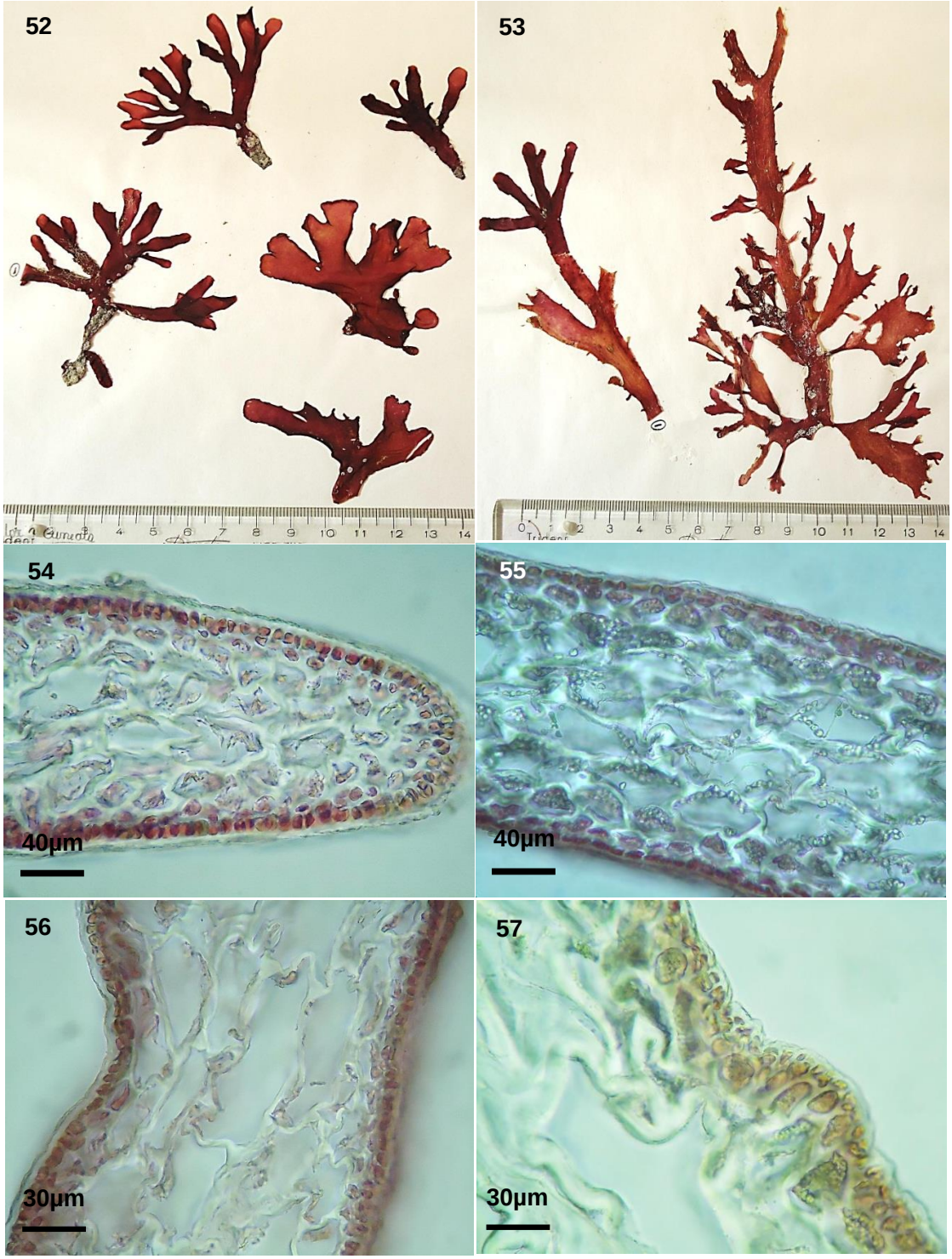
Figuras 46-51: *Gracilaria flabelliformis*. Figuras 46 e 47. Aspecto geral do talo. Figura 48. Detalhe do talo mostrando o cistocarpo (seta). Figuras 49 e 50. Corte transversal da região mediana do talo, mostrando as células do córtex e medula. Figura 51. Corte transversal do cistocarpo, mostrando os filamentos nutritivos tubulares (seta).

Gracilaria hayi Gurgel, Fredericq & J.N. Norris
Localidade Tipo: Ponto Galeta, República do Panamá
Distribuição no litoral brasileiro: Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro.
Figuras: 52-57

Apresenta talo achatado de aspecto foliáceo, palmada, ramificada em um só plano, com ápice arredondado, lâminas basalmente cuneadas medindo de 4-7 cm de altura e 4-6 mm de largura. Córtex possuindo de 1-2 camadas de células e medula com 1-3 camadas de células. Padrão macrocistidiado, células medulares alongadas com grande quantidade de amido, medindo 15 µm de altura e 40 µm de largura. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria hayi* encontra-se em Gurgel et al. (2004b).

***Comentário*:** *G. hayi* apresenta uma morfologia que pode ser muitas vezes confundida com outras espécies achatadas (e.g. *G. cuneata*, *G. curtissiae*, *G. galetensis* e *G. mammillaris*) segundo Gurgel et al. (2004b). Esta espécie não havia sido referida para o Brasil, possivelmente em virtude de identificações errôneas, uma vez que sua morfologia é bastante similar a outras espécies comuns no litoral brasileiro (*G. cuneata* e *G. curtissiae*). Desta forma estamos referindo pela primeira vez para o Brasil *G. hayi* com base em dados morfológicos e moleculares.

Material examinado: Rio do Fogo (RN) **Plastino, E.M**. SPF 56874, SPF 56875.



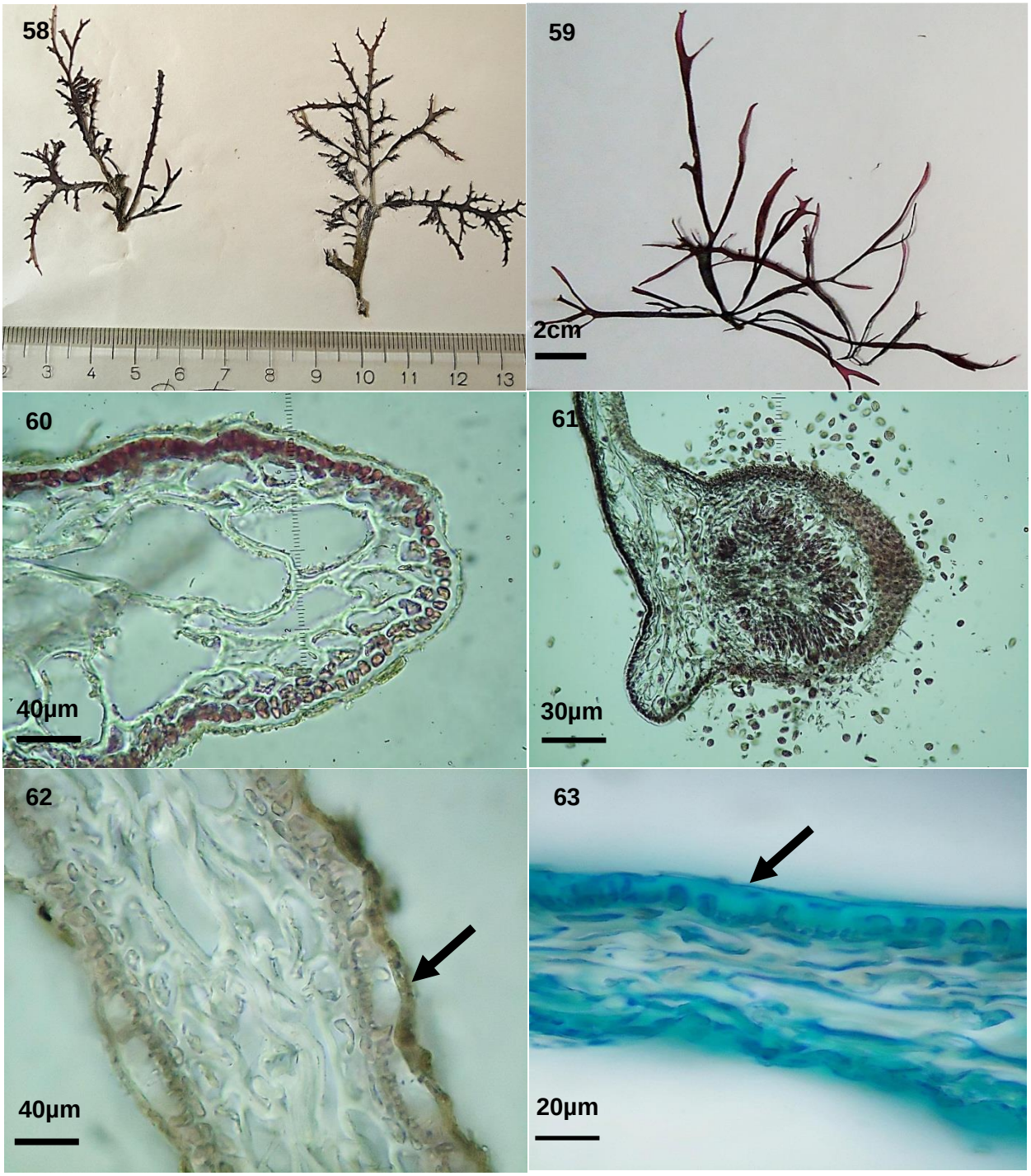
Figuras 52-57: *Gracilaria hayi*. Figuras 52 e 53. Aspecto geral do talo. Figura 54. Corte transversal da região próxima ao ápice. Figuras 55 e 56. Corte transversal da região mediana do talo. Figura 57. Detalhe da região cortical.

Gracilaria isabellana Gurgel, Fredericq & J.N. Norris
Localidade Tipo: Ilhas Virgens
Distribuição no litoral brasileiro: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro.
Figuras: 58-63

Apresenta talo achatado com ramificação predominantemente dística, diâmetro do talo mais espesso nas regiões medianas, algumas vezes portando ramos curtos medindo 8 cm de altura e diâmetro do talo 1-2 mm, alargando-se na região basal, cor vinho. Células do córtex isodiamétricas com 7-10 µm de diâmetro. Região cortical com duas camadas, apresentando transição macrocistidiada. Células medulares medindo 40-67 µm de altura e 70-145 µm de largura, com 4-5 camadas de células na medula. Cistocarpo proeminente. Conceptáculos espermatangiais tipo “textorii”.

Comentário: Espécie com limite taxonômico pouco definido. As algas de ocorrência na costa brasileira idenficadas como *G. tepocensis* correspondem ao que Gurgel et al. (2004c) descreveram como *G. isabellana*, de modo que tais evidências nos levam a considerar que *G. tepocensis* não ocorre no Brasil. Posteriormente Bellorin (2002) descreveu para a Bahia uma espécie achatada identificada como *G. lacinulata*, no entanto, Gurgel et al. (2004c) demonstraram que a identificação de *G. lacinulata* é incorreta e que tal material corresponde à *G. isabellana*. Dessa forma percebe-se que as espécies anteriormente descritas para o Brasil como *G. tepocensis* e *G. lacinulata* devem ser identificadas como *G. isabellana*.

Material examinado: Cabo Frio (RJ) **Plastino, E.M.** SPF 52189, SPF 52190, SPF 52191; Caraguatatuba (SP) **Guimarães, S.M.P**. SPF57019, SPF 57021; São Sebastião (SP) Oliveira, M.C. SPF 57015, SPF 57016; Ubatuba (SP) **Costa, E.S. & Guimarães, N.R**. SPF 57013, SPF 57014, SPF 57020; SPF 56859, SPF 56861; Florianópolis (SC) Oliveira, E.C. SPF 57192, SPF 57284; Torres (RS) **Oliveira, E.C**. SPF 57285.



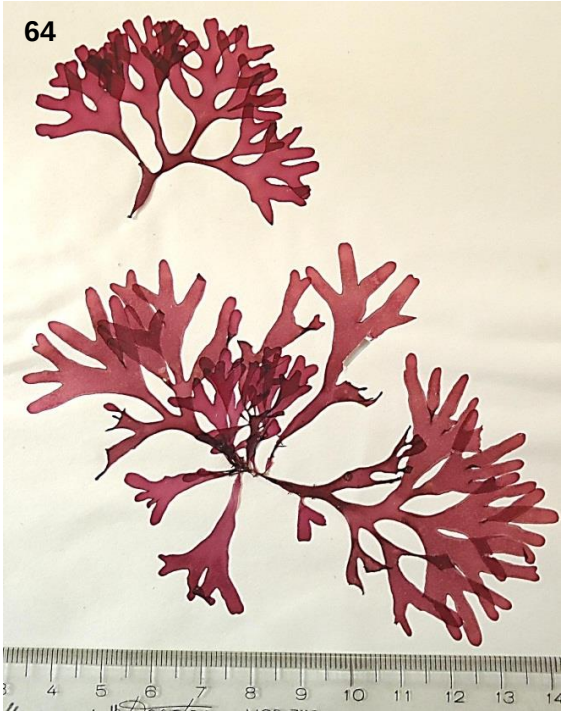
Figuras 58-63: *Gracilaria isabellana*. Figuras 58 e 59. Aspecto geral do talo. Figura 60. Corte transversal da região próxima ao ápice. Figura 61.Corte transversal do cistocarpo. Figuras 62 e 63. Conceptáculos espermatangiais em criptas rasas (seta).

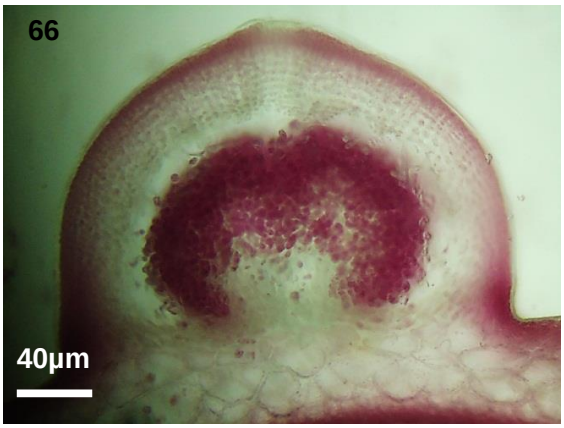
Gracilaria smithsoniensis Gurgel, Fredericq & J.N. Norris
Localidade Tipo: Ponto Galeta, República do Panamá
Distribuição pelo litoral brasileiro: Bahia e Espírito Santo.
Figuras: 64-67

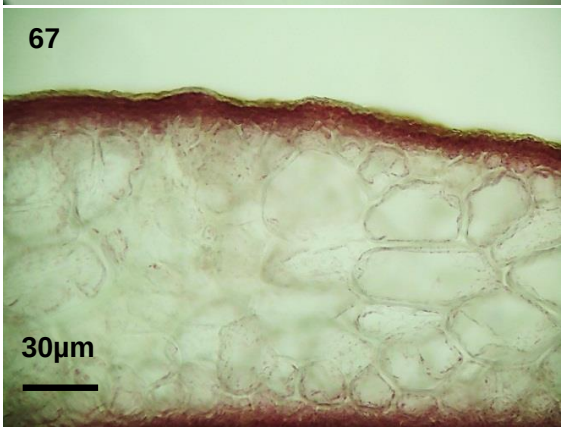
Talo completamente achatado com bordas lisas e ápices arredondados, medindo 5 cm de altura. Padrão macrocistidiado, com células na porção mediana bastante alongadas. Célula da medula medindo 100 µm de altura e 80 µm de largura. Córtex formado por 2 camadas de células. Cistocarpos bem evidentes em todo o talo, sem constrição na base com células nutritivas tubulares na porção inferior, na base do cistocarpo. Aspecto carnoso, bastante resistente. A descrição morfológica detalhada da anatomia reprodutiva de *Gracilaria smithsoniensis* encontra-se em Gurgel et al. (2004a).

Comentário: Segundo Gurgel et al. (2004a) *G. smithsoniensis* é uma espécie de fácil reconhecimento devido ao seu hábito delicado e eixo estreito com ramificações dicotômicas. No entanto, o que percebemos nos materiais estudados na costa brasileira é uma semelhança morfológica com *G. cearensis*, mas essa semelhança não é confirmada por dados moleculares (Capítulo 3) mostrando ser o material brasileiro uma entidade específica semelhante ao material descrito por Gurgel et al. (2004a).

Material examinado: Marataízes (ES) **Oliveira, M.C**. SPF 57341.







Figuras 64-67: *Gracilaria smithsoniensis*. Figura 64. Aspecto geral. Figura 65. Corte transversal próximo ao ápice. Figura 66. Corte transversal do cistocarpo. Figura 67. Detalhe da região mediana do talo.

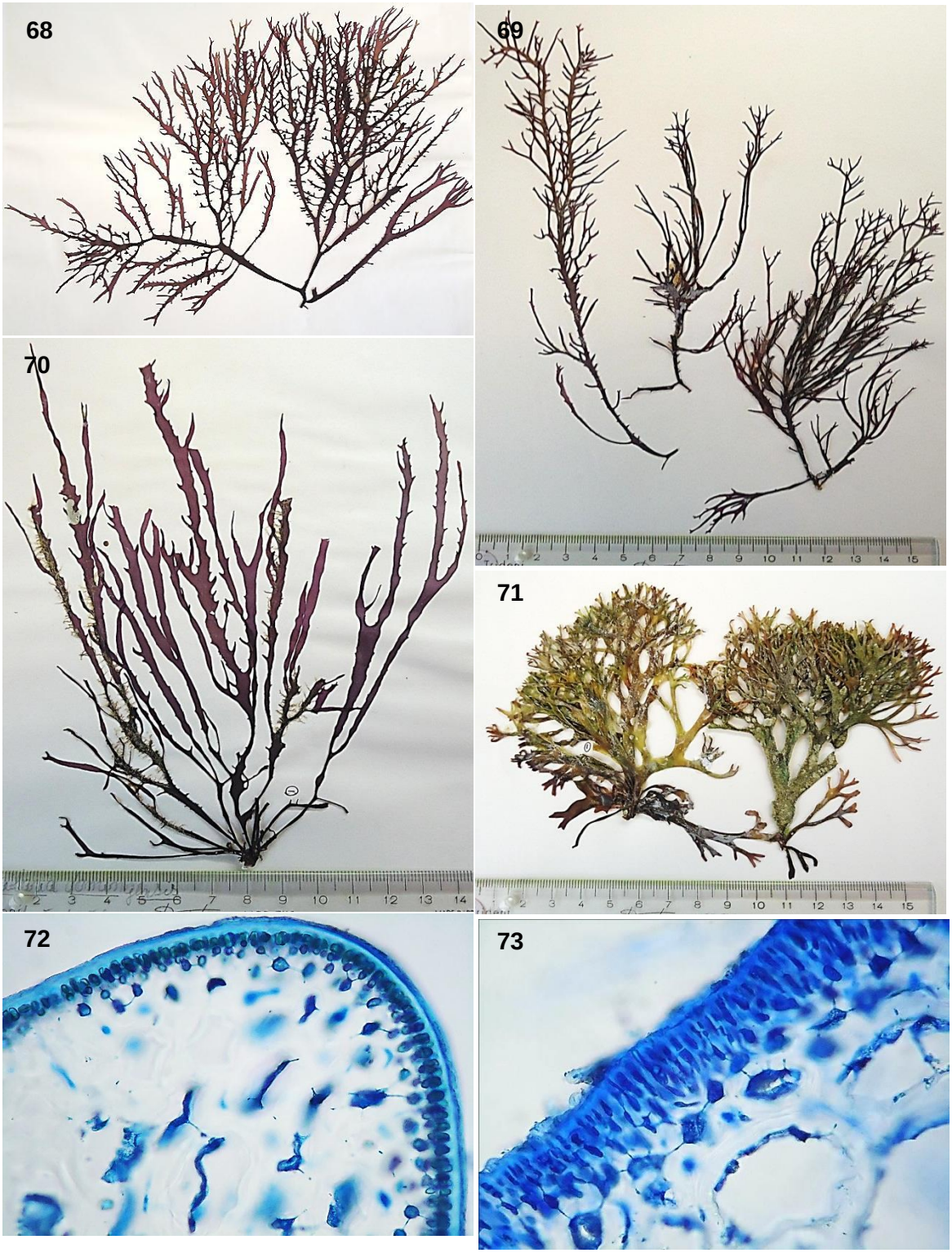
Gracilaria yoneshigueana Gurgel, Fredericq & J.N. Norris
Localidade Tipo: Praia Rasa, Búzios, Rio de Janeiro
Distribuição no litoral brasileiro: Rio Grande do Norte, Paraíba, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina.
Figuras: 68-73

Apresenta talo completamente achatado com 2-4 mm de largura, com ramificação dística de até 3ª ordem. Nos ramos de 2ª ordem observam-se ramificações irregulares por todo o talo, curtas e pontiagudas com ápices bifurcados, largura do talo aumentando em direção ao ápice, devido ao grande número de ramificações ao longo do talo, este dá a impressão de digitado a palmado, sustentando inúmeras ramificações pequenas irregularmente distribuídas nas margens ao longo do talo. Coloração vinho, apresentando textura carnosa em direção a base e delicada em direção ao ápice. Em corte transversal observa-se de 1-2 camadas, às vezes 3 camadas corticais, sendo a maioria das células alongadas medindo de 10-15 µm de altura. As células da periferia medem 5-7 µm de altura por 2-5 µm de largura nas células mais basais. Padrão medular macrocistidiado com células da medula medindo 25-30 µm de altura por 15-20 µm de largura nas células da periferia. As células basais medem 100-150 µm de altura por 52-65 µm de largura. Nas células localizadas no centro da medula observa-se um alongamento ficando mais comprimida, enquanto que as células ao redor do centro são em sua maioria isodiamétricas, apresentando algumas pontes de conexão entre as células vizinhas do córtex.

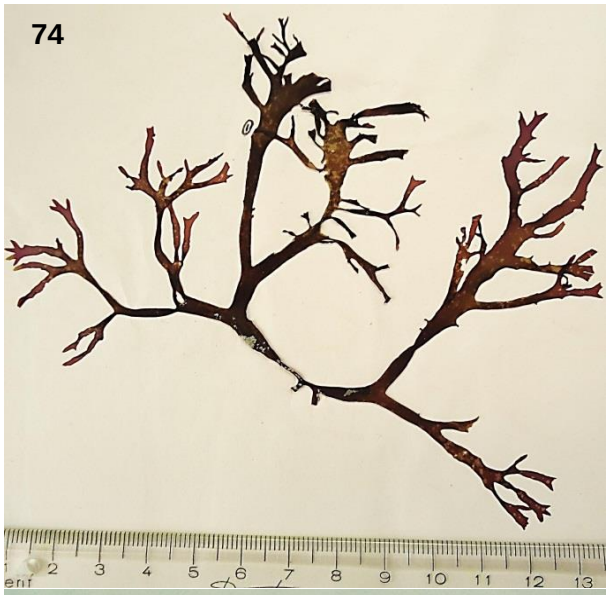
Comentário: O material coletado em Pirangi (RN) por Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C. (BRA67; SPF 57182) foi inicialmente identificado em campo como *Gracilaria intermedia*. Apesar da caracterização inicial morfológica como *G. intermedia*, os dados moleculares para os três marcadores mostra que esse exemplar é uma variação morfológica de *G. yoneshiguena* (Capítulo 3). *Gracilaria intermedia* apresenta limite taxonômico pouco definido quando comparado com *Gracilaria yoneshigueana*, apresentando características morfológicas que as assemelham. As análises moleculares para o gene *rbc*L corroboram a proximidade das duas espécies (Gurgel et al. 2008). *Gracilaria yoneshigueana* apresenta grande plasticidade morfológica, podendo ser confundida em campo com *G. domingensis*. A descrição morfológica detalhada

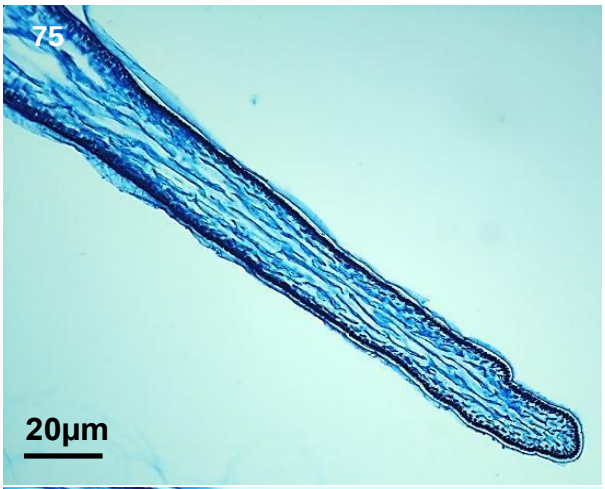
da anatomia reprodutiva de *Gracilaria intermedia* encontra-se bem caracterizada em Gurgel et al. (2004a).

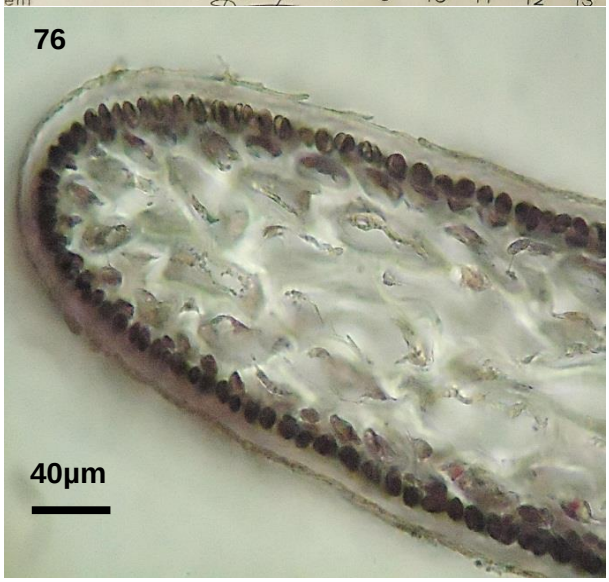
Material examinado: Rio do Fogo (RN) **Plastino, E.M**. SPF 56876, SPF 57190; Conde (PB) **Costa, E.S.** SPF 57130, SPF 57131; SPF 57133, Florianópolis (SC) **Oliveira, E.C**. SPF 57179, SPF 57287, SPF 57288, SPF 57304.

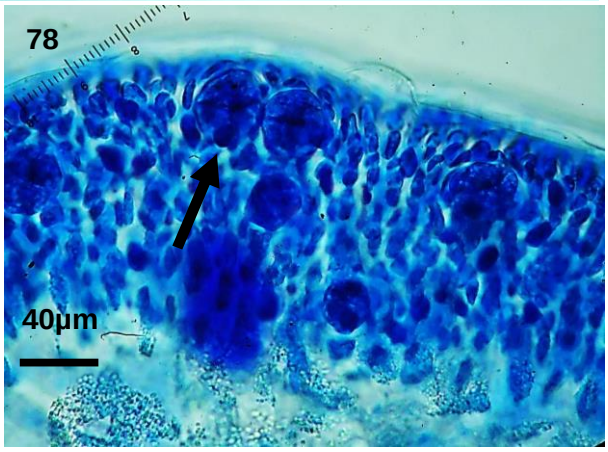


Figuras 68-73: *Gracilaria yoneshigueana:* Figuras 68 a 71: Aspecto geral do talo, mostrando a plasticidade fenotípica apresentada pela espécie. Figura 72. Corte transversal próxima ao ápice. Figura 73. Detalhe da região cortical do talo.









Figuras 74-78: *G. yoneshigueana*. Figura 74. Aspecto geral do talo. Figura 75. Corte transversal próximo ao ápice. Figuras 76 e 77. Detalhe da região próxima ao ápice. Figuras 78. Detalhe da região cortical mostrando os tetrasporângios (seta).

Gracilariopsis E.Y.Dawson 1949

Espécie Tipo: *Gracilaria lemaneiformis* (Bory de Saint Vicent)

E.Y. Dawson, Acleto & Foldvik

Gracilariopsis silvana C.F.D. Gurgel, S. Fredericq & J.N. Norris

Localidade Tipo: Venezuela

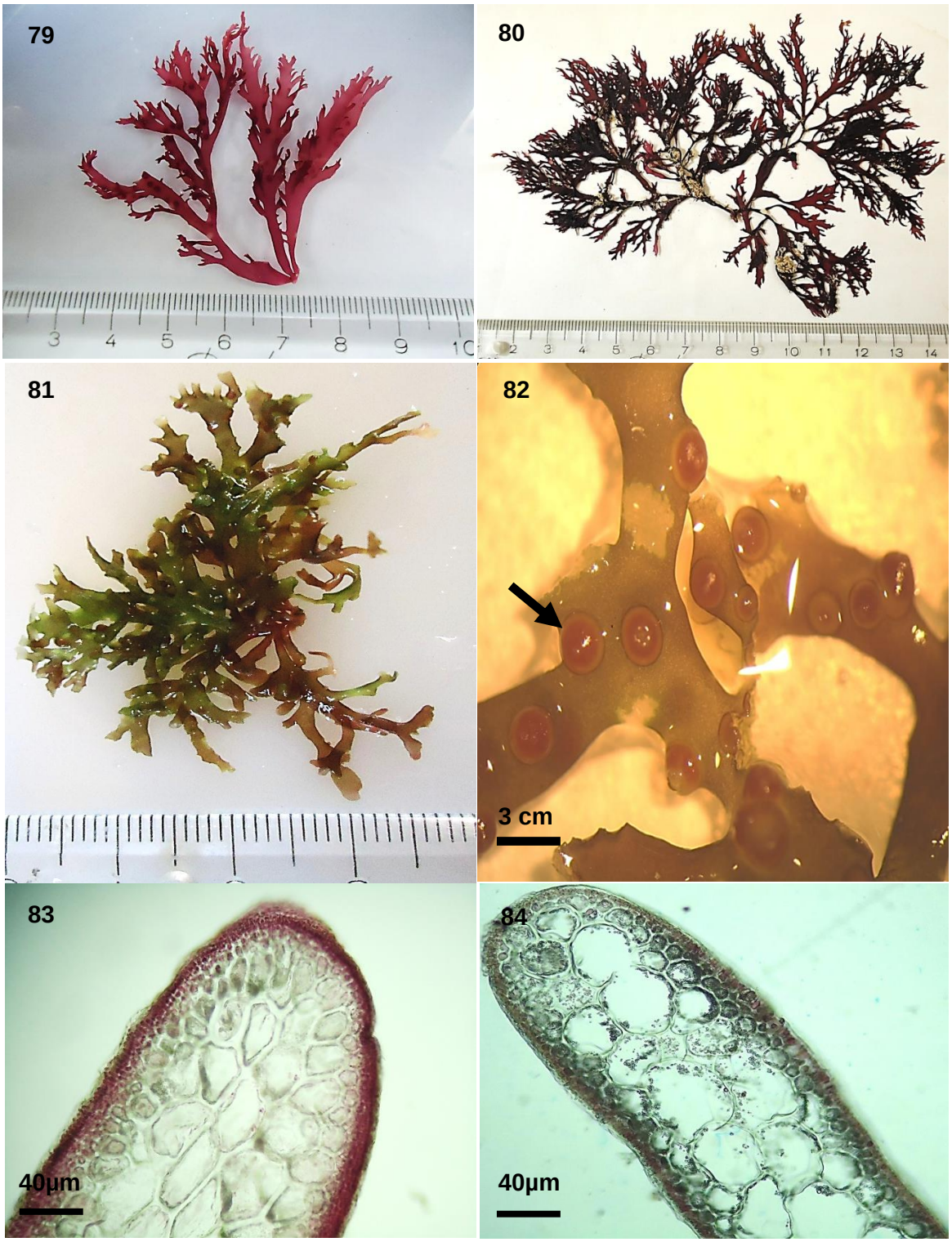
Distribuição no litoral brasileiro: Rio Grande do Norte e Espírito Santo.

Figuras: 79-88

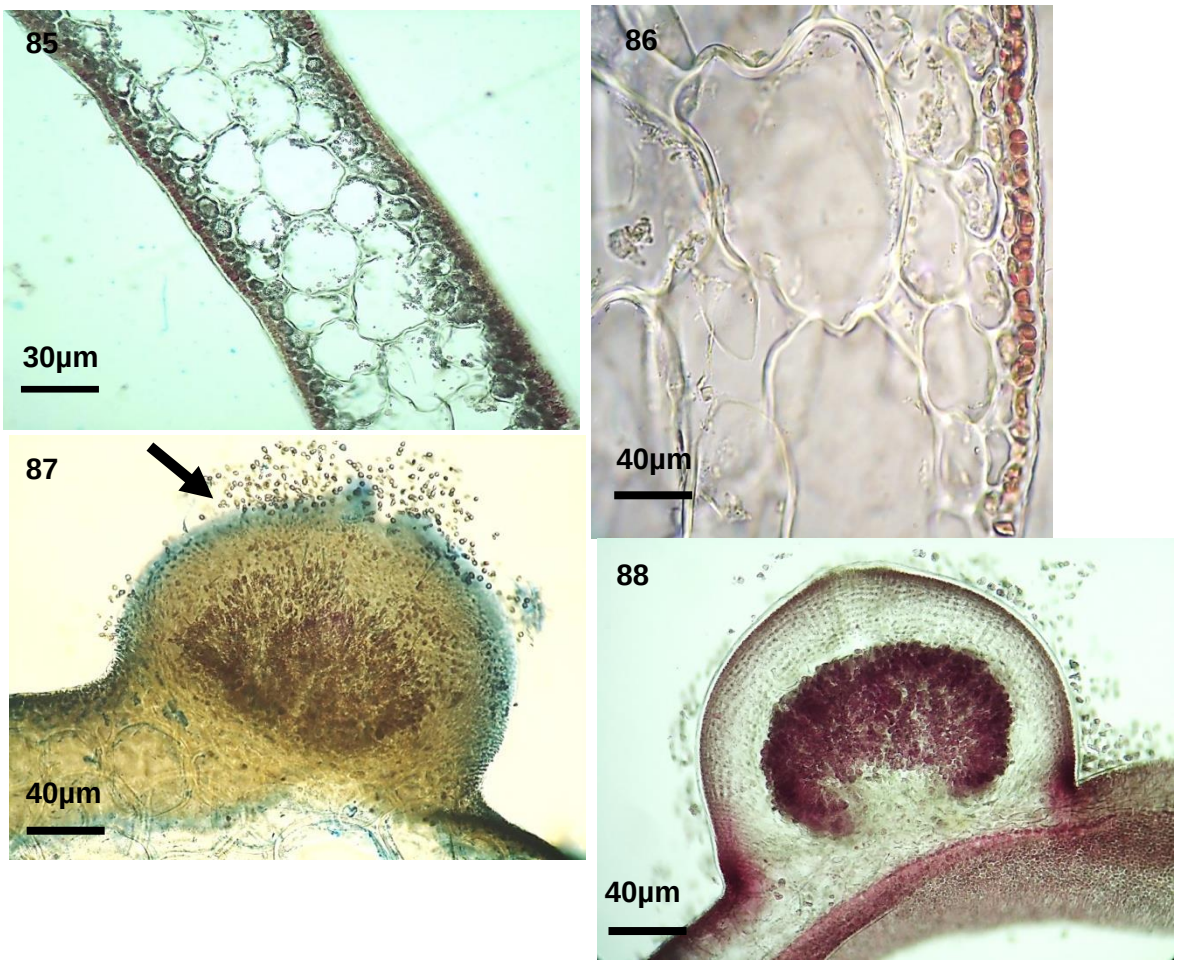
Talo completamente achatado com ápices dicotômicos a subdicotômico a irregularmente pinado ligeiramente ondulada com ramificações irregulares,medindo 8 cm de altura por 3 mm de largura. Na região mediana observa-se alargamento do talo com muitas subramificações. Padrão medular macrocistidiado com células medulares grandes, com 5-6 camadas. Na medula as células medem 250 µm de altura e 120 µm de largura. Córtex apresentando 2 camadas de células. Plantas femininas com cistocarpos esféricos em diferentes estágios espalhados por todo o talo, com uma leve constrição na base, ausência de células nutritivas tubulares nos espécimes coletados no Espírito Santo, diferente dos observados no material do Rio Grande do Norte, onde observou-de alguns filamentos nutritivos tubulares.

Comentário: *Gracilariopsis silvana* é a única entre as 25 espécies de *Gracilariopsis* descritas para o mundo a apresentar talo achatado em forma de fita (Gurgel et al. 2003). *Gracilariopsis silvana* apresenta medula bem característica, possuindo células alongadas na região mediana, achatadas com regiões apicais mais alargadas e bastante ramificadas. Nas plantas femininas observa-se uma grande quantidade de cistocarpo espalhados pelo talo. Estudos pretéritos apontavam *Gp. tenuifrons* como a única espécie de *Gracilariopsis* presente na costa brasileira. Neste estudo referimos *Gp. silvana* pela primeira vez para a costa brasileira.

Material examinado: Pirangi (RN) **Oliveira, E.C. & Oliveira, M.C**. SPF 57185; Marataízes (ES) **Oliveira, M.C**. SPF 57339; Meaípe (ES) **Oliveira, E.C**. SPF 57343, Castelhanos (ES) **Nauer, F**. SPF 57344, SPF 57345.



Figuras 79-84: *Gracilariopsis silvana*: Figuras 79 a 71. Aspecto geral do talo. Figura 82. Detalhe do talo mostrando cistocarpo (seta). Figuras 83 e 84. Corte transversal da região próxima ao ápice.



Figuras 85-88: *Gracilariopsis silvana*: Figura 85. Corte transversal da região mediana do talo. Figura 86. Detalhe da região cortical. Figuras 87 e 88. Corte transversal do cistocarpo, mostrando os carpósporos sendo liberados (seta).

Gracilariopsis tenuifrons (C.J.Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommersand

Localidade Tipo: Alagoas, Brasil

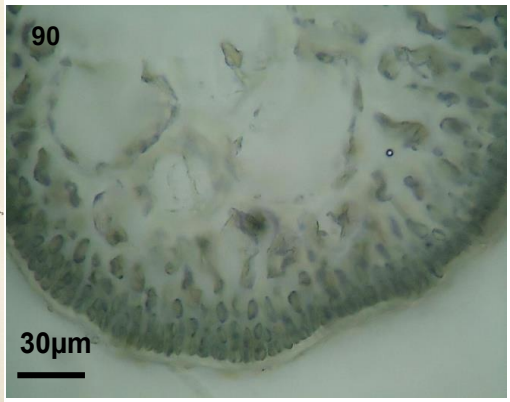
Distribuição no litoral brasileiro: Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

Figuras: 89-90

As descrições morfológicas e anatômicas desta espécie foram descritas em Bird & Oliveira (1986). As características anatômicas com ênfase na ontogenia da formação do cistocarpo encontram-se descritas em detalhe em Bellorin (2002).

Comentário: *Gracilariopsis tenuifrons* é uma espécie bastante delicada, sendo apontada como a única espécie de *Gracilariopsis* descrita para o Brasil, no entanto com base em dados morfológicos e moleculares identificamos uma segunda espécie de *Gracilariopsis* de ocorrência na costa brasileira: *Gp. silvana*.

Material examinado: Valença (BA) **Oliveira, E.C**. SPF 27957; Lagoa do Mundaú (AL) **Plastino, E.M**. SPF 55700, SPF 55734; Cabo Frio (RJ) **Plastino, E.M.** SPF 52192; Itahaém (SP) SPF 55323; Ubatuba (SP) **Plastino, E.M**. SPF 56086, SPF 56869, SPF 56870; Florianópolis (SC) **Oliveira, E.C**. SPF 57283.



Figuras 89-90: *Gracilariopsis tenuifrons*. Figura 89. Aspecto Geral do talo. Figura 90. Corte transversal da região apical do talo.

Discussão

A família Gracilariaceae possui uma ampla distribuição geográfica acompanhada de um elevado número de espécies com morfologia relativamente simples, além da grande plasticidade fenotípica observada, especialmente nas algas que possuem talo achatado, o que contribui consideravelmente para a dificuldade na correta identificação, gerando uma série de sinonímias e impossibilitando o conhecimento acerca do correto número de espécies. Essa problemática é persistente, principalmente em espécies pobremente caracterizadas, em virtude dos poucos trabalhos desenvolvidos e baseados unicamente em caracteres morfológicos. Dessa forma, observamos que as descrições das algas gracilarióides de talo achatado apresentam uma série de discordâncias no que diz respeito ao nome das espécies de acordo com as descrições de cada autor.

As espécies de *Gracilaria* com talo cilíndrico que ocorrem no Brasil são: *Gracilaria birdiae* (Figuras 07-10), *G. caudata* (Figuras 11-14) e *G. cornea* (Figuras 25-29), todas bem caracterizadas em estudos pretéritos, tanto de cunho taxonômico quanto fisiológico (e.g. Oliveira & Plastino 1994; Costa & Plastino 2001; Plastino & Oliveira 2002). A identificação correta dessas três espécies é complicada se baseada unicamente na morfoanatomia, com *G. birdiae* apresentando características intermediárias entre a *G. caudata* e a *G. cornea* (Bellorin 2002). *Gracilaria cornea* é a mais distinta morfologicamente, estando bem caracterizada em Bird et al. (1986b). Entretanto, os espécimes de *G. cornea* analisados neste trabalho apresentaram grande plasticidade fenotípica. Os limites taxonômicos entre essas três espécies analisadas neste trabalho não se mostraram bem definidos quando baseados apenas em sua morfologia. Alguns espécimes identificados em campo como *Gracilaria birdiae*, quando submetidos às análises moleculares, agruparam-se com *G. caudata* (como os espécimes coletados em Pernambuco e no Espírito Santo) corroborado pelo resultado dos três marcadores analisados (*cox*1, UPA e *rbc*L). Mesmo com essa proximidade, os resultados apresentados no Capítulo 3, mostraram que *G. birdiae* molecularmente difere das espécies de *G. caudata* e *G. cornea*, diferentemente dos resultados encontrados por Bellorin (2002), com base em análises moleculares do marcador nuclear SSU rDNA, onde os limites moleculares dessas três espécies não se mostraram bem definidos.

Os estudos morfológicos das algas do gênero *Gracilaria* de talo achatado presentes neste trabalho revelaram que o padrão medular apresenta-se sempre do tipo macrocistidiado, com córtex apresentando de 2-3 camadas de células e a transição das células do córtex para a medula ocorrendo de forma abrupta, com células medulares semelhantes na distribuição, mostrando-se mais alongadas. Os caracteres apontados como taxonomicamente diagnósticos na separação das espécies, na maioria das vezes se sobrepõem de forma que os mesmos pouco contribuem na identificação.

Algumas espécies de talo achatado identificadas nesse trabalho tiveram os dados morfológicos e moleculares bem definidos corroborando os trabalhos de descrição morfoanatômica, a exemplo de *G. domingensis* (Figuras 43-45) que apresenta a única exceção no modo de distribuição dos espermatângios, sendo caracterizado como tipo “verrucosa”, localizado em criptas profundas, diferindo das demais algas gracilarióides de talo achatado, cuja distribuição espermatangial é tipo “textorii”. No entanto, para *G. cervicornis* observou-se que dados moleculares (Capítulo 3) apontam para a existência de duas espécies distintas identificadas com base na morfologia como uma única espécie. Esses materiais foram coletados no Rio Grande do Norte e na Paraíba, tal divergência nos leva a considera-lás como espécies distintas possibilitando retomar a discussão da existência de *G. ferox* anteriormente citada por E.C. Oliveira (Comunicação Pessoal) como sinônimo de *G. cervicornis*. No entanto, pode ser que essa espécie ocorra no Brasil, não tratando-se de um sinônimo de *G. cervicornis*, mas sim de uma entidade específica. Entretanto, tais afirmações necessitam de análises moleculares mais robustas.

A caracterização molecular de algumas espécies de algas gracilarióides de talo achatado de ocorrência na costa brasileira é apresentada pela primeira vez neste trabalho, revelando novas referências para o Brasil, além de contribuir na resolução de algumas sinonímias.

A espécie de talo achatado *G. cearensis* (Figuras 15-20), descrita para os estados do Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, assemelha-se morfologicamente a espécie *G. smithsoniensis* (Figuras 64-67), anteriormente descrita com base em dados morfológicos para o estado da Bahia por Nunes (2005). Os exemplares de *G. smithsoniensis* analisados com base na morfologia foram coletados no Rio Grande do Norte e no Espírito Santo e comparados com

base em dados moleculares com espécimes coletados no Ceará, Pernambuco e São Paulo.

A espécie subcilíndrica *G. damaecornis* (Figura 37-42), anteriormente estudada por Ganesan (1993) e Bellorin (2002) a partir de espécimes da Venezuela, remeteu a uma confusão morfológica com *G. caudata*. No entanto os materiais identificados como *G. damaecornis* analisados neste trabalho, coletados no estado de Santa Catarina, não apresentaram semelhanças nem morfoanatômicas e nem moleculares com *G. caudata*, formando dois agrupamentos bem definidos quando analisados com base em dados moleculares. Com base nos materiais estudados, referimos *G. damaecornis* como primeira citação para o Brasil, com distribuição nos estados da Bahia e Santa Catarina.

A espécie *Gracilaria flabelliformis* (Figuras 46-51), descrita anteriormente como *Plocaria flabelliformis* (P.L. Crouan & H.M. Crouan), foi posta em sinonímia sendo agora identificada como *G. flabelliformis* pelo Gurgel et al. (2004c), espécie referida para o Brasil com base em dados morfológicos para o estado da Bahia (Nunes 2005). Esta espécie foi estudada e analisada neste trabalho com base em dados morfoanatômicos e moleculares, a partir de material coletado no Rio Grande do Norte.

A espécie *G. hayi* (Figuras 52-57) descrita por Gurgel et al. (2004b) pode ser confundida com *G. cuneata* (Figuras 26-29) e *G. mammillaris*, nomes empregados de forma incorreta para esta espécie com base em dados morfológicos. Neste trabalho, analisamos, com base em dados morfológicos e moleculares, materiais coletados no Rio Grande do Norte, referindo esta espécie como primeira citação para o Brasil.

A espécie *G. yoneshiguena* (Figura 68-78) e *G. intermedia* são apontadas por Gurgel et al. (2008) como proximamente relacionadas com base em dados moleculares. Os materiais analisados de *G. intermedia* apresentaram características medulares bem particulares quando comparada com *G. yoneshigueana*, sendo está última muitas vezes confundida em campo com *G. domingensis*. Neste trabalho, analisamos o material identificado em campo como *G. intermedia* coletado no estado do Rio Grande do Norte e com base em dados moleculares não encontramos diferenças suficientes para considerá-la uma espécie distinta de *G. yoneshigueana*. Os dados moleculares obtidos para os três marcadores moleculares não separam essas duas espécies, mas essas

apresentaram a morfologia distinta, o que pode ser resultado da plasticidade fenotípica. Dessa forma, com base nos dados moleculares optamos por não considerar *G. intermedia* uma entidade específica distinta para o Brasil.

A espécie *G. yoneshigueana* descrita por Gurgel et al. (2004b), nos revelou uma grande plasticidade fenotípica com os espécimes coletados em diferentes estados e analisada com base em dados morfológicos e moleculares. Os materiais de *G. yoneshigueana* foram coletados nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Santa Catarina, cuja semelhança foi observada apenas com base em dados moleculares, uma vez que a morfologia mostrou-se distinta nos espécimes de diferentes localizações geográficas.

A espécie *G. isabellana* (Figuras 58-63) apresenta uma ampla distribuição na costa brasileira e vem sendo tratada sob vários nomes. Dessa forma, o que se chamava de *G. tepocensis* de ocorrência no Sul e Sudeste do Brasil (Cordeiro-Marino 1972; Horta & Bellorin 2002), trata-se na verdade de *G. isabellana*, de modo que vários exemplares coletados no estado de São Paulo e analisados neste trabalho sob a identificação de *G. tepocensis* foram identificadas com base em dados moleculares como *G. isabellana*. Outros exemplares coletados em Santa Catarina e analisados foram identificados como *G. isabellana*, além do material estudado por Bellorin (2002) identificado como *G. lacinulata* da Bahia, também trata-se da espécie *G. isabellana*, segundo a proposta de sinonímia de Gurgel et al. (2004c).

Das espécies de *Gracilaria* estudadas neste trabalho observamos que os caracteres morfológicos e anatômicos diagnósticos utilizados na distinção das espécies, em boa parte das análises se mostraram pouco informativos, a exemplo do tipo de distribuição espermatangial que é definido como tipo “textorii” em praticamente todas as espécies de algas achatadas, além da anatomia uniforme do cistocarpo. Dessa forma, temos que a identificação e separação das algas gracilarióides de talo achatado, foi bem caracterizada com base em dados moleculares, contribuindo dessa forma na elucidação de alguns dos problemas taxonômicos presentes no grupo.

Das espécies de *Gracilariopsis* descritas, apenas *Gp. tenuifrons* (Figuras 89 e 90) havia sido descrita para o Brasil sendo apontada como a única espécie do gênero citada para o litoral brasileiro. Essa espécie que teve sua morfologia e anatomia adequadamente documentada por Bird & Oliveira (1986). No entanto, neste trabalho, foi possível identificar com base em dados morfológicos e

moleculares a espécie descrita por Gurgel et al. (2003) como *Gp. silvana* (Figuras 79-88). Essa espécie é aparentemente confundida com as espécies de *Gracilaria* por apresentar o talo achatado, uma vez que as demais espécies de *Gracilariopsis* apresentam o talo cilíndrico e de diâmetro pequeno. No entanto, dados moleculares confirmaram a identificação dessa espécie como *Gp. silvana*. Dos materiais coletados no Rio Grande do Norte e no Espírito Santo percebemos diferenças morfológicas e diferenças moleculares entre os espécimes dos dois estados, mas estes formaram um agrupamento único com a *Gp. silvana* da Venezuela (Capítulo 3).

As espécies de *Gp. tenuifrons* analisadas revelaram grande plasticidade fenotípica quando comparadas aos materiais de diferentes localizações, no entanto, os dados moleculares mostraram forte similaridade entre os espécimes. Em trabalhos pretéritos desenvolvidos com o grupo essa espécie não havia sido descrita para o estado de Santa Catarina, contudo, neste trabalho estamos incluindo sua ocorrência para este estado.

Referências

Agardh JG (1852) Algas florideas complectens. Part 2. In Species genera et ordines algarum. Vol. 2. Gleerup, Lund, pp. 337–720

Bellorin AM, Oliveira MC, Oliveira EC (2002) Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on SSU DNAr and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. J Phycol 38: 551-563

Bird CJ, Van der Meer JP, McLachan J (1982) A comment on *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Pappenf. (Rhodophyta: Gigartinales). J Mar Biol Ass. U.K. 62: 453-459

Bird CJ, McLachan J (1984) Taxonomy of *Gracilaria*. Evalution of some aspects of reproductive estructure. Hydrobiologia 116/117, 41-62

Bird CJ, Oliveira EC, Mclachlan J (1986b) *Gracilaria cornea*, the correct name for western atlantic alga hitherto know as *G. debilis* (Rhodophyta, Gigartinales). Can J Bot 64:2045-51

Bird CJ, Rice EL, Murphy CA, Ragan MA (1992) Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. Phycologia 31: 510-522

Bird CJ, Ragan MA, Critchley AT, Rice EL, Gutell RR (1994) Molecular relationship among the Gracilariaceae (Rhodophyta): further observations on some undetermined species. Eur J Phycol 29:195-202

Costa VL, Plastino EM (2001) Histórico de vida de espécimes selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 24 (suppl):491–500

Cordeiro-Marino M (1972) Rodofíceas Marinhas do estado de Santa Catarina. Instituto de Biociências, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Dawson EY (1949) Studies of the northeast Pacific Gracilariaceae. *Occasional* Papers of the Allan Hancock Foundation 7: 1-105

Eldstein T, Chen LCN, Mclachlan J (1978) Studies on *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta): Reproductive structures. J Phycol 92-100

Ferreira-Correia, MM (1987) Rodofíceas marinhas bentônicas do litoral oriental do Estado do Maranhão. Coleção Ciências Biológicas. Série Botânica 1: 1-255

Ferreira LB, Barufi JB, Plastino EM (2006) Growth of red and green strains of the agarophyte tropical *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 29:185–190

Fredericq S, Norris JN (1985) Morphological studies on some tropical species of *Gracilaria* Grev. (Gracilariaceae, Rhodophyta): Taxonomic concepts based on reproductive morphology. In Abbott, I.A. & Norris, J. N. eds Taxonomy of economic seaweeds

Fredericq S, Hommersand MH (1989a) Proposal of Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. J Phycol 25: 213-27

Fredericq S, Hommersand MH (1989b) Comparative morphology and taxonomic satatus of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Phycol 25:228-243

Ganesan, EK (1993) Morphological and taxonomic studies on some little-known species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Venezuela. 1. *G. damaecornis.* Hydrobiologia 260/261:91-6

Guimarães M, Plastino, EM, Oliveira EC (1999) Life History, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Bot Mar 42: 481-6

Guimarães M, Plastino EM, Destombe C (2003) Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Eur J Phycol 38: 165-169

Guimarães SMPB (2006). A revised checklist of benthic marine Rhodophyta from the State of Espírito Santo. Bol Inct Bot 17: 143-194

Guiry MD, Guiry GM (2010) Algaebase.World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org. Accessed 06 Nov 2012

Gurgel CFD (2001) Phylogeny, Taxonomy and Biogeography of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with Emphasis on Taxa from the Western Atlantic. Ph.D. Dissertation. University of Louisiana at Lafayette, UMI microform nº 3029835, Bell & Howell-Proquest Information and Learning Press, Ann Harbor, MI. 273 pp

Gurgel CFD, Liao LM, Fredericq S, Hommersand MH (2003) Systematyics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbc*L sequence analyses and mophological evidence. J Phycol 39:154–171

Gurgel CFD, Fredericq S (2004a) Molecular systematics and taxonomy of flattened species of *Gracilaria* Greville (Gracilariaceae, Gracilariales, Rhodophyta) from the western Atlantic. In: *Taxonomy of economic seaweeds, with reference to the Pacific and other locations.* vol.IX (Ed. By I.A. Abbott & K.J. McDermid), pp.159-199. Hawaii, Honolulu, HI,USA

Gurgel CFD, Fredericq S (2004b) Systematics the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): A critical assessment based on *rbc*L sequence analyses. J Phycol 40: 138-159

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (2004c) *Gracilaria apiculata* e *G. flabelliformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta): restoring old names for common tropical western atlantic species, including the recognition of three new subspecies, and replacement name for "*G. lacinulata*". Cryptogamie, Algol 25 367-396

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris, JN, Yoneshigue-Valentim Y (2008) Two news flat species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *G. abyssalis* sp. nov. and *G. brasiliensis* sp. nov. Phycologia 47, 249-264

Greville, RK (1830) Algae Britannicae, or descriptions of the marine and other inarticulated plants of the British Islands, belonging to the order Algae, with plates illustrative of the genera MacLachlan & Stewart Pub. Edinburg. 218 pp

Horta PA, Bellorin AM (2002) Observações morfo/anatômicas de *Gracilaria tepocensis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) do infralitoral do Sul e Sudeste brasileiro. Insula 29-37

Joly AB (1965) Flora Marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Univerdade de São Paulo, ser. Bot., 21:1-393

Nunes JMC (2005) Rodofíceas Marinhas Bentônicas do Estado da Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo

Oliveira EC (1977) Algas marinhas bentônicas do Brasil. Tese (Livre Docência), Universidade de São Paulo

Oliveira EC, Bird CJ, Mclachlan J (1983) The genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gigartinales) in the Westrn Atlantic. *G. domingenesis* Sond ex Küz., *G. cervicornis* (Turn.) J. Ag. & *G. ferox* J.Ag. Can J Bot 61:2999-3008

Oliveira EC (1984) Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta): an experience with the Western Atlantic species. Hydrobiology 116/117:55-58

Oliveira EC (1994) Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta): An experience with the Western Atlantic. Hydrobiology 116/117:55-8

Oliveira EC, Plastino, EM (1994) Gracilariaceae. In: Akatsuka, I. (ed.). Biology of economic algae. SSB Academic Publishing, The Hague, pp 185-226

Oliveira EC (1998) The seaweed resources of Brazil. In Critchley AT & Ohno M (eds), Seaweed Resources of world, pp 366-371 (JICA), Yokosuka, Japan

Oliveira EC, Alveal K, Anderson RJ (2000) Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. J Phycol 8:345-377

Pacheco MR (2011) Macroalgas marinhas associadas a bancos de rodolitos do infralitoral do Espírito Santo, Brasil. Tese de Doutorado, Universade de São Paulo

Papenfuss GF (1950) Review of the genera of algae described by Stackhouse. Hydrobiology 2:181-208

Papenfuss GF (1966) Notes on Nomenclature-V. Various Chlorophyceae and Rhodophyceae. Phykos 5:95-105

Plastino EM (1985) As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. Aspectos Biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo

Plastino EM, Oliveira EC (1996) Approaches to the Gracilariaceae of terete Brazilian Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). Hydrobiology 327:145-8

Plastino EM, Ursi S, Heimbecker AMC (1998) Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: Paula EJ, Cordeiro-Marino M, Pupo Santos D, Plastino EM, Fujii M, Yokoya N (eds) IV Congresso Latino Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo, pp 359–369

Plastino EM, Oliveira EC (2002) *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with terete frond and deep spermatangial conceptacles. Phycology 41 : 389-396

Plastino EM, Ursi S, Fujii MT (2004) Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Phycol Res 52:4552

Santelices, D. & Doty, M.S. 1989. A review of *Gracilaria* farming. Aquaculture, 78:95-133

Schimtz F (1889) Systemachiste übersicht der bisher bekannten Gattungen der Florideen. Flora 72:435-56

Scholfield CI, Gacesa P, Price JH, Russell SJ, Bhoday R (1991) Restriction fragment length polymorphisms of enzymatically-amplified small-subunit rRNA-coding regions from *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta)- a rapid method for assessing “species” limits. J Appl Phycol, 329-334

Soriano-Marinho E, Morales C, Moreira WCS (2002) Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil. Aquaculture Research, 33:1081-1086

Soriano-Marinho E, Camara MR, Cabral, TM, Carneiro MAA (2007) Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. Aquaculture Research, 38: 182-187

Silva PC (1994) Report of the committee for algae: 2 Taxon 43:257-64

Silva PC, Basson PW, Moe RL (1996) Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California Publications in Botany 79: 1-1259

Sjöestedt, LG (1926) Floridean studies. Lunds Univ. Arsskr. N.F. Avd.2, 22:1-94

Steentoft M, Irvine, LM, Farnham W F (1995) Two terere species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. Phycology 34:113-27

Taylor WR (1960) Marine Algae of the eastern tropical coasts of the Americas. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan. 870 pp

Ursi S, Plastino EM (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. Rev Bras Bot 24:587–594

Wynne, MJ (1998) A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision. Nova Hedwigia 116:1-155

Yamamoto H (1975) The relationship between *Gracilariopsis* & *Gracilaria* from Japan. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 26: 217-224

Capítulo 5

Considerações Finais

Os táxons genéricos da família Gracilariaceae de ocorrência na costa brasileira foram reconhecidos com base em dados morfológicos e moleculares, demonstrando que *Gracilaria* e *Gracilariopsis* são entidades genéricas distintas. No entanto, tais análises não dão suporte para o reconhecimento de *Hydropuntia* (=*Polycavernosa*) como gênero válido, por não apresentar características exclusivas do gênero. Do ponto de vista molecular, o reconhecimento de *Hydropuntia* tornaria o gênero *Gracilaria* parafilético. A grande plasticidade fenotípica apresentada pelo grupo aliada às características intermediárias presentes tanto na distribuição dos espermatângios quanto na anatomia do cistocarpo, não favorece o reconhecimento de *Hydropuntia* como entidade genérica.

Os caracteres taxonômicos diagnósticos utilizados na separação das espécies das algas gracilarióides, foram imprecisos dificultando a identificação específica. Estudos pretéritos apontam três características informativas e de valor taxonômico: anatomia do cistocarpo, modo de distribuição dos espermatângios e a presença das células nutritivas tubulares. No entanto, não existe clareza entre os limites dessas características.

Neste trabalho, a utilização de caracteres morfológicos, especialmente na separação das espécies de gracilarióides achatadas demonstrou ser pouco precisa, uma vez que a anatomia do cistocarpo se mostrou bastante similar nas espécies e o modo de distribuição dos espermatângios, apresentou-se sempre do tipo “textorii”, com exceção da espécie *Gracilaria domingensis* que possui o tipo “verrucosa”. Esse modo de distribuição frequente tipo “textorii” pode ser explicado em virtude da anatomia do talo, uma vez que talos achatados possuem um espaço curto na região do córtex onde se encontram os conceptáculos espermatangiais, além disto, detalhes da anatomia vegetativa e da forma de divisão e posição dos tetrasporângios também é pouco informativa. A carência de caracteres morfológicos

taxonomicamente informativos na separação das espécies achatadas pode explicar a grande confusão na identificação dessas, induzindo à identificações errôneas.

Esses gargalos taxonômicos presentes nas algas gracilarióides dificultam a identificação correta, de modo que a utilização de dados moleculares contribuiu consideravelmente no reconhecimento e separação dessas espécies. A utilização de marcadores moleculares do tipo DNA “barcode” se mostrou bastante eficiente na identificação das espécies, assim como contribuiu na detecção de espécies crípticas e na solução de uma série de sinonímias nas espécies presentes na costa brasileira. Dessa forma, a utilização dos marcadores mitocondrial *cox*1 e plastidial UPA concatenada às observações morfológicas demonstraram ser ferramentas poderosas, úteis na resolução taxonômica do grupo. A utilização do marcador plastidial *rbc*L se mostrou útil na confirmação da identificação das amostras analisadas, assim como sua boa adequação para inferir a filogenia das algas gracilarióides.

A utilização de DNA “barcodes” além de possibilitar uma identificação precisa e rápida, também representa um custo/benefício relativamente baixo, auxiliando na identificação de um grande número de espécimes em um intervalo de tempo curto. Neste trabalho foram geradas sequências inéditas de dois marcadores do tipo DNA “barcodes” (UPA e *cox*1) para diversas espécies, incluindo espécies de ocorrência na costa brasileira e algumas espécies de outras localidades mantidas em cultura no banco de germoplasma. A identificação utilizando-se DNA “barcodes” possibilitou o reconhecimento de 19 táxons presentes na costa brasileira (Figura 91).

O número de espécies da família Gracilariaceae que ocorre no Brasil passa por um processo dinâmico devido às dificuldades taxonômicas associadas ao grupo explicitadas anteriormente. Neste trabalho as coletas foram realizadas buscando-se abranger o maior número de representantes das espécies descritas em trabalhos pretéritos. No entanto, não foi possível analisar algumas espécies citadas. Atualmente, o panorama do grupo das Gracilariaceae é representado por cerca de 30 espécies citadas em algum momento para a costa brasileira (Tabela 9), das quais 19 foram estudadas com base em dados moleculares e morfológicos descritos na literatura consultada e no presente trabalho (Figura 91). A espécie *G. abyssalis* (Gurgel et al. 2008) e *G. blodgetti* (Pacheco 2011) são espécies de profundidade as quais não foram coletadas nesse estudo. No entanto, *G. blodgetti* foi descrita apenas com base em dados morfológicos, tratando-se de uma espécie cilíndrica com

distribuição espermatangial do tipo “textorii” diferente das espécies cilíndricas *G. birdiae*, *G. caudata* e *G. cornea* comuns na costa brasileira, cuja distribuição espermatangial é tipo “verrucosa”. A espécie *G. brasiliensis* descrita por Gurgel et al. (2008) com base em dados morfológicos e moleculares, é relativamente próxima a *Gracilaria* sp. Búzios material estudado por Bellorin (2002) com base na morfologia e posteriormente neste trabalho com dados moleculares de *cox*1 e *rbc*L. Entretanto, com base nas divergências encontrada no marcador *rbc*L, observamos que não trata-se de uma única espécie e optamos por deixá-la como *G.* sp. Búzios. As espécies identificadas como *G. bursa-patoris* e *G. ornata* possivelmente não ocorrem no Brasil, sendo resultado de identificação errônea. No entanto, não coletamos nenhum material que fosse identificado morfologicamente como essas espécies. As espécies *G. crassissima*, *G. pauciramosa* e *G. galetensis* são descritas como endêmicas da Bahia (Nunes 2005). No entanto, em coleta realizada no Ceará analisamos materiais morfologicamente semelhantes à *G. crassissima*, que baseado nos dados moleculares são identificados como *G. cornea*, possivelmente resultado da plasticidade fenotípica comum no grupo. Dessa forma, ainda é incerto se o material estudado na Bahia trata-se de *G. crassissima* ou de uma variação plástica de *G. cornea*, uma vez que ainda não existem dados moleculares para amostras dessa espécie coletadas na Bahia. Em relação à *G. pauciramosa* e *G. galetensis* são espécies segundo as descrições (Nunes 2005) muito semelhantes, necessitando, portanto, de estudos moleculares que possam contribuir com a melhor caracterização dessas espécies. A espécie G*. foliifera* var *angustissima* também não foi coletada nesse trabalho e os dados apresentados na literatura são exclusivamente descrições morfológicas. O material coletado no Rio Grande do Norte identificado como *G. intermedia* revelou através dos dados moleculares tratar-se de uma variação morfológica da espécie *G. yoneshigueana*, não apresentando diferenças suficientes para ser considerada uma entidade específica distinta no Brasil. No entanto, a única citação que existe para *G. intermedia* é na Bahia (Nunes 2005) com base em dados morfológicos. A espécie *G. mammillaris* não foi coletada nesse trabalho e apesar da grande confusão taxonômica com as espécies achatadas *G. cuneata* e *G. curtissiae*, estas são molecularmente diferenciadas como entidades específicas distintas. A espécie *G. tepocensis* descrita para as regiões Sudeste e Sul trata-se na verdade de *G. isabellana*, descrita anteriormente como *G. lacinulata* (Bellorin 2002). A espécie *G. rangiferina* cuja espécie tipo é de

Pernambuco, foi citada por Silva et al. (1996), descrita com base em dados morfológicos. Neste trabalho não foi possível descrever sua morfologia, por tratar-se de material mantido em cultura no Banco de Germoplasma da USP, cuja morfologia apresenta-se bastante modificada. No entanto, os dados moleculares a agruparam com a sequência de *G. rangiferina* (Ghana) depositada no Genbank. A ocorrência da espécie *G. gracilis* para o estado de Alagoas, Brasil feita com base em dados moleculares (capítulo 2; Costa et al. 2012) possivelmente estava com identificação errada no Banco de Germoplasma, ressaltando a necessidade da utilização de etiquetas moleculares a fim de evitar erros de identificação em bancos de cultura. As espécies *G. birdiae*, *G. caudata*, *G. cornea*, *G. cearensis*, *G. cervicornis*, *G. cuneata*, *G. curtissiae*, *G. domingensis*, *G. flabelliformis*, *G. isabellana* e *Gracilariopsis tenuifrons* foram brevemente descritas com base em sua morfologia e sequenciadas. As espécies *G. damaecornis*, *G. hayi* e *Gp. silvana* são descritas com base em dados morfológicos e moleculares como novas ocorrências para o Brasil.

Algas gracilarióides são um grupo amplamente distribuído ao longo da costa brasileira de grande importância econômica e ecológica e, portanto, existe uma necessidade de identificação correta das espécies. O uso de DNA “barcoding” se mostrou eficiente e em alguns casos essencial para se analisar com maior cobertura geográfica as espécies do grupo, em especial as espécies de talo achatado, a fim de estabelecer corretamente as espécies da familía. Uma maior cobertura geográfica e a obtenção de marcadores moleculares para um maior número de espécimes poderá ainda indicar a ocorrência de mais táxons para o grupo na costa brasileira, com o potencial de descoberta de novas ocorrências e novas espécies. Para destrinchar a biodiversidade desse grupo tão diversificado e relevante, a taxonomia polifásica, utilizando caracteres da taxonomia molecular e morfológica é essencial.

Gracilaria birdiae	b1
*Gracilaria brasiliensis**	b2
Gracilaria caudata	c1
Gracilaria cearensis	c2
Gracilaria cervicornis 1	c3
Gracilaria cervicornis 2	c4
Gracilaria cornea	c5
Gracilaria cuneata	c6
Gracilaria curtissiae	c7
Gracilaria damaecornis	d1
Gracilaria domingensis	d2
Gracilaria flabelliformis	f1
Gracilaria hayi	h1
Gracilaria isabellana	i1
Gracilaria rangiferina	r1
Gracilaria smithsoniensis	s2
Gracilaria sp. Búzios	s3
Gracilaria yoneshigueana	y1
Gracilariopsis silvana	s1
Gracilariopsis tenuifrons	t1

Figura 91. Mapa de distribuição das Gracilariales de ocorrência na costa brasileira com base em análises moleculares. *Gurgel et al. 2008

Tabela 9. Panorama Atual das espécies de Gracilariales no Brasil.

Espécie	Estado	Referências
1.*Gracilaria abyssalis* Gurgel & Yoneshigue-Valentin	RJ	Gurgel et al. 2008
2.*Gracilaria birdiae* Plastino & E.C.Oliveira	CE, RN, PB, PE, ES	Plastino & Oliveira 2002; Guimarães 2006; **Este trabalho**
3.*Gracilaria blodgettii* Harvey	CE, ES, RJ	Oliveira 1977; Guimarães 2006; Pacheco 2011
4.*Gracilaria brasiliensis* Gurgel & Yoneshigue-Valentim	ES, RJ	Gurgel et al. 2008; **Este trabalho**
5.*Gracilaria bursa-pastoris* (S.G. Gmelin) P.C. Silva	CE, RJ	Taylor 1960
6.*Gracilaria caudata* J.Agardh	PI, CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Cordeiro-Marino 1972; Nunes 2005; **Este trabalho**
7.*Gracilaria cearencis* (A.B. Joly & Pinheiro) A.B. Joly & Pinheiro	MA, CE, PE, BA	Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Nunes 2005; **Este trabalho**
8.*Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Taylor 1960; Joly 1965b; Cordeiro-Marino 1972; Oliveira 1977; Oliveira et al. 1983; Guimarães 2006; Nunes 2005; **Este trabalho**
9.*Gracilaria cervicornis* (BRA34)	PB	**Este trabalho**
10.*Gracilaria cornea* J. Agardh	MA, PI, CE, RN, PB, PE, BA, ES, RJ	Oliveira 1977; Ferreira 1987; Nunes 2005; **Este trabalho**
11.*Gracilaria crassissima* (P.L. Crouan & H. Crouan) P.L. Crouan & E H. Crouan	BA	Nunes 2005
12.*Gracilaria cuneata* Areschoug	CE, RN, PB, PE,BA, ES	Oliveira 1977; Bellorin 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006; **Este trabalho**
13.*Gracilaria curtissiae* J. Agardh	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, SC	Oliveira 1977; Bellorin 2002; Nunes 2005; Guimarães 2006; **Este trabalho**
14.*Gracilaria damaecornis* J. Agardh	BA,SC	**Este trabalho**
15.*Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie	MA, CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, PR, SC	Cordeiro-Marino 1972; Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Oliveira et al. 1983; Nunes 2005; Guimarães 2006; **Este trabalho**

Tabela 9. Continuação.

Espécie	Estado	Referências
16.*Gracilaria flabelliformis* (P.L. Crouan & H.M. Crouan) Fredericq & Gurgel	ES, RN	Gurgel et al. 2004b; Nunes 2005; Guimarães 2006; **Este trabalho**
17.*Gracilaria foliifera* var angustissima W.R. Taylor	MA, CE, PB, BA	Oliveira 1977; Ferreira-Correia 1987; Nunes 2005
18.*Gracilaria galetensis* C.F.D.Gurgel, S.Fredericq & J.N.Norris	BA	Nunes 2005
19.*Gracilaria hayi*	RN	**Este trabalho**
20.*Gracilaria intermedia* J. Agardh	BA	Nunes 2005
21.*Gracilaria isabellana* Gurgel, Fredericq & J.N. Norris	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ	Nunes 2005; **Este trabalho**
22.*Gracilaria mammillaris* (Montagne) M. A. Howe	CE, RN, PB, PE, BA, ES, RJ, SP	Taylor 1960; Joly 1965; Oliveira 1977; Bellorin 2002; Guimarães 2006
23.*Gracilaria ornata* Areschoug	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES	Oliveira 1977; Gurgel 2001; Nunes 2005; Guimarães 2006
24.*Gracilaria pauciramosa* (N. Rodríguez de Ríos) A.M.Bellorin, M.C.& E.C.Oliveira	BA	Nunes 2005
25.*Gracilaria rangiferina* (Kützing) Piccone	CE, PE	Silva et al. 1996; **Este trabalho**
26.*Gracilaria smithsoniensis* Gurgel, Fredericq & J.N. Norris	BA, ES	Nunes 2005; **Este trabalho**
27.*Gracilaria yoneshigueana* Gurgel, Fredericq & J.N.Norris	RN, PB, SP, RJ	Gurgel et al. 2004b; **Este trabalho**
28.*Gracilaria* sp. Búzios	RJ	**Este trabalho**
29.*Gracilariopsis silvana*	RN, ES	**Este trabalho**
30.*Gracilariopsis tenuifrons* (C.J.bird & E.C.Oliveira) Fredericq & Hommersand	CE, RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ, SP, SC	Oliveira 1984; Nunes 2005; **Este trabalho**

Referências

Bellorin AM (2002) Sistemática e Filogenia molecular de algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo

Cordeiro-Marino M (1972) Rodofíceas Marinhas do estado de Santa Catarina. Instituto de Biociências, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Costa ES, Plastino EM, Petti R, Oliveira EC, Oliveira MC (2012) The Gracilariaceae Germoplasm Bank of te University of São Paulo, Brazil - A DNA Barcoding Approach. J Appl Phycol 24:1643-1653

Ferreira-Correia, MM (1987) Rodofíceas marinhas bentônicas do litoral oriental do Estado do Maranhão. Coleção Ciências Biológicas. Série Botânica 1: 1-255

Guimarães SMPB (2006). A revised checklist of benthic marine Rhodophyta from the State of Espírito Santo. Bol Inct Bot 17: 143-194

Gurgel CFD (2001) Phylogeny, Taxonomy and Biogeography of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with Emphasis on Taxa from the Western Atlantic. Ph.D. Dissertation. University of Louisiana at Lafayette, UMI microform nº 3029835, Bell & Howell-Proquest Information and Learning Press, Ann Harbor, MI. 273 pp

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris JN (2004c) *Gracilaria apiculata* e *G. flabelliformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta): restoring old names for common tropical western atlantic species, including the recognition of three new subspecies, and replacement name for "*G. lacinulata*". Cryptogamie, Algol 25 367-396

Gurgel CFD, Fredericq S, Norris, JN, Yoneshigue-Valentim Y (2008) Two news flat species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *G. abyssalis* sp. nov. and *G. brasiliensis* sp. nov. Phycologia 47, 249-264

Joly AB (1965) Flora Marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Univerdade de São Paulo, ser. Bot., 21:1-393

Nunes JMC (2005) Rodofíceas Marinhas Bentônicas do Estado da Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo

Oliveira EC (1977) Algas marinhas bentônicas do Brasil. Tese (Livre Docência), Universidade de São Paulo

Oliveira EC, Bird CJ, Mclachlan J (1983) The genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gigartinales) in the Westrn Atlantic. *G. domingenesis* Sond ex Küz., *G. cervicornis* (Turn.) J. Ag. & *G. ferox* J.Ag. Can J Bot 61:2999-3008

Oliveira EC (1984) Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Greville (Rhodophyta): an experience with the Western Atlantic species. Hydrobiology 116/117:55-58

Pacheco MR (2011) Macroalgas marinhas associadas a bancos de rodolitos do infralitoral do Espírito Santo, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo

Plastino EM, Oliveira EC (2002) *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with terete frond and deep spermatangial conceptacles. Phycology 41 : 389-396

Silva PC, Basson PW, Moe RL (1996) Catalogue ofthe benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California Publications in Botany 79: 1-1259

Taylor WR (1960) Marine Algae of the eastern tropical coasts of the Americas. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan. 870 pp